



**HAL**  
open science

# Mécanismes de LIS1 dans les progéniteurs neuraux contribuant aux malformations de développement du cortex

Maxime Penisson

► **To cite this version:**

Maxime Penisson. Mécanismes de LIS1 dans les progéniteurs neuraux contribuant aux malformations de développement du cortex. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT : 2020SORUS415 . tel-03573760

**HAL Id: tel-03573760**

**<https://theses.hal.science/tel-03573760>**

Submitted on 14 Feb 2022

**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.

# Sorbonne Université

École doctorale Complexité du Vivant ED515

*Institut du Fer à Moulin INSERM U1270 / Développement cortical et pathologie*

Thèse de doctorat en Neurosciences

## **Mécanismes de LIS1 dans les progéniteurs neuraux contribuant aux malformations de développement du cortex**

Par **Maxime Penisson**

Dirigée par Fiona Francis

Présentée et soutenue le 17 septembre 2020

Devant un jury composé de :

Colette Dehay

Carlos Cardoso

Karine Loulier

Nadia Bahi-Buisson

Alain Trembleau

Richard Belvindrah

Fiona Francis

Rapporteuse

Rapporteur

Examinatrice

Examinatrice

Président

Co-encadrant

Directrice de doctorat



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Fiona et Richard de m'avoir accepté dans leur équipe en octobre 2016 pour débiter mon doctorat, malgré ne pas avoir effectué mon stage de M2 au laboratoire. Vous m'avez fait confiance et m'avez soutenu durant ces 4 années. Merci infiniment.

Je remercie également tous les membres de mon jury de soutenance de thèse ayant gentiment accepté d'évaluer mon travail. Merci donc à Carlos Cardoso, Colette Dehay, Karine Loulier, Nadia Bahi-Buisson et Alain Trembleau.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse, qui ont pu m'apporter beaucoup de conseils et d'encouragements tout au long du doctorat. Un très grand merci donc à Xavier Morin, Karine Loulier encore une fois et Matthias Groszer.

Je remercie la Fondation ARC pour la recherche sur le cancer d'avoir financé ma quatrième année de doctorat

Un chaleureux merci à tous les membres de l'équipe évidemment, Laurence, Marta, Marika, Melissa, Ana, Gaël, Julien, Donia. Mention spéciale pour mes voisines de bureau, Anne et Delfina, et pour Giorgia. Vous étiez toujours présents pour m'aider dès que j'avais besoin d'un conseil ou d'un coup de main. Merci pour votre aide et gentillesse, vous avez permis de faire passer les moments compliqués un peu plus facilement.

Merci à toutes les personnes de l'IFM, en particulier Jean-Antoine, qui m'a accepté dans son institut et qui m'a beaucoup aidé quand j'avais des problèmes pour mon contrat de CME ; la plateforme d'imagerie, Mythili, Theano et Carmen ; les dames de l'administration, Jocelyne, Christine, Marianne et Soumia ; toutes les personnes de la laverie ; et un chaleureux merci à toutes les personnes qui ont participé aux activités de l'animalerie, vous êtes une des raisons principales pour lesquelles l'institut n'a pas fermé les portes, vous avez fait un travail juste exceptionnel. Et bien entendu, toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance d'interagir.

Mélanie, merci pour tout. Vraiment.

Chris, Andy, Christian. The ultimate godsquad. You have no idea how much I cherish the moments I spent with you. 2012 to 2015, so many fond memories. And the fact that we are still in contact and chatting from time to time really tells me that we were not just buddies that played and endured bad hosts together, we truly are friends, and this is going to last a lifetime.

Merci à mes amis d'avoir été là pour me remonter le moral juste par votre présence, Alyssa, Adrien, Marine, Julie, Simon, Nino, Gwen, Michel, Merry, Azhi, Ollon, Lisbeth, Yrenne, Marshall, Skyleur, Leonna, Kamii, Shiki, Itsu, Nanou, Nexus.

Un grand merci à Alexandre et Eléonore de m'avoir accueilli chez vous pendant le confinement. Team Mahjong ! La bise à Manon et Titine =)

Léa, merci de croire en moi, envers et contre tout. Je t'aime.

Merci à mes parents, je ne serai pas la personne que je suis aujourd'hui sans votre amour et votre tendresse.

Julien. Cette thèse est pour toi. Tu me manques terriblement. See you starside.

# Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	
<b>Abréviations</b> .....	
<b>Remarques</b> .....	
<b>Préface</b> .....	1
<b>A. Introduction</b> .....	5
1) Généralités du développement du cortex cérébral.....	5
a) Formation du neuroépithélium et des cellules souches neurales.....	5
b) Cellules gliales radiaires apicales et transformation du neuroépithélium.....	9
c) Importance des progéniteurs intermédiaires et des cellules gliales radiaires basales.....	14
d) Importance de la phase G1 et du cycle cellulaire dans la neurogenèse : contrôle de la prolifération et de la différenciation.....	16
e) Importance de l'adhésion cellulaire au sein du neuroépithélium.....	20
f) Migration neuronale.....	22
2) Glie radiaire basale : nouvel acteur indispensable du développement.....	28
a) Caractéristiques des bRGs.....	28
b) Genèse, fonction et rôle des bRGs dans l'apparition des circonvolutions corticales.....	28
c) Mécanismes moléculaires associés à la genèse et l'amplification des bRGs, incluant les cellules bRG-like chez le rongeur.....	29
d) Organoïdes cérébraux : un modèle humain <i>in vitro</i> émergeant pour étudier les bRGs.....	34
e) bRGs et pathologie.....	34
3) Généralités sur les malformations du développement cortical.....	34
a) Histoire de l'étude des MCDs : de la naissance de la neuroscience moderne à l'imagerie médicale par IRM.....	35
b) Description des différents types de MCDs.....	43
4) LIS1 : du gène à la lissencéphalie.....	59
a) <i>LIS1</i> : gène, structure et partenaires.....	59
b) Régulateur de l'activité de la dynéine.....	62
c) Neuropathologie : mutations du gène <i>LIS1</i> et lissencéphalies.....	66
d) Etudes chez des modèles animaux et humains : que sait-on des rôles de LIS1 lors du développement cortical ?.....	72
<b>B. Résultats</b> .....	86
1) Introduction.....	90
2) Results.....	91
a) TBC1D3 promotes the generation of bRG-like cells in the mouse.....	91
b) Forebrain-specific <i>Lis1</i> knockout severely perturbs cortical development.....	92
c) <i>Lis1</i> depletion prevents bRG-like cell amplification upon TBC1D3 expression.....	94

d)	Lis1 depletion with TBC1D3 expression does not alter Tbr2+ cell numbers .....	95
e)	N-Cadherin expression is perturbed in Lis1 deficient mice but not upon TBC1D3 expression 95	
f)	Both Lis1 depletion and TBC1D3 expression alter ventricular mitoses and spindle orientations .....	96
3)	Discussion .....	97
4)	Methods .....	101
a)	Animals .....	101
b)	Plasmid preparation .....	101
c)	Electroporation in utero .....	102
d)	Brain slicing, histology, immunofluorescence and confocal acquisition .....	102
e)	Histology .....	103
f)	Analysis .....	103
5)	Figures .....	105
6)	Résultats supplémentaires .....	118
<b>C.</b>	<b>Discussion</b> .....	120
1)	Conséquences de l'expression de <i>TBC1D3</i> dans un contexte mutant pour <i>Lis1</i> .....	120
a)	Impact du fond génétique sur les effets observés .....	120
b)	Mécanismes cellulaires pouvant expliquer l'absence de cellules bRG-like chez les animaux TBC1D3 HET .....	121
2)	Quels sont les mécanismes moléculaires de Lis1 dans la production des bRGs ? .....	130
a)	Interaction fonctionnelle entre TBC1D3 et LIS1 ? .....	130
b)	Interaction fonctionnelle entre LIS1 et les autres gènes pro-bRG .....	132
c)	Importance des partenaires de LIS1 dans la production des bRGs .....	134
3)	bRGs et pathologies .....	135
4)	Conclusion .....	137
<b>D.</b>	<b>Annexes</b> .....	139
1)	Annexe 1 : Gènes et mécanismes impliqués dans la génération et l'amplification des cellules de glie radiaire basales .....	140
<b>E.</b>	<b>Références Bibliographiques</b> .....	162



## Abréviations

Note : certaines de ces abréviations font référence à des termes communément utilisés dans la littérature scientifique, dont la langue internationale est l'anglais. C'est pourquoi, pour faciliter la lecture des personnes étudiant les domaines scientifiques qui seront abordés, j'ai préféré utiliser les mêmes abréviations qui appellent à des termes en Anglais. Une traduction en Français sera disponible sur cette page, ainsi que systématiquement lors de la première utilisation du terme au sein du manuscrit.

ACTB : Actine  $\beta$

ACTG1 : Actine  $\gamma$ 1

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARFGEF2 : ADP Ribosylation Factor Guanine Nucleotide Exchange Factor 2

aRGs : cellules de glie radiaire apicales (*apical radial glial cells*)

ARN : Acide ribonucléique

ASPM : Abnormal Spindle Microtubule Assembly

BICD2 : Bicaudal D Homolog 2 Protein

BPs : progéniteurs basaux (*basal progenitors*)

bRG-like cells : cellules ressemblant aux cellules de glie radiaire basales

bRGs : cellules de glie radiaire basales (*basal radial glial cells*)

CDH : Cadhérine

CDKs : cyclin dependent kinases

CENPJ : Centromere Protein J

CLIP-170 : Cytoplasmic Linker Protein of 170 kDa

COB : Lissencéphalie pavimenteuse

CP : plaque corticale (*cortical plate*)

DCTN1 : Dynactin Subunit 1

DCTN2 : Dynactin Subunit 2

DCX : Doublecortin

DYNC1H1 : Dynein Cytoplasmic 1 Heavy Chain 1

EB1 : end-binding protein 1

EML1 : EMAP Like 1

EMX1 : Empty Spiracles Homeobox 1

EOMES : Eomesodermine

FGF : Fibroblast growth factor



FKRP : Fukutin Related Protein

FLNA : Filamin A

GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein

GFP : Green Fluorescent Protein

Gmip : GEM Interacting Protein

GPSM2 : G Protein Signaling Modulator 2

HET : hétérozygote

HIF1 $\alpha$  : Hypoxia inducible factor 1 subunit  $\alpha$

INM : migration nucléaire intercinétique (*interkinetic nuclear migration*)

INSM1 : Insulinoma-Associated Protein 1

IPs : progéniteurs intermédiaires (*intermediate progenitors*)

IRM : Imagerie par résonance magnétique nucléaire

IZ : zone intermédiaire (*intermediate zone*)

KATNB1 : Katanin Regulatory Subunit B1

KO : invalidé (*knock-out*)

LIS : lissencéphalie

LIS1 (PAFAH1B1) : Lissencephaly-1 (Platelet Activating Factor Acetylhydrolase 1b Regulatory Subunit 1)

LoxP : Locus of X-over P1

LZTS1 : Leucine Zipper Tumor Suppressor 1

MADM : mosaic analysis with double markers

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

MCDs : malformations du développement cortical (*malformation of cortical development*)

MCPH : Microcephaly Primary Autosomal Recessive

mDia : mammalian Diaphanous

MDS : Syndrome de Miller-Dieker (*Miller-Dieker syndrome*)

MEF : Fibroblastes embryonnaires de souris (*mouse embryonic fibroblasts*)

MST : Translocation mitotique du soma (*Mitotic Soma Translocation*)

mTOR : Mechanistic target of rapamycin kinase

MZ : zone marginale

NDE1 : NudE Neurodevelopment Protein 1

NDEL1 : NudE Neurodevelopment Protein 1 Like 1

NEs : cellules neuroépithéliales

NSD1 : Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1

NUDC : Nuclear Distribution C, Dynein Complex Regulator

OFD1 : OFD1 Centriole And Centriolar Satellite Protein

PAX6 : Paired box 6

PDGF : Platelet derived growth factor

PH3 : Phospho-Histone 3

PI3K : Phosphoinositol triphosphate kinase

PI3KCA : Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha

PNH : Hétérotopie nodulaire périventriculaire (*periventricular nodular heterotopia*)

POMGNT1 : Protein O-Linked Mannose N-Acetylglucosaminyltransferase 1

POMT1 : Protein O-Mannosyltransferase 1

POMT2 : Protein O-Mannosyltransferase 2

PTEN : Phosphatase and TENSine homolog

pVIM : Phospho-Vimentin

QI : quotient intellectuel

RAB39b : Ras-Related Protein Rab-39B

Rac1 : Rac Family Small GTPase 1

RF : radiofréquence

RGS3 : Regulator Of G Protein Signaling 3

RHO : Rhodopsine

RhoA : Ras Homolog Family Member A

ROCK : Rho associated coiled-coil containing protein kinase

SBH : Hétérotopie sous-corticale en bande (*subcortical band heterotopia*)

SHH : Sonic hedgehog

shRNA : petit ARN à épingle à cheveux (*short hairpin RNA*)

SMARCC1 (BAF155) : WI/SNF related, matric associated, actin dependent regulator of chromatin subfamily C member 1 (BRG1-associated factor 155)

SMARCC2 (BAF170) : SWI/SNF related, matric associated, actin dependent regulator of chromatin subfamily C member 2 (BRG1-associated factor 170)

SNC : système nerveux central

SNPs : Progéniteurs neuraux courts (*short neural progenitors*)

SOX2 : SRY-box transcription factor 2

SVZ : zone sous-ventriculaire (*subventricular zone*)

TBC1D3 : TBC1 Domain Family Member 3

TBL1 : Transducin Beta Like 1

TBR2 : T-box brain transcription factor 2

TMEM14B : Transmembrane Protein 14B

TRNP1 : TMF1 Regulated Nuclear Protein 1

TUB : tubuline

Vav3 : Vav Guanine Nucleotide Exchange Factor 3

VZ : zone ventriculaire (*ventricular zone*)

WDR62 : WD repeat-containing protein 62

WT : sauvage (*wild-type*)

YWHAE : Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein  $\epsilon$

## Remarques

Cette thèse de doctorat sera rédigée principalement en français.

La section **2)** de l'introduction sera principalement constituée d'une revue que j'ai rédigée avec l'aide du Dr. Julia Ladewig, du Dr. Richard Belvindrah et du Dr. Fiona Francis (Penisson et al., 2019), insérée à cette thèse dans les annexes.

La section **Résultats** sera composée de mon article de doctorat en préparation, rédigé en anglais. Un résumé en français sera disponible en préface de l'article.

## Préface

Le système nerveux central (SNC), composé de l'encéphale et de la moelle épinière, reçoit et intègre les stimuli externes et internes pour produire une réponse adaptée. L'encéphale est, à son tour, composé du cerveau, du tronc cérébral et du cervelet, et constitue le centre fonctionnel du SNC. Le cortex cérébral, structure laminaire à la surface du cerveau, possède une organisation fonctionnelle, anatomique et cellulaire complexe, qui toutes sous-tendent le rôle fondamental du cortex dans le fonctionnement du SNC.

Il est le siège de nombreuses fonctions complexes chez l'humain, telles que : le contrôle des mouvements volontaires (cortex moteur), la réception des informations provenant de la surface du corps (cortex somato-sensoriel) et la sensation de son propre corps (proprioception), la perception auditive (cortex auditif) et visuelle (cortex visuel), la compréhension et production du langage (aires de Broca et Wernicke), les fonctions cognitives supérieures comme le raisonnement, la mémoire de travail et bien d'autres. Ces fonctions sont sous le contrôle d'un réseau complexe de neurones réalisant des connections inter et intra-corticales, permettant de lier les régions fonctionnelles du cortex entre elles ainsi qu'avec les autres acteurs du SNC comme les ganglions de la base, noyaux sous-corticaux, le cervelet et noyaux du tronc cérébral (Budd and Kisvarday, 2013; Budd and Kisvárdy, 2012). Cette organisation permet un traitement et l'intégration des informations, donnant la capacité à l'organisme de produire une réponse adaptée à son environnement. Quand ces réseaux ne sont pas établis correctement lors du développement, ou qu'ils sont affectés par des traumatismes ou des pathologies neurodégénératives, des troubles du comportement peuvent commencer à émerger (Seeley et al., 2009).

Sur le plan anatomique, le cortex se présente de manière différente en fonction des espèces. Tout d'abord, la taille du cerveau varie fortement entre les animaux. Par exemple, la drosophile compte 250 000 neurones (Scheffer et al., 2020; Xu et al., 2020), le poisson zèbre 10 millions de neurones (Hinsch and Zupanc, 2007), la souris environ 70 millions de neurones (Herculano-Houzel et al., 2006), et le cerveau humain compte 86 milliards de neurones (Azevedo et al., 2009). Par ailleurs, la proportion de neurones présents dans le cortex varie selon ces espèces. Chez la souris, le cortex contient 4 millions de neurones (Herculano-Houzel et al., 2015), représentant 5% du total, alors que le cortex humain contient 21 milliards de neurones (Herculano-Houzel, 2009; Pakkenberg and Gundersen, 1997), presque le quart des neurones totaux du cerveau, suggérant une complexification du cortex en fonction des espèces. Enfin, l'aspect même du cortex peut également varier. Chez les mammifères, certaines espèces ont un cortex lisse, on dit de ces espèces qu'elles sont lissencéphaliques ; d'autres espèces, telles que le furet, le chat, et notamment les primates et Homo sapiens, sont gyrencéphaliques car leur cortex présente des circonvolutions. Ces circonvolutions sont dues à la présence de crêtes appelées *gyri* (pluriel de *gyrus*) et de sillons appelés *sulci* (pluriel de *sulcus*). Ces structures permettent d'augmenter la surface

du cortex dans le volume restreint de l'enveloppe crânienne (à l'instar des villosités et microvillosités de l'intestin grêle), et donc d'augmenter le nombre de cellules et la complexité des fonctions du cortex. L'apparition de ces circonvolutions débute aux alentours de la 20<sup>ème</sup> semaine de développement embryonnaire chez l'humain (Girard et al., 2016; Tallinen et al., 2016).

Sur le plan cellulaire, le cortex cérébral est composé de 6 couches numérotées de 1 (la plus superficielle) à 6 (la plus profonde), ayant des types neuronaux et donc des fonctions bien distinctes (Gilmore and Herrup, 1997). La couche moléculaire (1) est principalement composée de fibres et de quelques neurones. La couche granulaire externe (2) et la couche pyramidale externe (2/3) participent principalement aux connections intra-corticales, alors que la couche granulaire interne (4) et la couche pyramidale interne (5) participent quant à elles principalement aux connections extra-corticales. La couche 4 est composée principalement de neurones encodant des informations sensorielles provenant du thalamus (Schubert et al., 2003), relais sensoriel principal, et qui innervent les couches 2/3 (Guy and Staiger, 2017). La couche 5 est la couche contenant les neurones pyramidaux qui connectent des cibles sous-corticales et en dehors du cerveau. Enfin, les cellules de la couche polymorphe (6) envoient leurs axones vers d'autres régions corticales ainsi que vers le thalamus (Usrey and Sherman, 2019). En fonction des aires fonctionnelles du cerveau, l'importance et l'épaisseur de chacune de ces couches peut varier, comme par exemple la couche 4 dans le cortex somato-sensoriel primaire, ou la couche 5 dans le cortex moteur primaire qui sont plus importantes que dans d'autres régions du cortex.

Toutes les informations présentées jusqu'à présent permettent de mettre en évidence le fait que le cortex est une structure très complexe, tant structurellement que fonctionnellement, et que la mise en place d'un tel système nécessite forcément des mécanismes développementaux précis et finement contrôlés. Aussi, des perturbations lors des processus du développement du cortex sont à l'origine de nombreuses malformations que l'on appelle malformations du développement du cortex (MCDs, *Malformation of cortical development*), qui se caractérisent par des anomalies anatomiques (taille du cerveau ou des ventricules, aspect du cortex, présence de neurones ectopiques). Ces dernières notions, l'importance du développement cortical et les dérégulations qui peuvent entraîner des MCDs, seront abordées dans cette thèse de doctorat.

Dans cette introduction, j'aborderai en détails le développement du cortex cérébral, en précisant le rôle des différentes cellules progénitrices impliquées dans la formation des neurones corticaux. Je m'attarderai sur une population de cellules particulières : les cellules de glie radiaire basales (*basal radial glia cells*, bRGs). Les bRGs sont des cellules largement présentes chez les espèces gyrencéphaliques et peu présentes chez les espèces lissencéphaliques, et ont été présentées depuis leur découverte il y a une dizaine d'années comme une population critique de progéniteurs. On les suppose comme étant particulièrement importantes pour le développement des circonvolutions. Ensuite, je présenterai de manière globale les MCDs, en tenant compte de l'histoire de leur étude, notamment en

mentionnant le rôle fondamental de l'imagerie par résonance magnétique (IRM), et en présentant l'ensemble des MCDs de manière concise avant de focaliser mon propos sur une pathologie en particulier : la lissencéphalie (LIS). Cette pathologie présente comme caractéristique une surface corticale lisse chez l'humain, accompagné par des crises d'épilepsie et des retards mentaux. Un des gènes impliqués dans cette pathologie est le gène *LIS1*, codant pour un partenaire de la dynéine, protéine motrice transportant divers cargos du pôle + au pôle – des microtubules. Je présenterai donc également les divers rôles de *LIS1*, et son interaction fonctionnelle avec la dynéine, et en soulevant la question du rôle de *LIS1* dans la pathogénèse de la lissencéphalie.

Un élément crucial manquant dans la littérature reste le rôle potentiel des bRGs lors de l'établissement des MCDs. En effet, bien que leur découverte récente date du début des années 2010, peu d'études utilisant du tissu humain embryonnaire n'ont pu jusqu'alors être réalisées, afin d'essayer de tracer des liens corrélatifs ou de cause à effet entre des troubles de la genèse et/ou des fonctions de bRGs avec les MCDs (voir les commentaires sur Bershteyn et al., 2017 dans la discussion). Il y a un besoin crucial de réexaminer la LIS, ainsi que les autres pathologies du développement, en étudiant la genèse de la population et l'évolution du nombre des bRGs présents au cours du développement du cortex mutant, ainsi qu'évaluer si leur fonction est altérée dans ces divers contextes pathologiques.

C'est dans ce contexte, et pour palier à ce manque, que le projet de recherche que j'ai réalisé au cours de mon doctorat s'inscrit. En effet, lors de mon doctorat, j'ai enrichi la population de bRGs chez la souris, naturellement faible en nombre dans cette espèce, par électroporation *in utero* d'un plasmide codant pour un gène spécifique des hominidés, *TBC1D3* (Ju et al., 2016). L'électroporation *in utero* est une technique de chirurgie sur la souris gestante, visant à injecter un vecteur plasmidique dans le liquide céphalo-rachidien des embryons et à forcer l'entrée de ce vecteur dans les cellules au contact du ventricule grâce à une impulsion électrique. Cette technique permet donc de manipuler génétiquement les progéniteurs neuraux. L'expression de *TBC1D3* permet un enrichissement dans le cerveau murin d'une population de cellules semblables à des bRGs (cellules bRG-like). Pour évaluer le rôle du gène *Lis1* dans la production de ces cellules, j'ai testé l'effet d'une déplétion de *Lis1* de 50% dans les progéniteurs neuraux et la capacité de *TBC1D3* à générer des bRGs. Lors de mes études, j'ai confirmé que l'effet de l'expression de *TBC1D3* chez la souris conduit à une augmentation du nombre de cellules bRG-like, et que la déplétion de *Lis1* limite cet enrichissement. J'ai enfin montré que la déplétion de *Lis1* pourrait bloquer l'effet de *TBC1D3* en perturbant l'orientation du fuseau mitotique et l'expression de N-Cadhérine.

Pour conclure cette thèse de doctorat, je discuterai de l'implication de mes travaux de recherche dans le contexte actuel de l'état de la recherche scientifique sur les bRGs et les MCDs. Je traiterai des conséquences de l'expression de *TBC1D3* dans un contexte mutant pour *Lis1*. Je soulèverai le rôle potentiel de *LIS1* dans la production des bRGs, en explorant son interaction fonctionnelle avec *TBC1D3*

et d'autres gènes régulant la production des bRGs. Enfin, je discuterai de l'implication des perturbations des bRGs dans la pathogénèse des MCD.



## A. Introduction

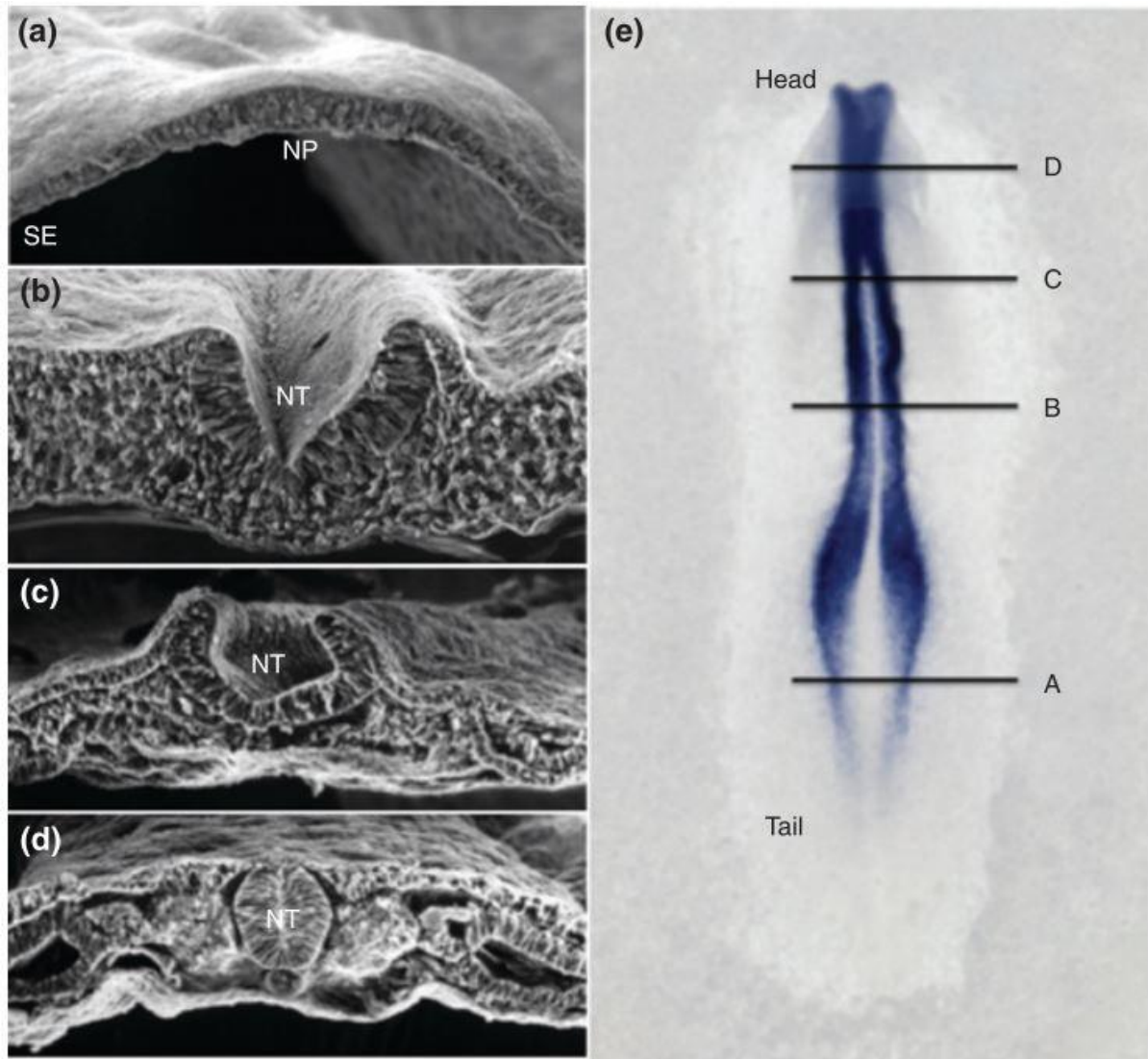
### 1) Généralités du développement du cortex cérébral

#### a) Formation du neuroépithélium et des cellules souches neurales

Le développement du SNC débute juste après la gastrulation, la transformation de l'embryon en une structure possédant 3 feuillets cellulaires embryonnaires : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. Des cellules du mésoderme médial (cellules du centre organisateur) sécrètent alors des facteurs qui vont engager les cellules de l'ectoderme sus-jacent vers un processus s'appelant l'induction neurale (Darnell and Gilbert, 2016; Hemmati-Brivanlou and Melton, 1997; Wilson and Edlund, 2001). Chez le xénope, plusieurs molécules inductrices ont été mises en évidence, telles que la Follistatine, Noggin, Chordin, Xnr3 et Cerberus (Harland, 2000). Ces cellules induites seront les premières cellules souches qui donneront naissance à toutes les cellules du SNC.

Les cellules de l'ectoderme ainsi engagées dans un destin cellulaire neural vont donner naissance au neur ectoderme, ou neuroépithélium. Puis, le neuroépithélium va s'épaissir, et les bords latéraux vont se surélever et se rejoindre (Greene and Copp, 2014; Nikolopoulou et al., 2017), formant un « tube » à l'intérieur de l'embryon entre l'ectoderme et le mésoderme sous-jacent formant ainsi le tube neural (**Figure 1**).

Ce phénomène débute à E8.5 chez la souris et lors de la troisième semaine de développement chez l'humain. La fermeture commence vers la région rostrale de l'embryon, puis va se poursuivre vers les extrémités rostrales et caudales. Les pathologies liées à des troubles de fermeture du tube neural peuvent avoir différents degrés de sévérité. Les anomalies de fermeture antérieures ou rostrales sont souvent létales (induisant des anencéphalies), alors que les anomalies de fermeture postérieures entraînent des spina bifida, caractérisées par une moelle épinière non protégée par les vertèbres et exposée (seulement recouverte par la peau du dos) (Greene and Copp, 2014). Le tube neural va ensuite changer de morphologie globale pour donner forme aux différentes vésicules précoces du SNC, formant ainsi en suivant l'axe rostro-caudal : le télencéphale (à l'origine des hémisphères cérébraux), le diencéphale (qui donnera naissance entre autres au thalamus, à l'hypothalamus et à la glande pinéale), le mésencéphale (qui donnera naissance à la partie supérieure du tronc cérébral contenant notamment l'aire tegmentale ventrale et le raphé médian), le métencéphale (qui se développera en pont et cervelet), le myélocéphale (partie inférieure du tronc cérébral ou bulbe rachidien), et enfin la moelle épinière. Dans le cadre de mon doctorat, nous nous concentrerons sur la partie dorsale du télencéphale, à l'origine du cortex cérébral.

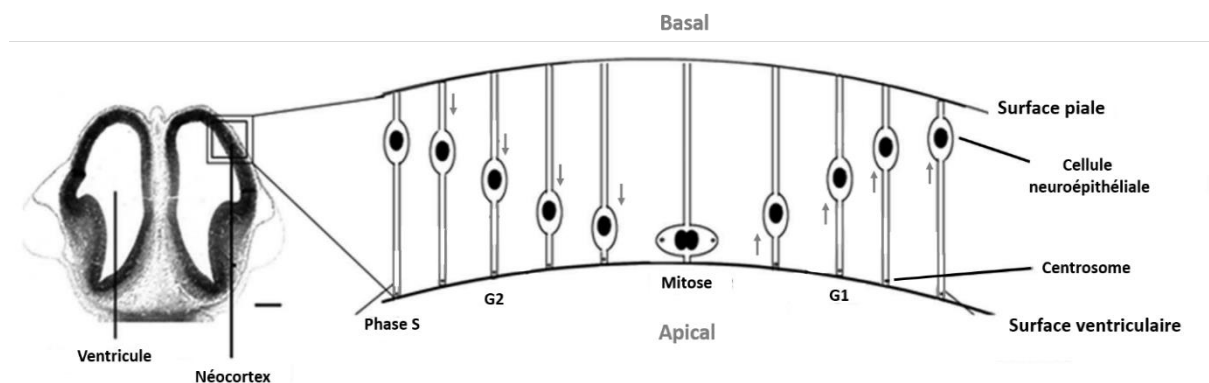


**Figure 1 : Formation du tube neural chez l'embryon de poulet.** L'ectoderme, sous l'influence de facteurs sécrétés par le mésoderme médial, va se transformer en neuroépithélium (a) et va s'épaissir sur les bords latéraux (b), les bourrelets neurales vont se soulever et progressivement se rapprocher (c). La fusion des deux bords va permettre l'individualisation du tube neural par rapport au reste de l'ectoderme (d). La fermeture commence vers la région rostrale de l'embryon et continue telle une fermeture éclair en rostral et caudal. NP : plaque neurale (*neural plate*), SE : épiderme de la peau (*skin epidermis*), NT : tube neural (*neural tube*), Head : tête, Tail : queue (Darnell and Gilbert, 2016).

À ce stade précoce suivant la fermeture du tube neural, le neuroépithélium est composé de cellules souches neurales : les cellules neuroépithéliales (NEs). Les NEs, à l'instar d'autres cellules épithéliales, présentent une polarité apico-basale, avec une morphologie ovoïde bipolaire due à un corps cellulaire massif au centre, et deux processus fins donnant une forme effilée aux extrémités et connectant la lumière via la surface ventriculaire et la membrane basale à la surface piaie (Farkas and Huttner, 2008). Ces cellules sont à l'origine de l'expansion du tube neural en différentes vésicules grâce à leur capacité à produire des divisions amplificatrices symétriques (Huttner and Kosodo, 2005). Ces cellules expriment le filament intermédiaire Nestine (marqueur épithélial), le facteur de transcription Sox2 et les acteurs de la voie de signalisation Notch-Delta. Enfin, ces cellules sont jointes par des jonctions serrées dépendantes de l'Occludine (Aaku-Saraste et al., 1996). Bien que découvertes en 1889 par His (*Die Neuroblasten und deren Entstehung im embryonalen Mark, 1889*), c'est Sauer en 1935 qui fera une

découverte fondamentale sur le mode de division des NEs (Sauer, 1935) : les NEs migrent au sein du neuroépithélium lors du cycle cellulaire, s'éloignant et se rapprochant de la lumière du tube neural pour réaliser la mitose au contact de cette dernière. Sauer contredira les premières descriptions du neuroépithélium, faisant référence à différents types cellulaires en justifiant la présence de différentes morphologies cellulaires comme étant à l'origine de la conception initiale erronée de l'existence de plusieurs couches cellulaires. En effet, le neuroépithélium est composé d'une seule couche de cellules très polarisées dont les corps cellulaires migrent entre le pôle apical (intérieur du tube) connecté à la lumière du tube neural (et donc le ventricule, contenant le liquide céphalo-rachidien) et le pôle basal (extérieur du tube) vers la membrane basale (Götz and Huttner, 2005; Sauer, 1935; Taverna et al., 2014), donnant ainsi au tissu sa nature pseudostratifiée.

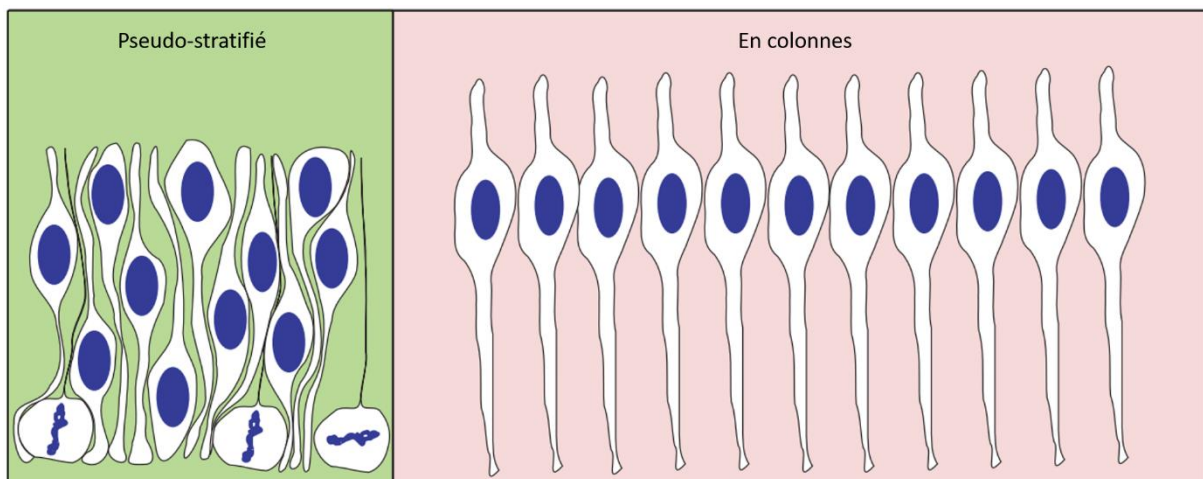
La mitose prend place exclusivement au contact de la lumière, alors que la phase S durant laquelle la cellule duplique son matériel génétique prend place au pôle basal du tube. Inévitablement, la phase G<sub>1</sub> voit le noyau des NEs réaliser un mouvement apico-basal vers la surface piaie, et la phase G<sub>2</sub>, un mouvement baso-apical en direction de la surface ventriculaire. Ce phénomène sera qualifié de migration nucléaire intercinétique (INM, *interkinetic nuclear migration*, **Figure 2**).



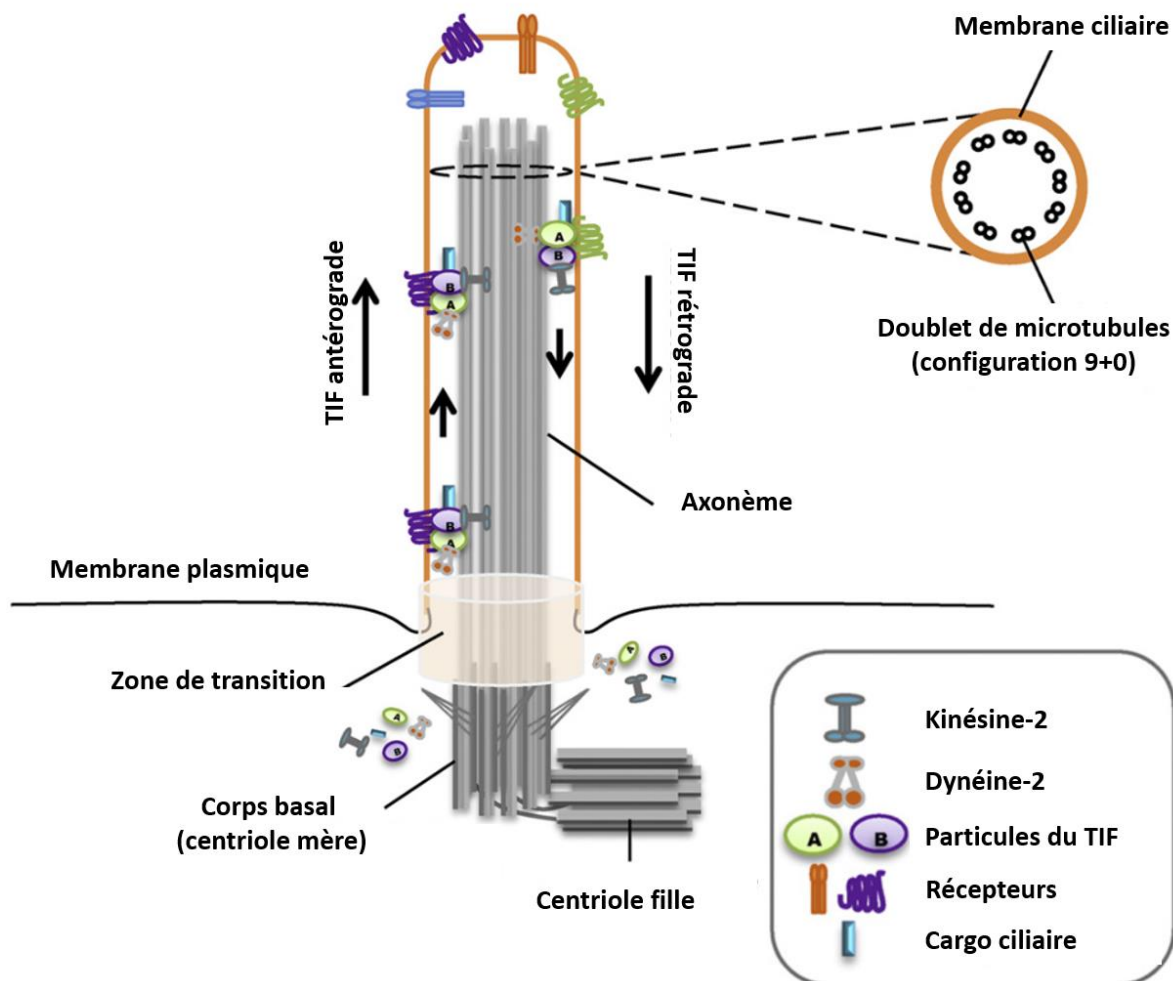
**Figure 2 : Cellules neuroépithéliales et migration nucléaire intercinétique.** La position des NEs au sein du neuroépithélium et la phase du cycle cellulaire dans laquelle elles se trouvent sont intimement liées. Les NEs dupliquent leur matériel génétique durant la phase S à la surface piaie (externe), puis migrent vers la surface ventriculaire durant la phase G<sub>2</sub>. La mitose se passe au contact de la surface ventriculaire, puis les noyaux des deux NEs filles migreront vers la surface piaie durant la phase G<sub>1</sub> pour débuter un nouveau cycle (*adaptée de Kulikova et al., 2011*).

L'INM est un processus conservé au cours de l'évolution et se retrouve chez les invertébrés (développement des ailes chez la drosophile), et également dans le développement de divers organes chez les vertébrés, comme le cristallin, le foie, les poumons et le pancréas pour nommer quelques exemples (Spear and Erickson, 2012). Une hypothèse discutée est qu'il s'agit d'un mécanisme adaptatif permettant de ségréger les cellules en fonction du moment du cycle cellulaire, d'augmenter le nombre total de cellules en utilisant l'espace efficacement, puisque le volume cellulaire est plus grand lors de la division cellulaire (Miyata, 2008; Spear and Erickson, 2012). C'est ce qui va permettre aux NEs d'amplifier leur nombre de manière rapide et efficace via des divisions symétriques jusqu'au début de la neurogenèse (**Figure 3**). L'INM permettrait également de réguler l'intensité de l'activité de la voie de signalisation Notch-Delta, ce qui aurait un rôle direct sur la neurogenèse (Del Bene et al., 2008;

Latasa et al., 2009; Murciano et al., 2002). En effet, il y a un gradient apico-basal au sein des NEs, avec une concentration de Notch plus élevée au pôle apical. Déprimer la protéine motrice Dynactin-1 chez la drosophile altère la migration nucléaire des NEs dans la rétine du poisson zèbre, entraînant une migration vers le pôle basal plus rapide et plus profonde, et une migration vers le pôle apicale plus lente, ce qui diminue la densité de cellules se trouvant au pôle apical. Ce faisant, les cellules mutantes sont moins exposées à la signalisation Notch-Delta, ce qui entraîne une entrée précoce dans la voie de la différenciation neuronale, produisant précocement des neurones au détriment de l'amplification des NEs, entraînant une diminution du pool de progéniteurs (Del Bene et al., 2008). Enfin, une explication potentielle de la localisation apicale des mitoses vient du fait que le centrosome se trouve à la base du processus apical (Lepanto et al., 2016), compte tenu du rôle de l'importance cruciale des centrioles dans la formation du fuseau mitotique (di Pietro et al., 2016). En effet, pendant l'interphase, le cil primaire, petit organite lié aux centrioles se situant au pôle apical des NEs, permet aux cellules de recevoir et intégrer les signaux circulant dans le liquide ventriculaire (Louvi and Grove, 2011), notamment en régulant la voie de signalisation Sonic Hedgehog (SHH) (Álvarez-Satta et al., 2019a). Le corps basal, structure fondamentale du cil primaire, est composé en partie par le centriole mère (**Figure 4**), ancrant le centrosome au pôle apical. Une étude récente montre que la position du centrosome au pôle apical des NEs est dépendant de la protéine centrosomale CEP83 qui permet à la centriole-mère de s'ancrer (Shao et al., 2020). Les mitoses se passent donc au niveau apical, où se trouvent les centrosomes après la résorption des cils.



**Figure 3 : Illustration de l'effet de l'organisation des NEs pratiquant l'INM.** L'organisation des NEs en neuroépithélium pseudostratifié permet d'optimiser l'espace présent et d'augmenter la densité cellulaire. À cause de la morphologie allongée des NEs, si les cellules étaient organisées en épithélium monostratifié, agencées en colonnes, beaucoup d'espace ne serait pas utilisé. L'organisation en épithélium pseudostratifié permet aux NEs de combler les espaces vides, et d'avoir des cellules au contact du ventricule, au contact de la surface piaie, et entre les deux (*adaptée de Spear and Erickson, 2012*).



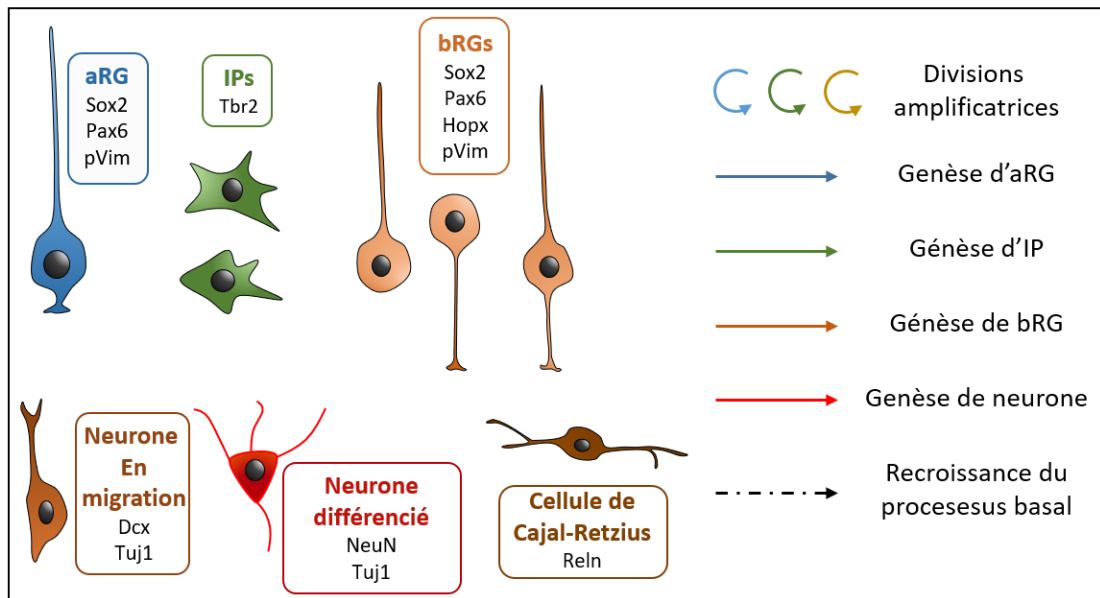
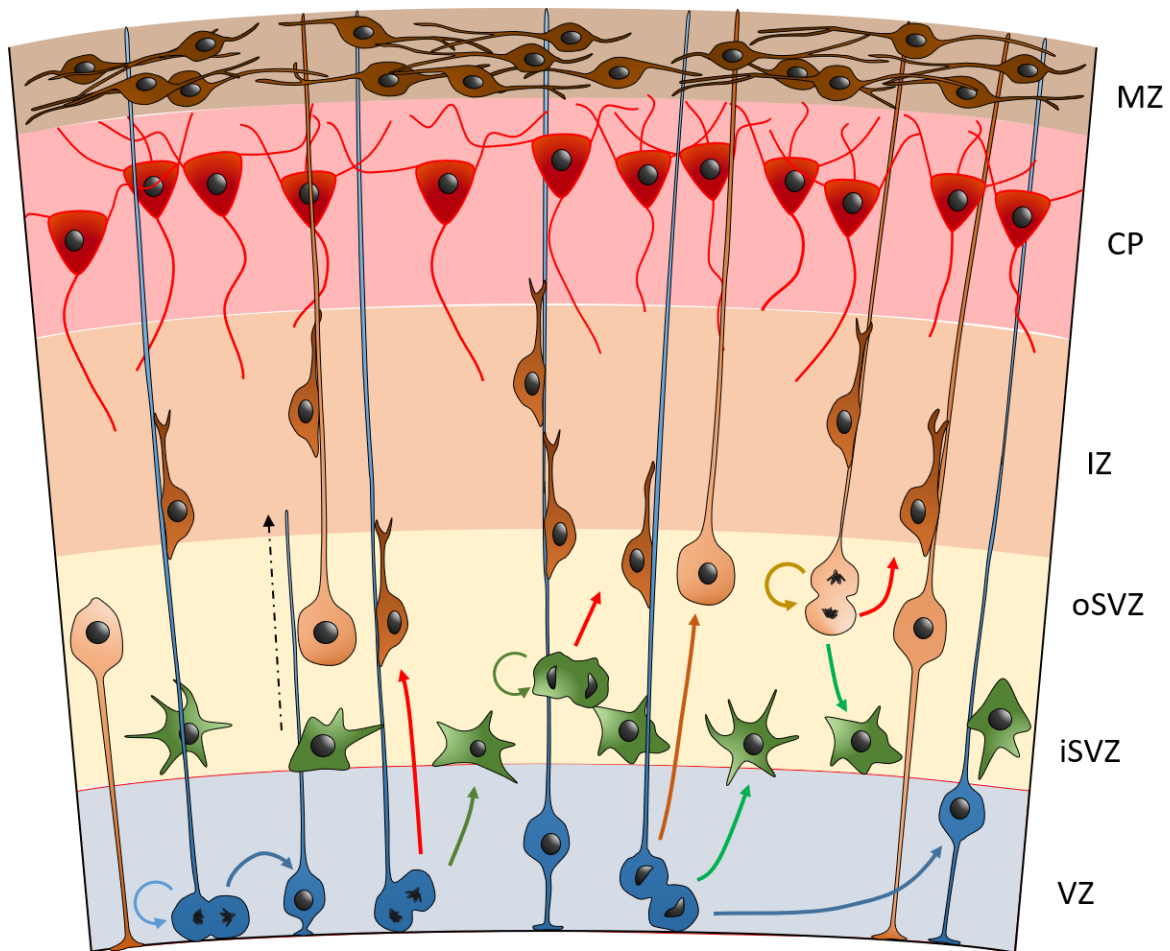
**Figure 4 : Cil primaire et centrosome.** Le cil primaire est un organe apparenté au flagelle, présent à la surface membranaire en une copie unique. Il consiste en neuf doublets de microtubules (axonème) qui naissent à partir du centriole mère au niveau du corps basal, entouré par la membrane ciliaire, contiguë avec la membrane plasmique, qui est enrichie en composants signalisants, tels que des récepteurs membranaires. Les protéines adressées au cil primaire sont assemblées en particule de transport intraflagellaire (TIF) et migrent le long de l'axonème vers la pointe du cil (TIF antérograde) ou vers le corps basal (TIF rétrograde) lors d'un processus médié par les protéines motrices kinésine-2 et Dynéine-2 (adaptée de Álvarez-Satta et al., 2019).

## b) Cellules gliales radiales apicales et transformation du neuroépithélium

Le début de la neurogenèse, aux alentours de la 5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> semaine de développement chez l'humain (Howard et al., 2008; Meyer et al., 2000; Zecevic, 2004) et E10.5 chez la souris (Dennis et al., 2016), marque le moment à partir duquel les NEs vont cesser de réaliser exclusivement des divisions symétriques amplificatrices, mais vont commencer des divisions asymétriques produisant deux cellules filles différentes : par exemple une NE et un neurone (Götz and Huttner, 2005; Huttner and Kosodo, 2005). Les neurones vont migrer vers le pôle basal, et se faisant, changer la nature du neuroépithélium en un tissu similaire à un mésenchyme (Kim et al., 2017; Singh and Solecki, 2015). Les tout premiers neurones à être générés, principalement des cellules de Cajal-Retzius que je décrirai plus bas, formeront

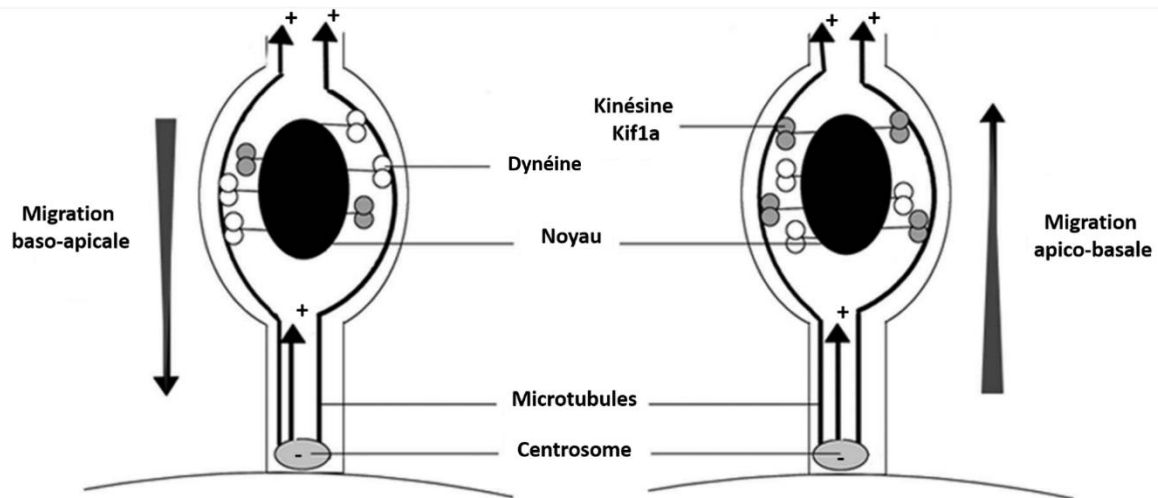
une couche primitive nommé la pré-plaque (*preplate*) (Meyer et al., 2000). Puis, la production et la migration des neurones vont augmenter l'épaisseur de la paroi corticale. Cet épaissement du cortex au fil de la neurogenèse va voir ce dernier être subdivisé en plusieurs régions distinctes : la zone ventriculaire (VZ, *ventricular zone*), la zone sous-ventriculaire (SVZ, *subventricular zone*), la zone intermédiaire (IZ, *intermediate zone*) et la plaque corticale (CP, *cortical plate*) (**Figure 5**). La pré-plaque sera alors séparée en deux couches, la sous-plaque (*subplate*) et la zone marginale (MZ, *marginal zone*), et auront toutes les deux des rôles très importants pour le développement cortical (Molnár et al., 2006). Nous verrons plus tard que chez certaines espèces comme les primates et d'autres espèces gyrencéphaliques, la SVZ peut être subdivisée en deux zones distinctes. Au même moment, les NEs vont se transformer en un nouveau type cellulaire, les cellules gliales radiaires apicales (aRGs, *apical radial glial cells*), appelées également « glie radiaire apicale » ou progéniteurs apicaux (Florio and Huttner, 2014; Götz and Huttner, 2005; Taverna et al., 2014). Elles sont très semblables aux NEs, elles expriment Sox2, Nestine et Notch. Elles sont également polarisées, en possédant un processus apical avec un cil primaire dirigé vers le ventricule et un processus basal qui va connecter la surface piaie. Ce processus basal va s'allonger autant que l'épaisseur de la paroi corticale grandira avec la production continue de neurones (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). De plus, ces cellules réaliseront également l'INM, bien que leurs somas restent confinés au sein de la VZ.

En effet, tandis que le soma des NEs migre de la surface ventriculaire à la surface piaie, parcourant l'épaisseur de la paroi corticale, le soma des aRGs migre seulement vers la partie basale de la VZ pour la phase S. Des expériences d'interférence à l'ARN dans les aRGs de rat ont permis de mettre en évidence une partie des mécanismes moléculaires responsables de cette migration (Kulikova et al., 2011; Spear and Erickson, 2012; Tsai et al., 2010). En effet, l'INM, qu'il s'agisse des NEs ou des aRGs, est un processus qui dépend de deux moteurs moléculaires dépendant des microtubules qui vont faire migrer le noyau, un pour le mouvement apical (lors de la phase G<sub>2</sub>), et l'autre pour le mouvement basal (pendant la phase G<sub>1</sub>). Compte tenu de la position du centrosome dans la cellule, dû à l'ancrage du centriole-mère au pôle apical, les pôles des microtubules ont des positions « fixes » dans les cellules. Donc, pour faire migrer le noyau vers le pôle - des microtubules, il faudra un moteur protéique dirigé vers le pôle -, et de même il faudra un moteur protéique dirigé vers le pôle + (Nulty et al., 2015, **Figure 6**). Ainsi, chez la souris, il a été démontré que le mouvement apico-basal durant la phase G<sub>1</sub> a besoin l'action de la protéine motrice Kinésine-3 Kif1a, et le mouvement baso-apical de la phase G<sub>2</sub> est dépendant de la dynéine (Tsai et al., 2010). Cette activité de la dynéine semble être régulée par LIS1. La répression de l'expression du gène *Lis1* chez le rat par électroporation *in utero* d'un shRNA (petit ARN à



**Figure 5 : Développement du cortex cérébral humain.** Sont indiqués dans cette figure tous les groupes cellulaires impliqués dans la neurogenèse lors du développement cortical. Les aRGs, positionnés dans la VZ, peuvent s'auto-amplifier et donner naissance à des neurones qui vont migrer le long de leurs processus basaux pour rejoindre la CP, ou des progéniteurs basaux localisés dans la SVZ, les IPs (iSVZ) et les bRGs (oSVZ), qui comme les aRGs peuvent s'auto-amplifier ou donner naissance à des neurones. Les bRGs sont principalement présents dans les espèces gyrencéphaliques et sont très rares dans les espèces lissencéphaliques. Les cellules de Cajal-Retzius, localisées dans la MZ, sécrètent la Reeline, facteur critique pour la bonne migration et organisation des neurones dans la plaque corticale (*adaptée de Penisson et al., 2019*).

épingle à cheveux, *Short hairpin RNA*, entraînant la destruction d'un ARNm cible) bloque les aRGs en position haute et les empêche de migrer vers la surface ventriculaire (Tsai et al., 2005).

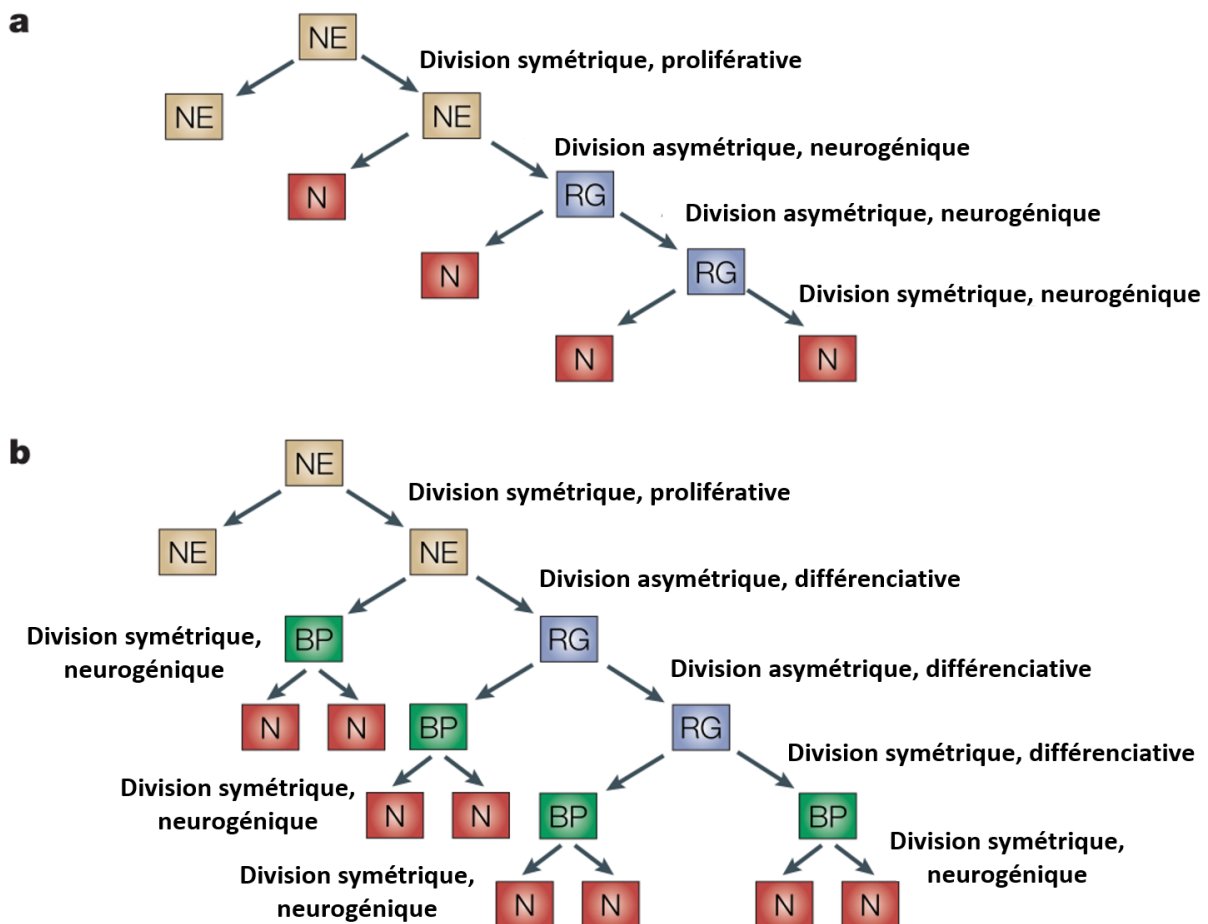


**Figure 6 : INM et protéines motrices.** La dynéine, une protéine motrice dirigée vers le pôle - des microtubules, fait migrer le noyau vers le pôle apical lors de la phase G2. Après la mitose, la protéine Kif1a, membre de la famille des Kinésine-3, protéines motrices dirigées vers le pôle +, fera migrer le noyau vers le pôle basal de la cellule pendant la phase G1 (adaptée de Kulikova et al., 2011).

Les aRGs ont d'autres différences notables avec les NEs. Au niveau de leur patron d'expression génique, elles expriment Pax6 (Englund et al., 2005; Götz et al., 1998), un facteur de transcription très important capable de réguler la balance entre auto-amplification et différenciation des aRGs (Sansom et al., 2009; Zhang et al., 2010), phospho-Vimentine, HES1 (Pollen et al., 2015; Zecevic, 2004), et chez certaines espèces comme le primate, le marqueur glial GFAP. Enfin, les jonctions serrées maintenant la cohésion des NEs seront peu à peu remplacées par des jonctions adhérentes au moment du début de la production de neurones (Aaku-Saraste et al., 1996). D'un point de vue fonctionnel, contrairement aux NEs qui réalisent exclusivement des divisions symétriques amplificatrices, les aRGs peuvent réaliser soit des divisions symétriques soit asymétriques. Elles produisent soit un neurone, soit deux autres types de progéniteurs : des progéniteurs intermédiaires (IPs, *intermediate progenitors*) ou des cellules gliales radiales basales (bRGs, *basal radial glial cells*) (Englund et al., 2005; Hansen et al., 2010; LaMonica et al., 2013, **Figure 5**). Ces deux familles de progéniteurs peuvent également s'auto-amplifier ou produire des neurones, et sont localisées dans la SVZ, qui comme nous le verrons un peu plus tard, peut être divisée en deux sections : la SVZ interne (iSVZ, *inner SVZ*) et la SVZ externe (oSVZ, *outer SVZ*). On retrouve souvent dans la littérature le terme de progéniteurs basaux (BPs, *basal progenitors*). Le terme a souvent été introduit par le passé pour faire référence aux IPs, pour les comparer aux progéniteurs apicaux, les NEs et aRGs (Arai et al., 2011; Götz and Huttner, 2005; Kawaguchi et al., 2008). Cependant, à l'époque, seuls les IPs avaient été décrits, et les progéniteurs neuraux qui sont localisés en dehors de la région apicale incluent les IPs, mais aussi les bRGs. Dans ce manuscrit, j'utiliserai les appellations IPs, bRGs et BPs, et le dernier ne sera employé que dans les cas où à la fois les IPs et les bRGs seront concernés.

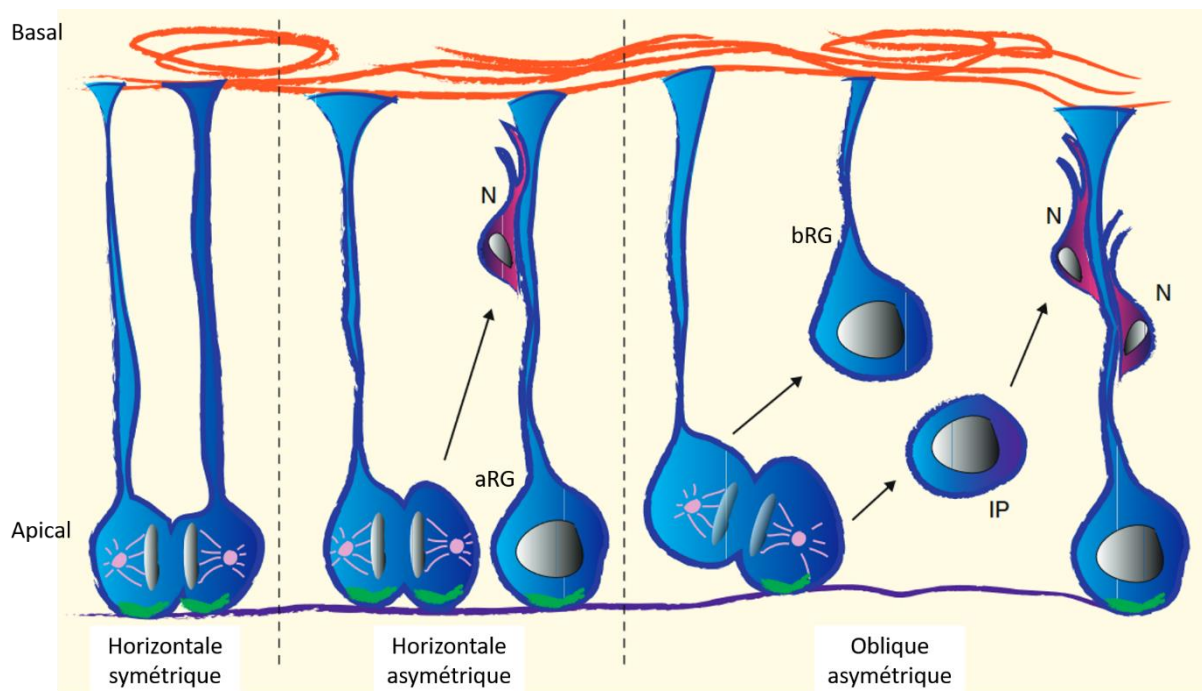


Bien qu'étant la source de toutes les cellules du cerveau en devenir, les aRGs ne participent pas de manière majoritaire à la neurogenèse humaine, les IPs et bRGs ont un rôle majeur dans la synthèse de cellules neuronales, et ce dans de nombreuses espèces comme la souris ou les primates (voir sections 1c et 2). On parle donc de neurogenèse directe quand un aRG produit directement un neurone et de neurogenèse indirecte quand un aRG produit d'abord un IP ou bRG avant que ces derniers ne produisent des neurones. La présence d'un BP entre le pool de progéniteurs apical et les neurones permet d'amplifier le nombre de neurones produits : par neurogenèse directe, un aRG ne peut donner qu'un neurone par division asymétrique, alors que par neurogenèse indirecte, même si le BP généré ne réalise qu'une seule division terminale, un aRG peut produire 2 neurones par division asymétrique (**Figure 7**). De plus, compte tenu de la très forte polarité des aRGs, l'orientation du fuseau mitotique a un rôle fondamental dans la ségrégation asymétrique ou symétrique du contenu cytosolique, et permet de définir quelle cellule conservera le processus apical et/ou le processus basal, résultant en différents destins



**Figure 7 : Différence entre neurogenèse directe et indirecte.** Ici est représenté le nombre de neurones générés après 3 divisions neurogéniques ou différenciatives de progéniteurs apicaux (NEs et aRGs) dans un contexte de neurogenèse directe (a) ou indirecte (b). Lors de la neurogenèse directe, aucun BP n'est produit, seuls les aRGs peuvent produire des neurones via une division asymétrique, ou via une division symétrique terminale, consommant l'aRG (a). La présence d'une étape supplémentaire avec la génération d'un BP permet aux aRGs de produire plus de neurones avec le même nombre de divisions asymétriques + division symétrique terminale (ici 8 contre 4 pour la neurogenèse directe) (b) (*adaptée de Götz and Huttner, 2005*).

cellulaires pour les cellules filles (Lancaster and Knoblich, 2012; LaMonica et al., 2013; **Figure 8**). Les divisions horizontales, avec des angles verticaux (perpendiculaires à la surface ventriculaire) permettent généralement des divisions symétriques, après laquelle une cellule fille conserve les processus et l'autre en développera de nouveaux et les étendra vers les surfaces apicale et basale. Les divisions neurogéniques directes peuvent également se dérouler grâce à des divisions horizontales. Les divisions obliques permettent de générer les BPs, et donc participent à la neurogenèse indirecte. Les acteurs moléculaires responsable de la correcte orientation du fuseau mitotique durant le développement cortical incluent l'Afadin (Rakotomamonjy et al., 2017), GSPM2 (Shitamukai et al., 2011), INSC (Postiglione et al., 2011), et LIS1 (Iefremova et al., 2017; Moon et al., 2020; Yingling et al., 2008).



**Figure 8 : L'orientation du fuseau mitotique dans les aRGs contrôle le destin cellulaire des cellules filles.** Les aRGs peuvent effectuer des divisions horizontales symétriques auto-amplificatrices, et asymétriques neurogéniques. Elles peuvent également produire des divisions obliques pour produire des BPs qui vont délaminer (*adaptée de Lancaster and Knoblich, 2012*).

### c) Importance des progéniteurs intermédiaires et des cellules gliales radiaires basales

Comme indiqué plus haut, les BPs forment une population critique de cellules productrices de neurones. L'identification des IPs, considérés à l'époque comme les seuls BPs existants, comme cellules constituant un pool de progéniteurs neurax dans la SVZ date de 2004 avec plusieurs études montrant des divisions produisant des neurones pyramidaux à tous les stades du développement (Haubensak et al., 2004; Miyata et al., 2004; Noctor et al., 2004). Ces différentes études chez le rongeur ont montré une dichotomie fonctionnelle entre les aRGs et les BPs. D'une part, la VZ est une zone de divisions asymétriques, les aRGs réalisent des divisions permettant le maintien d'un pool conséquent de cellules ;

la SVZ quant à elle est une zone de divisions symétriques, les IPs faisant principalement des divisions terminales donnant deux neurones et un nombre très limité de divisions amplificatrices (Haubensak et al., 2004). D'autre part, les aRGs réalisent des « divisions de surface » (mitoses au contact de la surface ventriculaire à la suite de l'INM, cellules en contact avec le ventricule et ses facteurs trophiques) et les BPs qui réalisent des divisions de « non-surface », basales, loin du ventricule, et donc dépendantes des facteurs locaux uniquement. Chez la souris, les divisions basales à E13.5 représentent presque le double des divisions apicales (Haubensak et al., 2004). Chez le primate, les IPs ne sont pas limités à la réalisation d'une unique division terminale, mais capables de s'auto-amplifier et de réaliser des divisions asymétriques produisant un neurone et un IP (Betizeau et al., 2013; **Figure 5**).

Contrairement aux RGs, les IPs sont des cellules multipolaires qui ont de courts processus. De plus, ils expriment le gène *Tbr2* (*EOMES* chez l'homme), codant pour un facteur de transcription, et ils perdent l'expression de *Pax6* (Englund et al., 2005). Plusieurs populations d'IPs ont été mises en évidence par analyse de profils d'expression génique en cellule unique (Kawaguchi et al., 2008). Les IPs ventriculaires (appelés également SNPs, *short neural progenitors*) qui représentent un état moins différencié, sont toujours présents dans la VZ et possèdent un processus apical qui contacte le ventricule. Les IPs basaux sont ceux qui furent décrits par le passé (Haubensak et al., 2004).

Les IPs produisent des neurones qui contribueront à toutes les couches de la CP (Hevner, 2019; Pontious et al., 2007). Ces cellules sont considérées comme des cellules amplificatrices de transit : « Les IPs sont une classe de cellules ayant une durée de vie finie, qui naissent de cellules souches, prolifèrent et se différencient à terme » (Tajbakhsh, 2009). Mettant en exergue l'importance fonctionnelle des IPs, de nombreuses études d'inactivation de *Tbr2* chez la souris, en utilisant différentes lignées exprimant la Cre sous le contrôle de divers promoteurs telles que *Foxg1-Cre*, *Sox1-Cre* ou *Nes11-Cre* (Arnold et al., 2008; Mihalas et al., 2016; Sessa et al., 2008), ont montré des défauts importants dans la quantité de mitoses basales et dans le nombre final d'IPs (Hevner, 2019). Dans chacun de ces cas, la production de neurones était largement affectée, qu'il s'agisse d'une diminution de la production neurale, induisant une diminution de l'épaisseur de chacune des 6 couches corticales, ou une désorganisation des couches.

Les IPs ont un rôle fondamental dans le développement cortical chez les rongeurs, et également chez l'humain. Mais un facteur qui marque la différence entre les rongeurs, espèces lissencéphaliques, et les primates, espèces gyrencéphaliques, est la place que prend la population des bRGs (Hansen et al., 2010; Wang et al., 2011). En effet, chez ces espèces, la SVZ va se voir subdivisée en deux régions : la iSVZ, qui est riche en cellules *Tbr2+* et l'oSVZ qui est riche en bRGs. Cette ségrégation des BPs n'est présente généralement que chez les espèces gyrencéphaliques, compte tenu du fait que dans la très large majorité des cas, les espèces lissencéphaliques n'ont qu'un nombre très limité de bRGs (inférieur à 5% des progéniteurs totaux). Les cellules de l'oSVZ représentent la majorité des cellules en prolifération du cortex des semaines de gestation 14 à 18 (Hansen et al., 2010), alors que les IPs prennent ce rôle chez

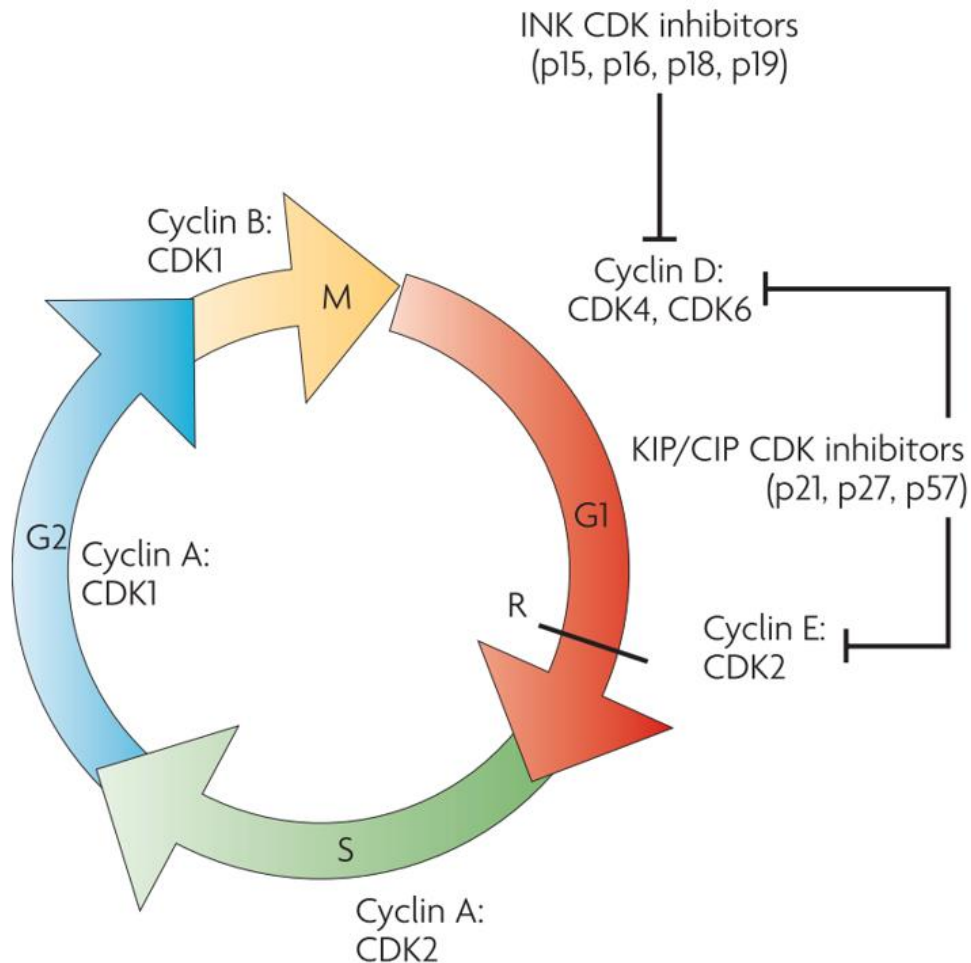
le rongeur. Les bRGs se présentent sous diverses formes, bien qu'étant comme des aRGs, ces cellules gliales possédant des processus : ils peuvent avoir soit deux processus, apical et basal, qui contactent les surfaces ventriculaire et piale respectivement, soit uniquement un processus basal (ou dans de plus rares cas, soit uniquement un processus apical) (Betizeau et al., 2013).

La découverte de cette nouvelle population de BPs a initié une vague d'études depuis le début des années 2010 (Penisson et al., 2019). Compte tenu de l'importance de ces cellules, et du fait que cette population m'a intéressé tout particulièrement dans mon travail de recherche lors de mon doctorat, les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles, ainsi que l'importance lors du neurodéveloppement des bRGs seront abordées en détails dans la section 2) du manuscrit de thèse.

#### d) Importance de la phase G1 et du cycle cellulaire dans la neurogenèse : contrôle de la prolifération et de la différenciation

Le cycle cellulaire comprend l'ensemble des événements qu'une cellule en prolifération suit, et chez les NEs et les aRGs, celui-ci est intimement liée à l'INM. Les cellules se trouvant en phase G1 peuvent, en fonction des signaux qu'elles reçoivent via l'intermédiaire du cil primaire en contact avec les facteurs trophiques circulant dans le liquide céphalo-rachidien (Louvi and Grove, 2011), des facteurs locaux comme la signalisation Notch-Delta (Latasa et al., 2009) ou de l'interaction cellulaires via protéines d'adhésion telles que CDH8 (Durak et al., 2016), s'engager dans la voie de la division cellulaire (Dehay and Kennedy, 2007; Salomoni and Calegari, 2010). La progression au cours du cycle cellulaire est finement régulée par des couples de protéines appelées cyclines, dont les niveaux d'expression vont varier au cours du cycle, et kinases dépendantes des cyclines (CDKs, *cyclin dependent kinases*) (Poon, 2016; **Figure 9**). Le point de restriction agit comme un point de non-retour, une fois passé, la cellule s'engage de manière irréversible vers la phase de duplication de l'ADN (Phase S) (Murray et al., 1994; Poon, 2016). Les protéines inhibitrices des CDK (CKI) p21 (Karimian et al., 2016), p27 (Abbastabar et al., 2018; Lukaszewicz et al., 2002; Zou et al., 2011) et p57 (Mairet-Coello et al., 2012; Tesio and Trumpp, 2011; Zou et al., 2011) sont les principaux facteurs qui contrôlent la progression des cellules au-delà du point de restriction, inhibant la fonction du couple Cdk2/Cycline E, responsable du passage du point de restriction. L'expression de ces inhibiteurs permet un retardement de l'entrée dans le cycle cellulaire. Dans le contexte du développement cortical, p27 a deux rôles supplémentaires qui sont indépendant de sa fonction sur le cycle cellulaire : elle stabilise la Neurogénine D2 via son segment N-Ter, promouvant la neurogenèse, et stimule la migration neuronale en inhibant l'activité de RhoA par son segment C-Ter (Nguyen et al., 2006). Une fois le point de restriction passé, la cellule rentre en phase S et le matériel génétique est doublé, les chromosomes passent d'un état à une chromatide à deux chromatides. La phase G2 est une phase de préparation de la mitose, elle permet la synthèse des ARNs et des protéines nécessaires au bon déroulement de la mitose, ainsi que le contrôle

de la réplication de l'ADN durant la phase S, notamment via la protéine répresseur de tumeur p53, régulièrement qualifiée de « gardien du génome » (Toufektchan and Toledo, 2018; Vousden and Prives, 2009).



**Figure 9 : Représentation schématique du cycle cellulaire.** Les cellules se trouvant dans la phase G1 peuvent entrer dans un état de quiescence ou s'engager dans le cycle cellulaire. Pour cela, la cellule doit recevoir des signaux internes et externes lui permettant d'exprimer le couple CDK2/Cycline E et passer le point de restriction (R). La cellule s'engage alors dans la phase S de réplication de l'ADN, duplication des centrosomes et préparation du matériel cellulaire pouvant subvenir aux besoins des deux futures cellules filles. La phase G2 permet de contrôler l'état de la cellule avant la division, corriger les erreurs de réplication de l'ADN et synthétiser les dernières molécules (protéines et ARNs) nécessaires à la division. Enfin, lors de la mitoses, les composants de la cellule mère sont divisés en deux de manière égale ou inégale et répartis dans les deux cellules filles (Dehay and Kennedy, 2007).

Le cycle cellulaire est un processus très important, et finement régulé lors de la corticogénèse. En effet, la transition du stade de cellule neuroépithéliale à aRG est associée à un rallongement du cycle cellulaire (Takahashi, 1995). Les cellules qui commencent à produire des neurones se mettent à exprimer de manière spécifique l'inhibiteur de la phase G1 Tis21 (Iacopetti et al., 1999). L'analyse d'incorporation cumulative du BrdU a été un outil utilisé depuis la fin des années 1980 pour évaluer la durée des différentes phases du cycle cellulaire (Nowakowski et al., 1989). Des expériences de traitement d'embryons par Olomoucine, un inhibiteur des CDK2 et CDK1, qui empêche la progression au-delà des points de restrictions de la phase G1 et de la phase G2, permet de rallonger le cycle cellulaire des cellules neuroépithéliales à E9.5 (Calegari and Huttner, 2003). Ceci résulte en une augmentation

prématurée de la production de neurones, ce qui suggère que l'augmentation de la durée du cycle cellulaire est une cause, et non une conséquence de la transition prolifération-neurogenèse des NEs. Ces phénomènes se retrouvent également au sein de cultures primaires de cellules neurales, pour lesquelles un traitement de bFGF promeut une augmentation des divisions prolifératives via une augmentation de l'expression de CDK2 et CDK4 et cyclines D2 et A et une répression de p27, alors qu'un traitement par la Neurotrophine-3 induit des effets inverses (Lukaszewicz et al., 2002). Ces traitements influent donc sur les régulateurs de la transition G1/S, permettant une entrée plus rapide ou plus lente dans le cycle cellulaire respectivement, et donc entraînant une diminution pour bFGF, et une augmentation pour Neurotrophine-3, de la proportion de cellules neuronales Map2+.

Enfin, pour confirmer le rôle direct des couples Cyclines/CDKs sur la relation cycle cellulaire – destin cellulaire, des expériences d'électroporation *in utero* visant à surexprimer les couples Cycline D/CDK4 (D4) ou Cycline E/CDK2 (E2) ont été faites chez la souris à E13.5 (Lange et al., 2009). Étonnamment, seule la surexpression du couple D4 permet de diminuer la durée de la phase G1 de 30%, la surexpression du couple E2, pourtant suggéré comme indispensable au dépassement du point de restriction G1/S n'a pas eu d'effet sur la durée du cycle. Ces résultats seront critiqués par une autre étude qui suggéra que la méthode de mesure de la durée du cycle cellulaire utilisée dans Lange et al., 2009 (mesure cumulative d'incorporation du BrdU) n'est pas adaptée à l'électroporation *in utero*, dû au fait que les cellules électroporées sont celles dont le corps cellulaire est en contact avec la surface ventriculaire, et donc nécessairement « synchrones ». Cette nouvelle étude utilisa la vidéomicroscopie pour mesurer la durée du cycle, et montra que l'expression des Cyclines D1 et E2 par électroporation *in utero* induisent une diminution de la durée du cycle dans les deux cas, et donc à une augmentation de la prolifération (Pilaz et al., 2009). Cette diminution de la durée du cycle s'accompagne de manière cohérente avec toutes les données évoquées plus haut à propos d'une diminution de la neurogenèse. Des expériences d'interférence à d'ARN pour réprimer l'expression du couple D4 montre des résultats opposés, avec une augmentation de la durée du cycle et de la production de neurones (Lange et al., 2009).

Tous les progéniteurs ne s'engagent pas vers des divisions neurogéniques, asymétriques ou symétriques. Des populations de NEs ou d'aRGs neurogéniques, avec des cycles cellulaires plus longs, et des populations prolifératives, ayant des cycles cellulaires plus courts, coexistent alors au cours du développement, et n'ont donc pas des durées de division homogènes. Il est à noter que certaines pathologies comme les microcéphalies sont parfois liées à des engagements prématurés vers la neurogenèse, avec une déplétion du pool de progéniteurs car ces cellules n'ont pas de phase d'amplification ou de maintenance suffisante à cause de leurs divisions asymétriques (voir section 3 pour plus de détails). L'utilisation d'une lignée transgénique murine exprimant la GFP sous le promoteur du gène Tis21 (Tis21-GFP) permet de marquer spécifiquement les progéniteurs s'engageant vers la voie de la neurogenèse, NEs et aRGs compris (Haubensak et al., 2004). Alors qu'un rallongement global du

cycle cellulaire est observé entre E10.5 et E14.5 chez la souris pour toutes les divisions des progéniteurs apicaux, les cellules GFP+ (effectuant des divisions neurogéniques) ont un rallongement environ 30% plus important que les cellules GFP-, et cette extension du cycle est liée à la phase G1 (Calegari et al., 2005). L'électroporation *in utero* du couple D4 à E13.5, qui entraîne un raccourcissement de la durée du cycle, dans la lignée Tis21-GFP a pu montrer que cette diminution était plus importante (60%) pour les cellules GFP+ que pour les cellules GFP- (ce qui semble logique puisque les cellules GFP+ s'engageant vers la neurogenèse ont un cycle plus long naturellement) (Lange et al., 2009).

De plus, comme mentionné précédemment, les IPs représentent la majorité des divisions neurogéniques chez la souris à E14.5, et ils ont un cycle cellulaire plus long que les aRGs (Arai et al., 2011). La phase S est plus longue chez les aRGs (5.0 h) que les IPs (3.2h), mais la durée totale du cycle est plus longue pour les IPs (26.5h) que pour les aRGs (19.1h). De plus, Arai et al montrent qu'il y a proportionnellement bien plus de Tis21-GFP+ chez les IPs que chez les aRGs, suggérant l'importance des IPs dans la production des neurones lors de la vague massive de neurogenèse à E14.5. La phase S est plus courte chez les aRGs et les IPs qui s'amplifient, et elle est de plus, proportionnellement au reste du cycle cellulaire, plus courte chez les IPs que chez les aRGs. La mitose est plus longue chez les APs que les IPs, en particulier chez les aRGs qui ne s'engagent pas dans la neurogenèse. Enfin, la phase G1 est approximativement deux fois plus longue chez les IPs que dans les aRGs, nonobstant leur destin à proliférer ou donner naissance à des neurones. La mesure de l'expression de certains ARNm a montré que des gènes comme *E2f1*, *Cdc25a*, *Cyclin g2* and *Topoisomerase II  $\alpha$* , associés généralement à la diminution de la durée de la phase S, étaient surexprimés dans les IPs Tis21-GFP+, et des gènes associés à un rallongement de la phase S comme *Efr* et la sous-unité du complexe de l'ubiquitine ligase *Fbxw7* étaient réprimés (Arai et al., 2011).

Tous ces travaux pointent vers la même considération : la durée de la phase G1 du cycle cellulaire est un paramètre critique et finement régulé de la neurogenèse. Il a été considéré que pour qu'un progéniteur s'engage vers la production de neurones, un certain temps soit nécessaire à l'intégration de facteurs et signaux (Arai et al., 2011). La corrélation entre le rallongement de la phase G1 et la différenciation cellulaire, ou un raccourcissement de la phase G1 et la maintenance d'un état prolifératif n'est pas spécifique au cortex (Singh and Dalton, 2009). En effet, les cellules souches embryonnaires murines et humaines ont une phase G1 très courte dont la durée dépend de l'expression de CDK2 (Neganova et al., 2009). La déplétion de CDK2 par interférence à l'ARN entraîne un blocage en phase G1 et une différenciation des cellules souches embryonnaires humaines vers des lignées extra-embryonnaires de destinés endodermiques et ectodermiques. Le contrôle de la phase G1 est également impliqué dans la capacité des cellules souches hématopoïétiques à se différencier (Orford and Scadden, 2008). Cependant, très peu de données sur la dynamique de la durée des phases du cycle cellulaire des bRGs existent à ce jour. Compte tenu de l'importance supposée de cette population de progéniteurs

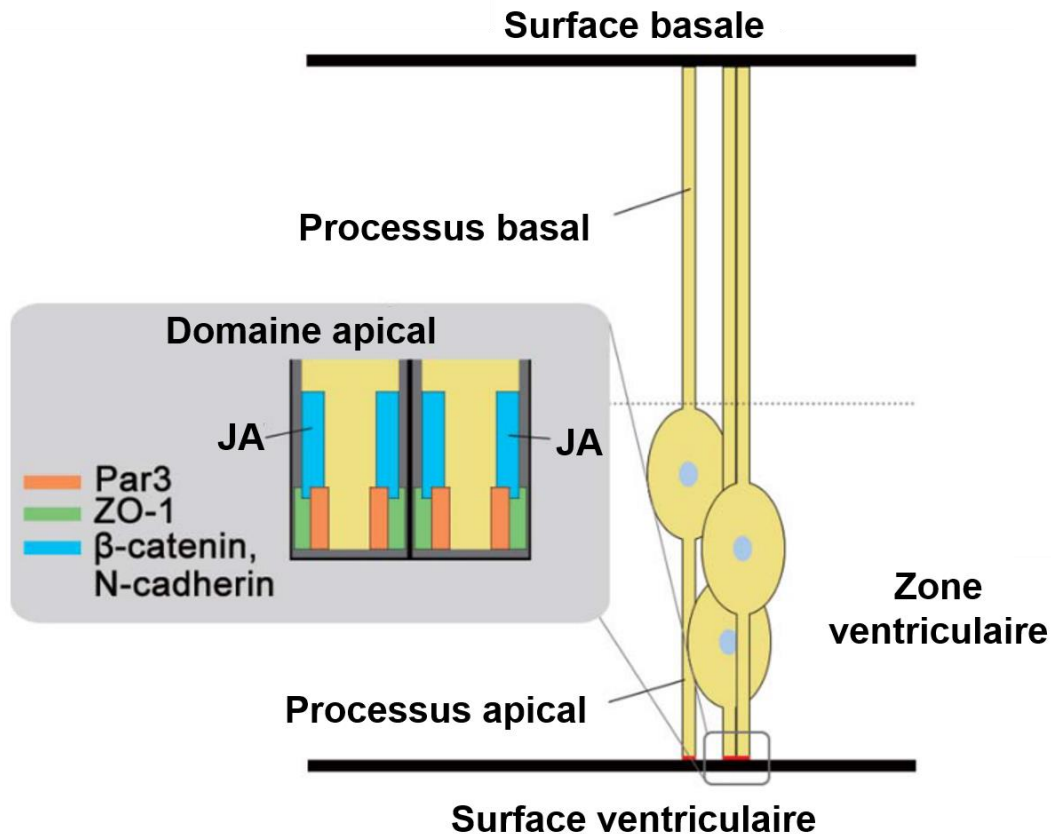
neuraux, évaluer les régulations du cycle cellulaire des bRGs pourrait nous permettre de mieux comprendre leurs fonctions.

#### e) Importance de l'adhésion cellulaire au sein du neuroépithélium

Le neuroépithélium et la VZ, lorsque la neurogenèse a débuté et que les NEs ont donné naissance aux aRGs, sont des structures très organisées composées de cellules hautement polarisées. Une telle organisation nécessite forcément des interactions cellulaires permettant aux NEs et aux aRGs de conserver leur polarité tout au long du développement du cortex, après plusieurs cycles de divisions. La surface ventriculaire du cortex en développement est constituée des membranes plasmiques apicales des NEs et aRGs, la contiguïté des membranes est permise par des jonctions adhérentes, créant ainsi une interface entre le liquide céphalo-rachidien circulant dans les ventricules et le néocortex en formation (Taverna et al., 2014, **Figure 10**). Aussi, les différents facteurs de croissance et autres molécules signalisantes sécrétées dans le liquide céphalo-rachidien impacteront le comportement des progéniteurs apicaux. La polarité de ces cellules n'est d'ailleurs pas immuable dans le temps, des expériences d'infections virales ont montré que les protéines virales présentes à la membrane des NEs transitaient différemment entre les pôles apical et baso-latéral au moment de la fermeture du tube neural et du déclenchement de la neurogenèse (Aaku-Saraste et al., 1997), suggérant une capacité du neuroépithélium d'adapter la polarité de ses cellules en fonction du stade du développement. Ensuite, la maintenance de la polarité apico-basale des progéniteurs apicaux est indispensable pour maintenir le cil primaire à sa bonne position, qui lui permet de sonder et intégrer les signaux du fluide cérébro-spinal (Veeraval et al., 2020). Enfin, les jonctions adhérentes auraient également un rôle fonctionnel dans la prise de décision d'une cellule à effectuer une division symétrique ou asymétrique. En effet, altérer les jonctions adhérentes force les neuroblastes de drosophile à réaliser des divisions asymétriques (Lu et al., 2001).

La cohésion cellulaire au sein du neuroépithélium et de la VZ dépend des jonctions adhérentes uniquement car il n'y a pas de jonctions serrées entre les NEs et les aRGs, l'expression d'occludine disparaît au moment de la fermeture du tube neural (Aaku-Saraste et al., 1996). Les jonctions adhérentes, composées de cadhérines, forment un anneau adhérent au pôle apical des cellules, leur permettant de se lier les unes aux autres (Veeraval et al., 2020). Lorsque les cadhérines commencent à interagir en *trans*, c'est-à-dire lier deux cellules entre elles, elles vont se regrouper et s'agglutiner les unes contre les autres pour former des plaques d'adhérences (Adams et al., 1998). La protéine N-Cadhérine (CDH2) est le composant principal des jonctions adhérentes, c'est une protéine transmembranaire qui a un poids moléculaire de 130 kDa, qui possède un domaine extracellulaire avec 5 domaines cadhérines permettant,





**Figure 10 : Schéma représentant les jonctions adhérentes au pôle apical des aRGs.** Les jonctions adhérentes (JA), composées entre autres de N-Cadhérine et β-Caténine, interagissent avec les protéines ZO-1 et Par3 pour maintenir l'intégrité structurelle de la surface ventriculaire, ainsi que de la polarité apico-basale des aRGs (*adaptée de Miyamoto et al., 2015*).

comme les autres cadhérines, de former des liaisons homophiliques dépendantes du calcium (Derycke et al., 2004). Des mutations dans le gène *CDH2* ou ses séquences régulatrices sont associées à différents types de cancer, qu'il s'agisse d'expression *de novo*, de réexpression, de stimulation ou des répression de son expression (Derycke et al., 2004). Ces phénomènes sont liés à ses interactions fonctionnelles avec les voies de signalisations PTEN/PI3K/AKT et MAPK, toutes deux intimement impliquées dans la prolifération et la différenciation cellulaire (Sun et al., 2015; Wang et al., 2016b). L'expression aberrante de N-Cadhérine octroie aux cellules cancéreuses des capacités invasives et de motilité supérieure, rendant les tumeurs liées à N-Cadhérine plus promptes à métastaser. Dans les progéniteurs neuraux, une perte de N-Cadhérine chez la souris entraîne une disparition des jonctions adhérentes (perte de la protéine ZO-1, marqueur des jonctions adhérentes) et une disparition de la F-actine au pôle apical. Ceci entraîne une désorganisation sévère du neuroépithélium, associée à une fragmentation de la surface ventriculaire, les cellules pouvant ainsi migrer vers le ventricule et créant un phénotype ressemblant à des hétérotopies périventriculaires (Kadowaki et al., 2007), aussi bien que la présence de progéniteurs Pax6<sup>+</sup> ectopiques, diffusant dans toute l'épaisseur du cortex en formation. La perte de N-Cadhérine perturbe la position, mais également le réseau de processus basaux des aRGs. Enfin, ce mutant présente également une altération sévère de l'organisation des neurones, qui comme les aRGs, se retrouvent éparpillés au sein du néocortex, et forment des structures anormales appelées 'rosettes'.

Parmi les autres molécules impliquées dans les jonctions adhérentes présentes dans le néocortex, la  $\beta$ -Caténine est un partenaire de la N-Cadhérine, lui permettant d'effectuer des interactions homophiliques, et est un médiateur de la voie Wnt (Veeraval et al., 2020). Cette protéine associée à la membrane permet l'interaction fonctionnelle entre l'adhérence et le destin cellulaire (Stocker and Chenn, 2015). En effet, l'expression d'une forme stable constitutivement active de  $\beta$ -Caténine (partie N-terminale tronquée empêchant sa phosphorylation par GSK3 $\beta$  et sa destruction, Chenn and Walsh, 2002) au cours du développement entraîne une surproduction de progéniteurs neuronaux, et une augmentation du volume du cerveau chez la souris (Chenn and Walsh, 2003). Enfin, la protéine  $\alpha$ E-Caténine permet de lier les complexes N-Cadhérine –  $\beta$ -Caténine et le cytosquelette d'actine (Veeraval et al., 2020). En effet, quand suffisamment de tension est générée par l'interaction en *trans* grâce à la N-Cadhérine, l' $\alpha$ E-Caténine se lie à l'actine F dépendamment de la force générée (Buckley et al., 2014). Les deux protéines Caténines sont indispensables pour le développement normal du cortex. La déplétion de  $\beta$ -Caténine entraîne une délamination des progéniteurs suivi d'une apoptose et d'une perte de l'activation de la voie Wnt (Junghans et al., 2005), une perte de  $\alpha$ E-Caténine quant à elle induit une activation anormale de la voie Sonic Hedgehog (SHH), ce qui entraîne une diminution de la durée du cycle cellulaire, une augmentation de la prolifération et une hyperplasie cérébrale (Lien et al., 2006).

Tous ces résultats révèlent l'importance des jonctions adhérentes au sein du neuroépithélium, tant pour la cohésion des cellules que leur capacité à proliférer ou se différencier de manière adéquate. Des mutations des gènes impliqués dans la formation et l'organisation des jonctions adhérentes entraînent différents types de MCDs chez l'homme, comme des hydrocéphalies, des hétérotopies et des microcéphalies (Veeraval et al., 2020). En effet, ces patients se présentent avec des déformations de la VZ, et des mutations dans les gènes codant pour la N-Cadhérine et la Connexine-43 chez le rat entraînent des altérations du développement cortical similaire à ceux des patients (neurogenèse et migration neuronale perturbées).

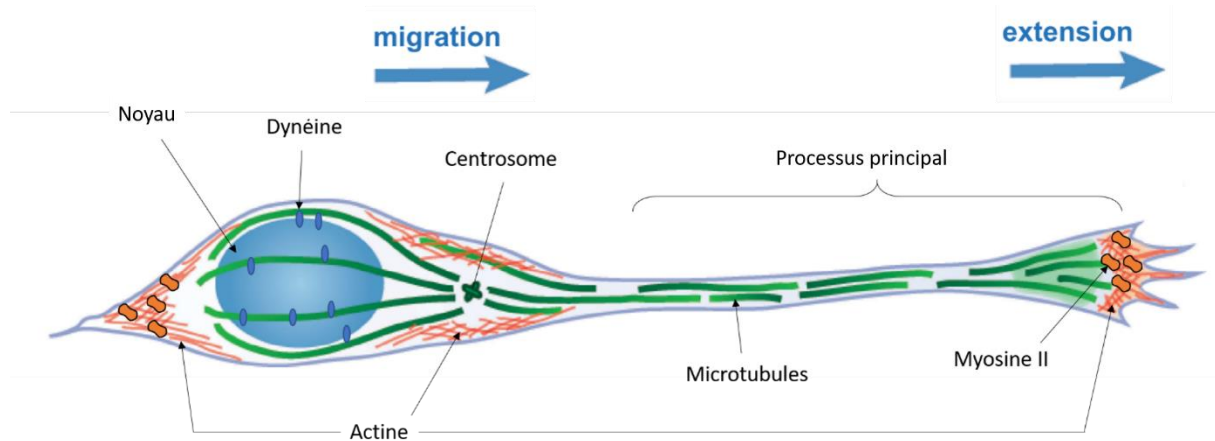
#### f) Migration neuronale

La formation des 6 couches corticales tout au long du développement du cerveau est un processus qui est finement régulé. Comme indiqué au début de l'introduction, chaque couche corticale est caractérisée par un type cellulaire et une fonction particulière, les processus qui permettent la mise en place d'une telle organisation se doivent d'être précisément contrôlés (Telley and Jabaudon, 2018). Les progéniteurs ont donc un rôle crucial dans l'établissement de ces différentes populations neuronales. Des expériences de greffes de progéniteurs ont montré que les aRGs présentent une plasticité de genèse de neurones et peuvent produire des neurones précoces (couches profondes) ou tardifs (couches superficielles) d'une manière Wnt-dépendante (Oberst et al., 2019). Des MCDs liées à des perturbations

de l'organisation des couches corticales existent chez l'humain, comme la LIS ou agyrie (Reiner, 2013), ou des mutations dans le gène codant pour la Reeline donnant une pachygyrie (D'Arcangelo et al., 1995; Romero et al., 2018). En effet, la migration des neurones, qui débute donc dès le début de la neurogenèse, suit un processus en intérieur-extérieur (*inside-out*) : les neurones nés tôt pendant le développement se retrouveront dans les couches profondes (5-6), et les neurones nés plus tardivement migreront par-dessus les neurones et au travers des couches déjà installées pour former et coloniser les couches plus superficielles (2-3) (Hatanaka et al., 2016; Sekine et al., 2014). Les cellules de Cajal-Retzius, neurones glutamatergiques qui sont formés au tout début de la neurogenèse, résident au-dessus de la CP dans la MZ, secrètent la glycoprotéine Reeline lors du développement, et jouent un rôle prépondérant dans l'organisation correcte des différentes couches neuronales (Martínez-cerdeño and Noctor, 2014). Ces cellules, via la sécrétion de la Reeline vont réguler la migration des neurones du neuroépithélium et de la SVZ vers la CP, leur transformation en cellules pyramidales, l'ordre de migration, la taille de leur corps cellulaires et l'organisation de la formation des couches corticales (Marín-Padilla, 1992; Meyer, 1999; Soriano and Del Río, 2005). Ces cellules sont transitoires et sont vouées à disparaître, mais un nombre de cellules de Cajal-Retzius persistent à l'âge adulte chez la souris : bien que leurs corps cellulaires soient « dilués » parmi tous les neurones formés au cours de la corticogenèse et qu'il soit extrêmement difficile de déceler leur corps cellulaire par immunohistochimie et d'estimer leur nombre, leurs axones et terminaisons nerveuses qui contactent de nombreux neurones du cortex sont détectables à l'âge adulte dans la couche 1 du cortex humain (Marín-Padilla, 2015). En effet, la majorité des dendrites des cellules pyramidales des autres couches plus profondes se trouvent dans la couche I au cours du développement et à l'âge adulte, il est donc possible que les cellules de Cajal-Retzius aient également un rôle dans la maturation des arbres dendritiques des neurones excitateurs du cortex (Marín-Padilla, 2015).

Les neurones excitateurs glutamatergiques qui naîtront des aRGs et des BPs migreront de manière radiale, perpendiculaire à la surface ventriculaire, en direction de la surface piaie, et utiliseront comme guide pour leur migration, les processus basaux des aRGs et bRGs, pour rejoindre la CP en formation (Edmondson and Hatten, 1987; Hatten and Mason, 1990; Horn et al., 2018; Rakic, 1978). Cette interaction avec les fibres RG se fait notamment grâce à la N-Cadhérine (Jinnou et al., 2018) et les connexines Cx26 et Cx43 (Elias et al., 2007). Au début de la neurogenèse, les neurones en migration adoptent une morphologie bipolaire particulière au début de la migration : ils tendent un processus en avant appelé processus principal (*leading process*) avec à sa base le centrosome et le noyau qui « traîne » derrière, et dirigé vers la surface piaie. Tout au long de la migration, les microtubules générés au centrosome prennent une allure allongée, parallèle au sens de la direction du neurone, allant vers la pointe du processus principal en avant, et vers l'arrière de la cellule, entourant le noyau pour le permettre de migrer grâce à des protéines motrices et le forçant à prendre une forme ovoïde (**Figure 11**). Dans les neurones en migration, compte tenu de la position du centrosome, le pôle + des microtubules se retrouve

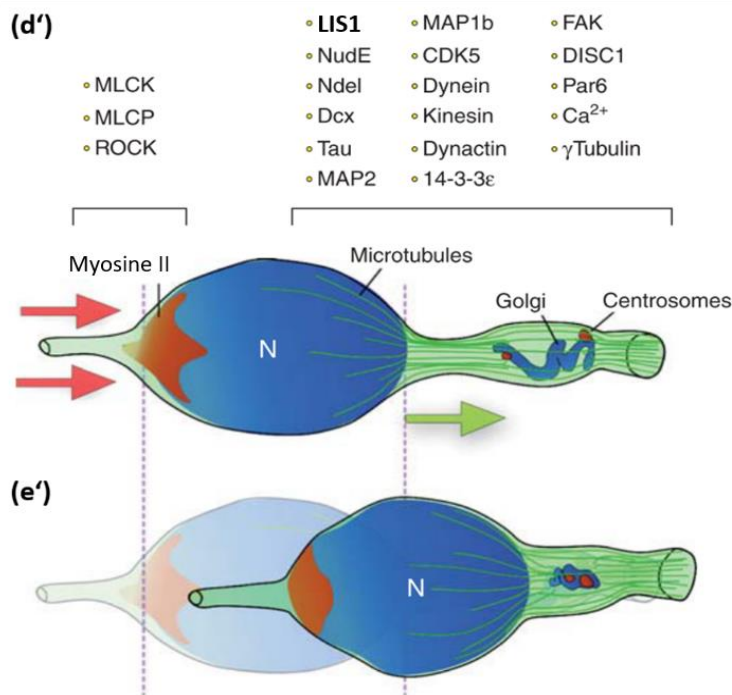
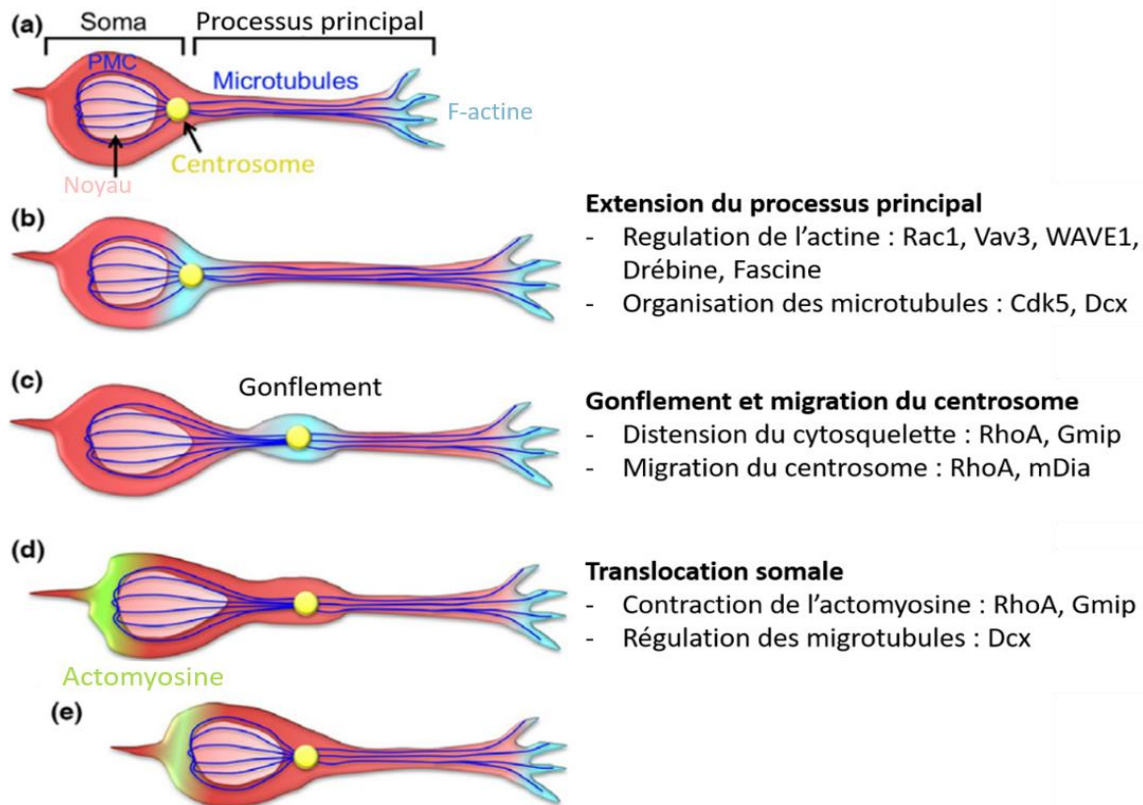
généralement dirigé vers l'extrémité du processus principal et l'extrémité arrière du neurone, et le pôle - vers le centrosome, à l'avant du noyau donc (Barbiero et al., 2019; Kengaku, 2018).



**Figure 11 : Représentation schématique d'un neurone cortical en migration.** Les neurones en migration adoptent une morphologie bipolaire. En avant se trouve le processus principal qui dirige la migration, avec à sa base le centrosome qui étend des microtubules jusqu'à la pointe du processus. Cette pointe est également riche en actine et protéines associées au cytosquelette d'actine. En arrière du centrosome se trouve le noyau, qui est flanqué de part et d'autre de microtubules associés à la dynéine, donnant un aspect ovoïde au corps cellulaire. L'extrémité arrière du neurone est également riche en actomyosine, nécessaire pour la nucléocinèse lors de la migration neuronale (*adaptée de Kengaku, 2018*).

Les neurones ayant cette morphologie bipolaire réalisent un mouvement particulier lors de la migration radiale, qualifié de « saltatoire » (Edmondson and Hatten, 1987), divisé en trois étapes (Kaneko et al., 2017, **Figure 12**). Le processus principal du neurone en migration va avancer, utilisant le cytosquelette d'actine au niveau d'une structure similaire au cône de croissance des axones pour s'étendre et réaliser des interactions par points d'adhésions focaux (Kerstein et al., 2015; Nadarajah and Parnavelas, 2002). Lors d'expériences de migration de neurones murins dans du Matrigel, une fois que le processus principal s'est suffisamment étendu, une distension du cytosquelette a lieu juste en distal du noyau entraînant une dilatation de la base du processus principal, accompagnée d'une migration du centrosome (Schaar and McConnell, 2005). Le noyau migre alors au sein de cet espace généré, entraînant avec lui le reste du corps cellulaire. Ce type de migration nucléaire est nommée « translocation somale » (*somal translocation*) ou « translocation nucléaire » (*nuclear translocation*) (Kengaku, 2018; Rakic, 1990; Sidman and Rakic, 1973).

La migration du processus principal et du soma sont indépendantes. Cette migration du noyau est dépendante de la dynéine, protéine motrice dirigée vers le pôle - des microtubules, qui va s'ancrer à l'enveloppe nucléaire et aux microtubules qui enferment le noyau (Tsai et al., 2007; Kengaku, 2018). LIS1, protéine régulatrice de la dynéine qui peut se fixer sur sa chaîne motrice est également nécessaire à la migration neuronale, des expériences d'interférence à l'ARN de la dynéine et de LIS1 bloque la nucléocinèse et la migration du centrosome (Tsai et al., 2007; Wynshaw-Boris and Gambello, 2001). La myosine non musculaire de type II est également impliquée dans la migration des neurones (Bellion et al., 2005; Schaar and McConnell, 2005). Elle se trouve notamment à l'extrémité distale du processus principal et à l'arrière du neurone. L'inhibition de la myosine II par blebbistatine stoppe la migration



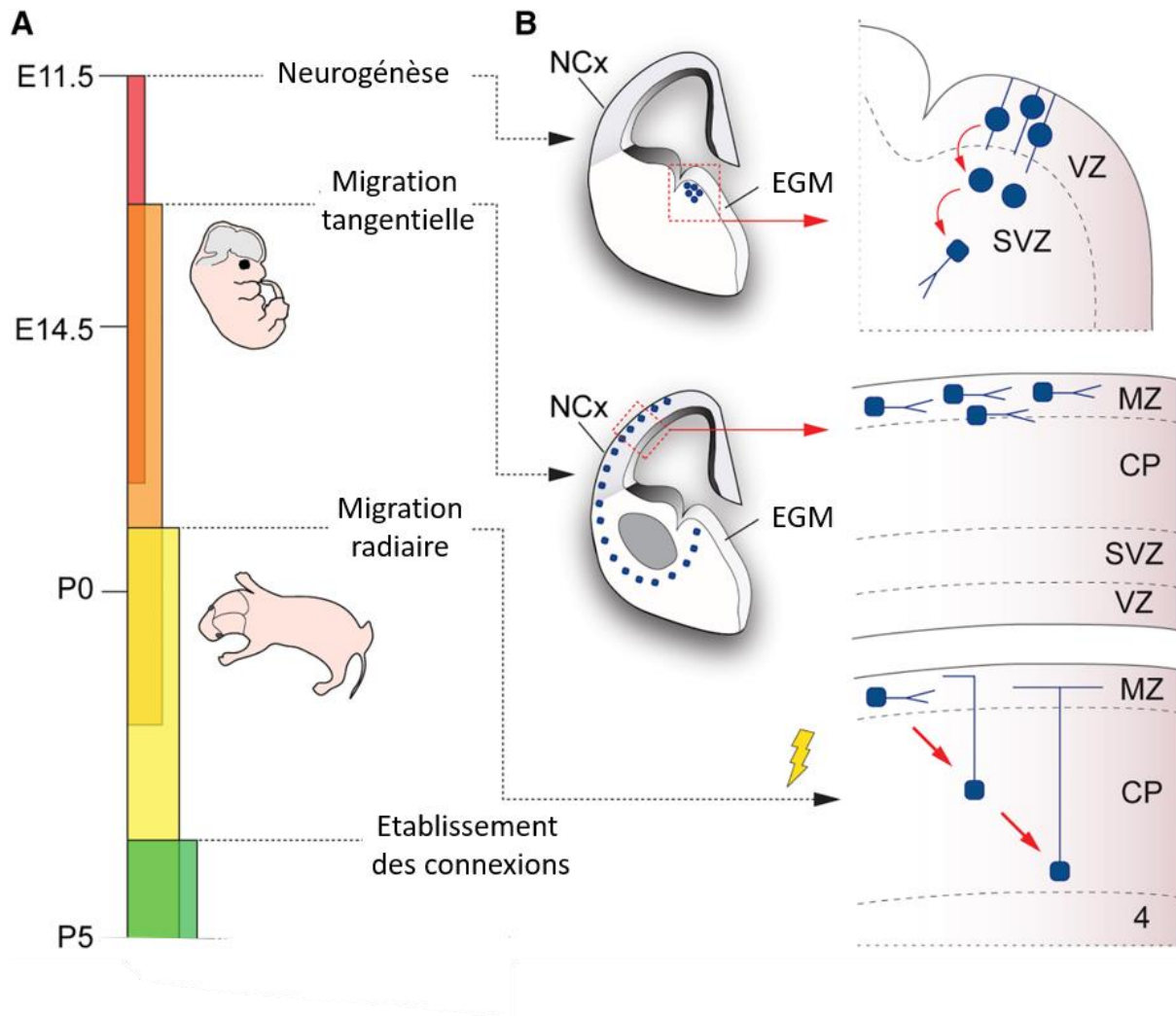
**Figure 12 : Mouvement saltatoire de la migration des neurones immatures : processus finement régulé par les microtubules et l'actomyosine.** L'extension du processus principal permet de déterminer la direction de la migration. Cette extension est dépendante d'une réorganisation de la F-actine et des microtubules (a, b). Un gonflement transitoire du processus principal a ensuite lieu et contient le centrosome (c). Ce processus est principalement dépendant de RhoA. Enfin, la translocation du noyau permet la migration de ce dernier au sein du renflement cytoplasmique et entraîne le reste du corps cellulaire avec lui. Cette dernière étape est permise d'une part par la dynéine qui grâce aux microtubules encerclant le noyau peut le faire migrer vers l'avant, et également des complexes de myosine II et actine (actomyosine) qui vont contracter le cortex cellulaire et pousser le noyau vers l'avant (d, e). De nombreuses protéines motrices et régulatrices sont impliquées dans la nucléocinèse (d', e'). PMC : cage périnucléaire de microtubule, N : noyau (Adaptée de Kaneko et al., 2017 ; Marín et al., 2010).

des neurones *in vitro* (Bellion et al., 2005; Schaar and McConnell, 2005) ou *in vivo* (Tsai et al., 2007), mais n'a pas d'effet sur la migration du centrosome, suggérant que la myosine II n'est impliquée que dans la migration du noyau. La myosine II permet de contracter le cytosquelette d'actine à l'arrière de la cellule, poussant le noyau vers l'avant avec l'aide de la dynéine, régulée par LIS1, et des microtubules (Bertipaglia et al., 2017; Schaar and McConnell, 2005; Tsai and Gleeson, 2005). Plus tard lors du développement (E12-E16 chez la souris), les neurones pyramidaux naissent avec une forme multipolaire et migrent jusqu'à l'IZ de manière non-dirigée et indépendante de la glie radiaire en émettant et rétractant de courts processus cellulaires. Certains de ces neurones peuvent réaliser des allers-retours au sein de la VZ avant d'atteindre l'IZ (Noctor et al., 2004). Arrivés dans l'IZ, ils passent d'une morphologie multipolaire à une morphologie bipolaire décrite plus tôt, et reprennent une migration radiale en direction de la CP en se servant des fibres de RG comme guide (Buchsbaum and Cappello, 2019; Tabata and Nakajima, 2003). Les mécanismes de migration décrits plus haut dans la migration des neurones bipolaire se retrouvent également dans les autres modes de migrations, comme la migration multipolaire.

Certaines pathologies sont suggérées comme étant liées à des perturbations de la migration neuronale, telles que la LIS ou l'hétérotopie en bande sous-corticale (Romero et al., 2018), étant associées à des mutations touchant des gènes impliqués dans ce cytosquelette. En effet, des perturbations de la migration des neurones peuvent entraîner une position ectopique de ces derniers, entraînant la présence de neurones n'ayant pas réussi à rejoindre la CP, et formant des agrégats de corps cellulaire au sein de la future substance blanche, appelés hétérotopies, ou alors des défauts de migration au sein de la CP impactant l'organisation des cellules au sein des différentes couches corticales. Ces perturbations peuvent être associées à des mutations des différents acteurs moléculaires impliqués dans la migration neuronale, tels que les différents isoformes de la tubuline, composant des microtubules, ou bien des protéines motrices de la migration et de leurs régulateurs et interacteurs. Par exemple, les mutations du gène *LIS1* peuvent entraîner une LIS, une malformation de l'organisation du cortex (désorganisation des couches corticales) qui apparaît alors lisse, sans circonvolutions. Plus d'information sur les pathologies associées aux défauts de migration neuronale, ainsi que sur les gènes impliqués, seront présentés dans le chapitre **3b-ii** de l'introduction.

Une autre population de neurones viendra coloniser le cortex lors du développement : les neurones inhibiteurs GABAergiques, ou interneurons (Markram et al., 2004). Contrairement aux neurones excitateurs, les neurones inhibiteurs ne sont pas générés dans le télencéphale dorsal, mais dans la région ventrale du télencéphale, dans les éminences ganglionnaires (Lim et al., 2018, **Figure 13**). La structure des zones germinales des éminences est assez similaire aux cortex dorsal, on y retrouve de la glie radiaire apicale et basale, dont les modes de fonctionnement sont assez semblables à leur homologues (Jones, 2009; Marín and Müller, 2014). Les neurones inhibiteurs, pour rejoindre le télencéphale dorsal, vont utiliser deux modes de migration : tout d'abord, les neurones vont migrer de

manière tangentielle des éminences ganglionnaires ventrales jusqu'au cortex, et vont le coloniser sur toute son épaisseur, puisque les interneurons sont présents partout dans le cortex, puis, comme leur équivalents excitateurs, vont utiliser les fibres des aRGs pour migrer de manière radiale et s'insérer dans le cortex (Faux et al., 2012; Tanaka et al., 2003).



**Figure 13 : Production, migration et maturation des neurones GABAergiques inhibiteurs chez la souris.** La production des neurones inhibiteurs se fait dans le télencéphale ventral, au niveau de l'éminence ganglionnaire médiale (MGE), par les cellules de glie radiaire résidentes. Ces neurones vont ensuite migrer de la MGE vers le télencéphale dorsal par migration tangentielle, et s'incorporer sur toute la surface du néocortex (NCx). Les neurones vont ensuite intégrer la CP par migration radiaire, puis développer leur connectome et débiter leur synaptogénèse (adaptée de (Lim et al., 2018)).

## 2) Glie radiaire basale : nouvel acteur indispensable du développement

Les bRGs sont un type de BP découvert au début des années 2010 chez l'homme (Hansen et al., 2010), puis dans de nombreuses espèces (Betizeau et al., 2013; Kelava et al., 2012; Sauerland et al., 2018; Wang et al., 2011). L'importance de ces cellules dans le développement normal du cortex fut très rapidement mise en avant. Ce sont les bRGs qui m'ont intéressé tout particulièrement lors de mon travail de doctorat. En effet, comme je l'avais mentionné dans la préface de l'introduction, très peu, voire pas d'information existe sur le rôle que tiennent les bRGs dans la pathogenèse des MCDs. Mon projet de doctorat a pour but d'apporter quelques éléments sur le lien entre la LIS et les bRGs. Donc, pour avoir une meilleure compréhension de ces cellules, leurs caractéristiques et les mécanismes régulant leur génération, avant de présenter mes résultats expérimentaux, je les présenterai dans cette section de l'introduction. La quasi-totalité des éléments qui seront présentés dans cette partie sont décrits dans une revue que j'ai rédigé en tant que premier auteur en collaboration avec Dr Fiona Francis, Dr Richard Belvindrah et Dr Julia Ladewig (Penisson et al., 2019). Cette revue reprend en détail les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des bRGs, leur identité transcriptionnelle et les mécanismes cellulaires et gènes impliqués dans leur genèse. Cette revue sera intégrée à ma thèse de doctorat dans les annexes.

### a) Caractéristiques des bRGs

Cette section servira d'introduction à la description des bRGs, basé sur le contenu de la revue Penisson et al., 2019, en décrivant les différentes espèces chez lesquelles ils sont présents dans le chapitre « Identification des bRGs dans différents modèles » (*page 144*), leur identité transcriptionnelle dans le chapitre « Profils d'expression génique » (*page 145*), leurs caractéristiques morphologiques dans le chapitre « Morphologie » (*page 146*) et enfin la description d'un processus cellulaire particulier aux bRGs, la translocation mitotique du soma (MST : *mitotic somal translocation*) dans le chapitre « Division des bRGs : translocation mitotique du soma » (*page 146*). Dans cette dernière section, il est noté que la MST est dirigée vers l'extrémité basale, mais elle peut également avoir lieu en direction du ventricule (Betizeau et al., 2013).

### b) Genèse, fonction et rôle des bRGs dans l'apparition des circonvolutions corticales

Cette section rentrera plus dans les détails des mécanismes cellulaires liés à la genèse des bRGs dans le chapitre « Mécanismes cellulaires importants pour la génération des bRGs : orientation du fuseau mitotique et adhésion cellulaire » (*page 146*) et ceux liés à la durée du cycle cellulaire dans le chapitre « Propriétés du cycle cellulaire des bRGs » (*page 146*). Enfin, je présenterai des aspects fonctionnels liés aux bRGs, tout d'abord en abordant le rôle de l'oSVZ, région où résident les bRGs, dans le chapitre « Genèse de l'oSVZ, composition cellulaire et fonction » (*page 147*), puis en évaluant le rôle des bRGs



dans l'apparition des circonvolutions à la surface du cortex cérébral dans le chapitre « Contribution de la prolifération des bRGs dans la formation des *gyri* et *sulci* » (*page 147*).

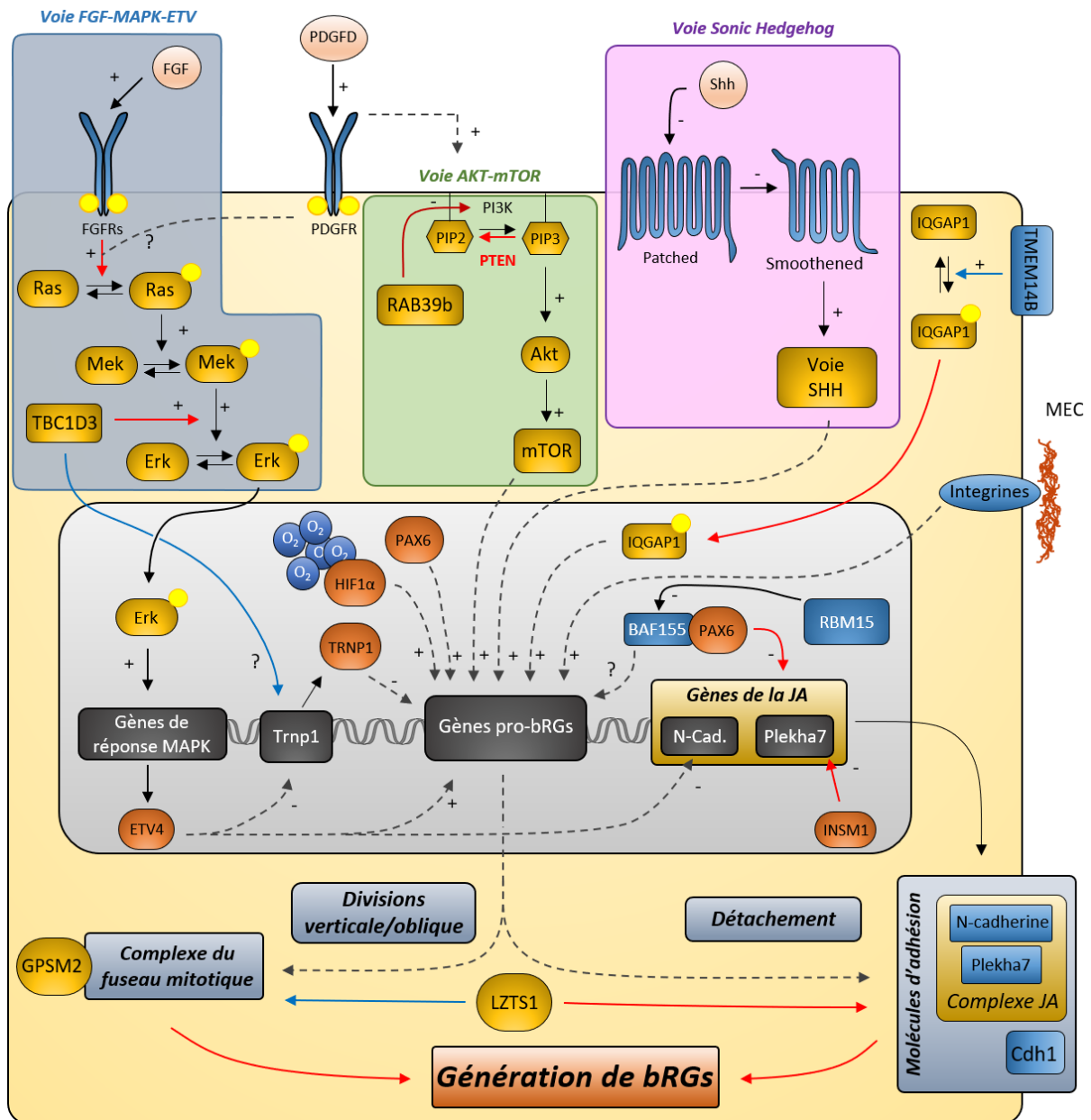
c) Mécanismes moléculaires associés à la genèse et l'amplification des bRGs, incluant les cellules bRG-like chez le rongeur

Depuis la découverte des bRGs, de nombreuses avancées ont été réalisées avec l'objectif d'élucider les mécanismes moléculaires responsables de la production et de l'amplification des bRGs (*Figure 14*). L'utilisation de tissu humain, fœtal ou organoïdes, de tissu venant du furet, ou encore l'enrichissement artificiel des bRGs chez la souris sont autant de méthodes qui ont été utilisés à ces fins. En effet, il est possible d'amplifier la population des bRGs chez la souris, qui est naturellement pauvre, par différentes méthodes expérimentales. Par soucis de clarté, j'appellerai par « bRGs » les cellules résidentes dans l'organisme concerné (bRGs humain ou bRGs de furet par exemple), et par « bRG-like » (cellules ressemblant aux bRGs) les cellules qui seront générés artificiellement par (sur)expression ou perte d'expression d'un gène d'intérêt. Cette appellation de bRG-like concernera donc surtout les cellules générées artificiellement par manipulation chez la souris.

Voici la liste des gènes et voies de signalisations traitées dans cette section :

Voies de signalisation induisant des bRGs	Références bibliographiques	Page
Voie FGF-MAPK	Heng et al., (2017); Matsumoto et al., (2017)	148
Voie PDGFD	Lui et al., (2014)	148
Voie PTEN/AKT	Liu et al., (2017a)	148
Hif1 $\alpha$	Wagenführ et al., (2015)	149
Voie Sonic HedgeHog (SHH)	Wang et al., (2016a); Shimada et al., (2019)	151
Pax6	Wong et al., (2015)	152

Sous-unités BAF170 et BAF155 du complexe mSWI/SNF	Tuoc et al., (2013, 2017); Narayanan et al., (2015); Zhao et al., (2016); Xie et al., (2019)	153
INSM1	Tavano et al., (2018)	154
GPSM2 (aussi appelé LGN) et la voie Notch-Delta	Shitamukai et al., (2011)	154
ASPM	Johnson et al., (2018)	154
TBC1D3	Ju et al., (2016)	155
TRNP1	Stahl et al., (2013)	155
CDH1	Martínez-Martínez et al., (2016)	155
TMEM14B	Liu et al., (2017a)	155
ARHGAP11B	Florio et al., (2015, 2016); Kalebic et al., (2018)	156
LZTS1	Kawaue et al., (2019)	32
RAB39b	Zhang et al., (2020)	32



**Figure 14 : Modèle putatif décrivant les voies de signalisations et autres gènes supposés comme étant impliqués dans la génération des bRGs.** Les voies de signalisations canoniques démontrées comme promouvant la production des bRGs incluent la voie FGF-MAPK, la voie du PDGFD, la voie PTEN/AKT/mTOR et la voie SHH. Des gènes humains/hominoïdes spécifiques décrits dans cette figure incluent TBC1D3, une protéine RABGAP qui promeut l'activation de la voie des MAPK et réprime TRNP1 et TMEM14B, une protéine transmembranaire qui stimule la translocation de IQGAP1 au noyau pour réguler la progression du cycle cellulaire. Les gènes ARHGAP11B et ASPM n'apparaissent pas ici car soit leurs fonctions n'ont pas encore été établies, soit ils ne s'insèrent de manière évidente dans ce modèle. JA : jonction adhérente, MEC : matrice extracellulaire, rond jaune : phosphate, flèche rouge : lien démontré expérimentalement, flèche bleue : par un mécanisme inconnu, flèche grise pointillée : lien spéculatif, flèche noire : lien par voie canonique. (Adaptée et mise à jour de Penisson et al., 2019).

Depuis la parution de la revue, quelques nouvelles études ont été publiées, décrivant de nouveaux acteurs moléculaires du développement des bRGs. Ces acteurs incluent LZTS1 (Kawaue et al., 2019), une protéine suppresseur de tumeur, et la protéine RAB39b (Zhang et al., 2020), impliquées toutes les deux dans la voie PI3K/PTEN/AKT/mTOR. Je continuerai donc ce chapitre en décrivant ces travaux.

Le gène *LZTS1* (*Leucine zipper tumor suppressor gene 1*) code pour une protéine ubiquitaire « glissière à leucine » de 67 kDa encodée sur le chromosome 8p22. Cette protéine régule négativement la transition G2/M du cycle cellulaire et interagit avec les microtubules et la protéine p34<sup>cdc2</sup> (Ishii et al., 1999). L'expression de *LZTS1* est réprimée dans de nombreux types de tumeurs (cancer de la prostate, cancer du sein, cancer de l'œsophage, cancer colorectal pour ne citer que ces types de cancers) (Ishii et al., 1999; Vecchione et al., 2007). La surexpression de *LZTS1* dans des cellules de cancer colorectal permet de diminuer leur capacité proliférative en inhibant la voie de signalisation AKT-mTOR (Zhou et al., 2015). Chez la souris, *Lzts1* est exprimé dans les IPs et les neurones, et dans une petite sous-population d'aRGs, suggérant un potentiel rôle de ce gène dans la voie de la neurogenèse et la délamination des neurones (Kawaue et al., 2019). Une nouvelle étude de 2019 a montré que *Lzts1* est exprimée au pôle apical, au niveau des jonctions adhérentes des cellules néoformées en voie de différenciation. L'électroporation *in utero* d'un shRNA à E13 induit une accumulation des cellules dans la VZ, et une perturbation de la différenciation des aRGs en IPs et des neurones néoformés, liée à un défaut de délamination. De manière opposée, la surexpression de *Lzts1* par électroporation *in utero* induit une délamination en masse des cellules électroporées, et générant ainsi de nombreuses cellules *Tbr2+* *Ki67+* et cellules *Sox2+* *Ki67+*, ces dernières ayant la morphologie de cellules bRG-like. Pour confirmer ces résultats, Kawaue et collègues ont surexprimé *Lzts1* chez le furet par électroporation *in utero* à E28, ce qui a produit un enrichissement de cellules *Sox2+* dans la SVZ. Les auteurs ont également cherché à étudier l'effet d'une perte de *Lzts1* en utilisant la technique CRISPR/Cas9, outil génétique récent permettant d'introduire une mutation, avec une précision d'une base azotée. Le système CRISPR/Cas9 (Doetschman and Georgieva, 2017; Hendel et al., 2015; Jinek et al., 2012), est un système de défense bactérien qui induit des cassures double brin dans l'ADN. Grâce à ces outils biomoléculaires, il est possible de cibler les cellules du cortex en développement, les NEs, les aRGs, les IPs, et donc de muter un gène d'intérêt. L'inactivation de *Lzts1* par cette méthode induit une diminution du nombre de bRGs *Hes+* *Hopx+*. Enfin, par analyse de données transcriptionnelles humaines, les auteurs ont montré que *LZTS1* est exprimé chez une sous-population des bRGs, suggérant encore une fois le rôle de ce gène dans la production des bRGs chez l'homme.

Associé à la génération de cellules bRG-like chez la souris, les aRGs se voient impactées par la surexpression de *Lzts1*, avec une rétractation du processus apical, et l'apparition d'un comportement similaire à la MST, allant au-delà de la zone d'INM, et qui est dépendant de la voie Rho-ROCK-actomyosine, voie qui régule la MST des bRGs (Ostrem et al., 2014; Penisson et al., 2019). Une analyse plus fine du pôle apical a pu montrer que *Lzts1* stimule la contraction de « l'anneau » de la jonction adhérente via le système de l'actomyosine, entraînant une scission du processus apical, une répression de l'expression de la N-Cadhérine aux jonctions adhérentes, ce qui permet la délamination des neurones et des bRG-like. De manière intéressante, l'électroporation *in utero* à de faibles concentrations permet de maintenir les aRGs ancrées à la surface ventriculaire, mais entraîne beaucoup plus de divisions avec

des angles de fuseau mitotique obliques. Ces résultats suggèrent que *Lzts1* promeut la génération de cellules bRGs en régulant l'orientation du fuseau mitotiques chez les aRGs et en régulant la capacité des cellules filles à délaminer de la surface ventriculaire.

Le gène *RAB39b* est un gène de risque associé au trouble du spectre autistique et code pour une protéine de la famille des GTPases de type Ras-like (Giannandrea et al., 2010). Situé dans la région Xq28, des pertes de fonction du gène sont associés à des macrocéphalies, des troubles du spectre autistique, des déficits intellectuels, de l'épilepsie et un syndrome de Parkinson précoce (Giannandrea et al., 2010; Wilson et al., 2014; Woodbury-Smith et al., 2017). Pour étudier le rôle de *RAB39b* dans le développement du cortex, Zhang et collègues ont généré un modèle KO de *Rab89b* par stratégie CRISPR/Cas9 (*Rab39b*<sup>-/-</sup>). Les mâles hémizygotes et les femelles hétérozygotes présentent un cerveau macrocéphalique et après tests comportementaux, développent des troubles de la mémoire sociale et de la mémoire motrice, mais pas de troubles de sociabilité ni de troubles de comportements répétés. Lors du développement cortical chez les mutants, une augmentation des proportions de cellules Pax6+ PH3+ et une diminution des cellules BrdU+ Ki67- furent observés, suggérant une augmentation du pool de progéniteurs et une diminution de la sortie du cycle cellulaire, donc une diminution de la différenciation. Dans cette étude, aucune mention n'est faite sur la production de bRG-like chez la souris, cependant, des organoïdes cérébraux WT et mutés pour *RAB39b* furent générés. Les résultats organoïdes suivent ceux générés chez la souris, une perte de *RAB39b* s'accompagne d'une augmentation du pool de progéniteurs avec un retard de différenciation, ce qui entraîne une augmentation de la production globale de neurones, et une augmentation de la taille des organoïdes. Associée à ceci, la proportion de cellules pS6+ SOX2+ (marqueurs de bRGs) est augmentée dans le cortex basal. Les auteurs montreront que *RAB39b* interagit avec p85 et p110, composants de la PI3K, et une perte de *RAB39b* induit une activation d'AKT, avec une augmentation des taux de p-AKT, ce qui suggère que *RAB39b* fonctionne normalement comme un inhibiteur de la voie PTEN-AKT-mTOR. Ceci sera ensuite confirmé par des expériences d'inhibition d'AKT, par l'expression d'un dominant négatif qui entraîne une diminution de la taille des organoïdes, ou par une approche pharmacologique qui diminue aussi la taille des organoïdes, mais entraîne également une diminution de la quantité de bRGs.

Ces résultats sont tout à fait cohérents avec les résultats présentés par Li et collègues (Li et al., 2017), qui ont montré que la perte de PTEN (enzyme antagoniste à la PI3K) entraîne une activation de la voie AKT, et une amplification de la production de bRGs. Dans les travaux de Zhang et al, c'est la perte d'un inhibiteur de la PI3K qui entraîne l'activation de la voie. De manière intéressante, des organoïdes murins mutants pour PTEN, bien qu'étant plus gros, ne génère pas de replis, à l'instar des organoïdes humains. L'étude sur *RAB39b* ne mentionne pas l'existence d'une augmentation des bRG-like chez la souris dans les mutants *Rab39b*, on peut donc imaginer que la perte de *RAB39b* chez la souris ne permet pas de produire des bRGs. Ces deux travaux permettent véritablement de mettre en exergue le rôle prépondérant de la voie AKT-mTOR dans la production des bRGs, potentiellement de manière

spécifique chez l'homme, ce qui suggère que pour produire des bRGs, la voie AKT-mTOR aurait besoin d'un contexte transcriptionnel et cellulaire particulier, présent chez l'homme, mais pas chez la souris.

#### d) Organoïdes cérébraux : un modèle humain *in vitro* émergent pour étudier les bRGs

Les organoïdes cérébraux présentent un modèle *ex vivo* d'étude puissant, permettant d'approcher le développement cortical chez l'homme en contournant la barrière technique et éthique de l'étude du cerveau embryonnaire humain. Un autre avantage est la capacité de pouvoir générer des organoïdes à partir des cellules sanguines ou fibroblastes de patients atteints de différents types de pathologie (particulièrement intéressant pour l'étude du développement du cortex dans un contexte de trouble du spectre autistique, puisque les manifestations cliniques arrivent bien après le développement périnatal). Plus d'informations sont présentés dans l'annexe 1 (*page 156*).

#### e) bRGs et pathologie

Bien que peu soit connu sur l'implication des bRGs dans la pathogénèse des MCDs, certaines études permettent d'émettre quelques hypothèses. Les notions d'aRGs ectopique, de maintenance du pool de progéniteurs, et de surcroît, avec l'étude des bRGs à l'esprit, sont abordées en détail dans l'annexe 1 (*page 157*).

### 3) Généralités sur les malformations du développement cortical

Le développement du cortex cérébral, comme nous l'avons vu dans les deux sections précédentes, suit des processus précis et finement régulés. L'existence de troubles du développement, induits par des mutations de gènes ayant des rôles fondamentaux lors de la corticogenèse, soit par mutations ponctuelles, répétitions de doublet/triplets de bases nucléiques ou par altérations chromosomiques (délétions/duplications de segments chromosomiques ou aneuploïdie), ou par d'autres phénomènes environnementaux (infections virales et/ou bactériennes, consommations de drogues ou toxines tératogènes lors de la grossesse), n'est alors pas surprenante. Les MCDs peuvent prendre des phénotypes divers, associés par deux types de symptômes les plus couramment observés : l'apparition de crises d'épilepsie et l'instauration d'un état de mal épileptique (*status epilepticus*), et des retards mentaux, appelés également déficits intellectuels. La notion des MCDs et des différents types de pathologies associées, restent des concepts relativement récents datant des années 90 (Barkovich et al., 1996). La neurologie, branche de la médecine traitant des affections du système nerveux, a été révolutionnée par

l'apparition de la neuroimagerie moderne, et a permis l'établissement de diagnostics précis des MCDs du vivant des patients, donc sans avoir recours à l'autopsie (Edelman, 2014).

Dans cette section de l'introduction de ma thèse de doctorat, je présenterai donc un historique de l'étude des MCDs, avec les personnes et techniques ayant permis des progrès majeurs dans leur découverte et compréhension, en me concentrant sur le développement de la technique d'IRM. Puis, je ferai une présentation des différents types de MCDs, en abordant leurs phénotypes caractéristiques, les gènes et les mécanismes qui leur sont liés. Comme mentionné plus tôt dans l'introduction, une pathologie du développement cortical m'intéresse tout particulièrement, la LIS. L'idée ici est donc de présenter les bases des MCDs et de comprendre les phénomènes tissulaires généraux et les ensembles de gènes impliqués dans les MCDs, avant de me focaliser plus précisément sur la LIS dans la section 4.

#### a) Histoire de l'étude des MCDs : de la naissance de la neuroscience moderne à l'imagerie médicale par IRM

Les MCDs sont un large spectre de troubles du développement du cortex cérébral qui peuvent induire des crises d'épilepsie et/ou des déficits intellectuels. Ces deux troubles du SNC sont connus depuis l'antiquité (Biasini et al., 1999; Kinnier Wilson and Reynolds, 1990). Pour pouvoir aborder en détail les différents types de manifestation phénotypiques et cliniques des MCDs, il me semble pertinent de retracer l'histoire de ces dernières, principalement en me focalisant sur les méthodes qui ont permis d'étudier le cerveau et le cortex. Le concept de malformation du cortex est pourtant recensé dans les documents historiques bien plus tard que les symptômes qui leur sont souvent associés. Je présenterai d'abord brièvement l'épilepsie et la notion de déficit intellectuel.

L'épilepsie est une maladie neurologique présentant comme symptômes des confusions mentales ou des absences, des mouvements saccadés et des crises. On parle d'épilepsie lorsque le patient présente deux crises non provoquées (ou réflexes) avec moins de 24 heures d'écart, une crise non-provoquée avec une probabilité de rechute de 60% après deux crises sur une période de 10 ans, ou si le patient est diagnostiqué pour un syndrome épileptique (Fisher et al., 2014). Une crise d'épilepsie est un événement « discret » au sens mathématique, elle a un début et une fin définie. La transition d'un cerveau sain à celui produisant une crise d'épilepsie suit vraisemblablement une perte d'équilibre entre les signaux excitateurs et inhibiteurs, entraînant une activité neuronale excessive et synchrone qui va interrompre les processus normaux du cerveau (Fisher et al., 2005). Cette hyperactivation neuronale peut être focale, englobant des zones plus ou moins vastes du cerveau, ou généralisées, et peut impliquer des régions corticales ou des noyaux sous-corticaux, et peut impliquer à la fois une sur-mobilisation des neurones excitateurs ou des neurones inhibiteurs (Barker-Haliski and Steve White, 2015; Cope et al., 2009). Les causes de l'épilepsie en générales restent obscures, même si diverses pistes sont envisagées (Delanty et

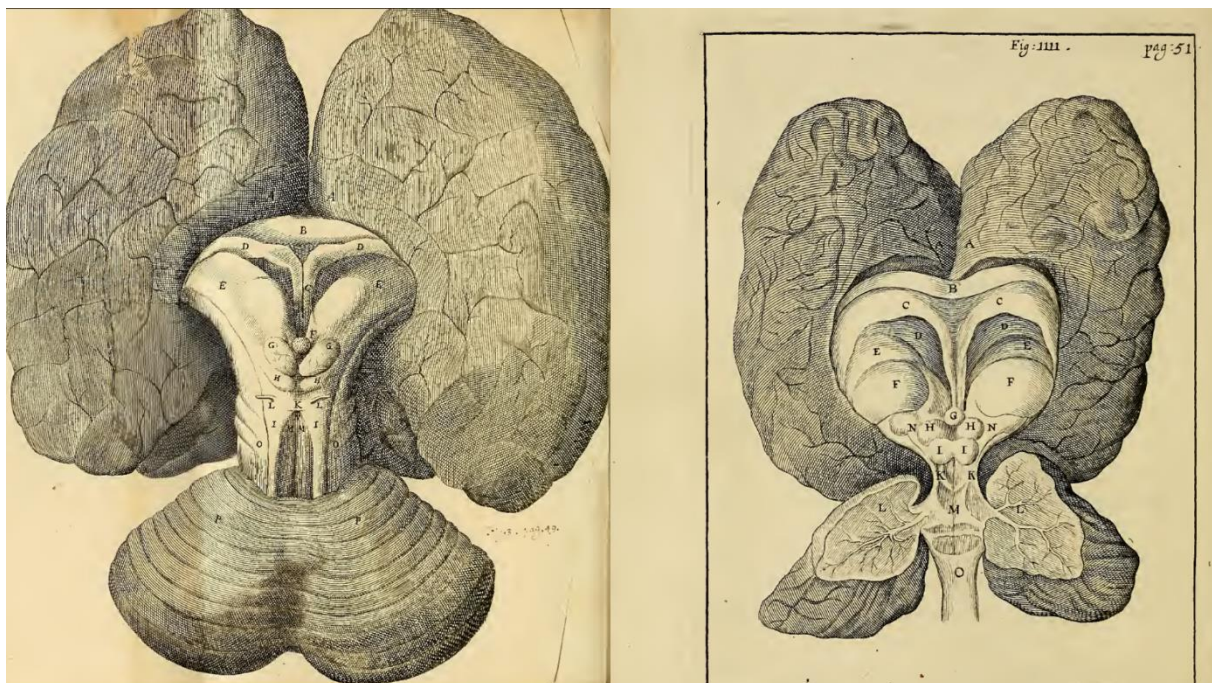
al., 1998), telles que les lésions (Lucke-Wold et al., 2015), la consommation de drogues telles que les antidépresseurs et les stimulants (cocaïnes et anabolisants, entre autres (Chen et al., 2016; Olson et al., 1993)) et l'hérédité. De nombreux gènes candidats ont été révélés avec la révolution de l'analyse génomique en médecine, et les premiers à être mis en avant furent les gènes codant pour les canaux ioniques (Perucca and Perucca, 2019; Turnbull et al., 2005). En effet, des mutations sur tous les types de canaux, tels que les canaux sodiques (Escayg et al., 2000), les canaux calciques (Heron et al., 2004), les canaux potassiques (Niday and Tzingounis, 2018) sont associées à différents types d'épilepsies. Grâce à ces découvertes, et grâce à l'utilisation de modèles animaux, les mécanismes moléculaires entraînant ces altérations de la transmission des influx nerveux liées à ces mutations dans les gènes codant pour les canaux ioniques ont pu être étudiées (Wong and Roper, 2016).

Les déficits intellectuels, appelés par le passé retards mentaux, représentent une véritable énigme pour le corps médical, tant poser une définition et ou une classification cohérente semble impossible. Ils sont définis comme une « condition présente toute la vie de l'individu, induisant des troubles du développement cognitif et adaptatif qui sont liés à des structures ou fonctions cérébrales anormales » (Shea, 2012). Le manuel de diagnostic et de statistique des troubles mentaux (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) définit en premier lieu un patient atteint de déficit mental comme ayant moins de 70 de quotient intellectuel (QI) en considérant une moyenne de 100 et un écart-type de 15 pour le quotient intellectuel (Armatas, 2009; Shea, 2012), avec différents degrés de sévérités en fonction du nombre d'écart-types d'écart avec la moyenne. Bien entendu, le QI ne prend pas en compte toutes les capacités adaptatives et sociales. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime entre 0.5% à 2.5% la prévalence du déficit intellectuel dans les pays développés, et à 4.8% dans les pays en développement (Maris et al., 2013). Les causes peuvent être génétiques et environnementales et peuvent prendre effet dans les périodes prénatales, périnatales et postnatales (Baird and Sadovnick, 1985; Shea, 2012). Parmi les causes prénatales, on note bien évidemment les mutations génétiques qui représentent la principale cause de déficits intellectuels (Finucane et al., 2003) et au sein de ces mutations ou altérations génétiques, le syndrome de Down (Wajuihian, 2016) et le syndrome de l'X fragile (Lozano et al., 2014) sont les plus fréquents. Les autres causes de déficits intellectuels prénataux sont les infections et la consommation de drogues. Les cas de déficits mentaux peuvent se retrouver chez plusieurs membres de la même famille, on parle alors de retards mentaux familiaux et un des exemples courant est le syndrome de l'X fragile (Lozano et al., 2014).

L'importance du cortex cérébral dans les fonctions du système nerveux, et donc dans les MCDs fut suggérée lors du XVII<sup>ème</sup> siècle par Thomas Willis (1621-1675) (Caron, 2015; Molnár, 2004). D'aucuns le considèrent comme le père de la neuroscience moderne, médecin praticien et scientifique émérite lors de la révolution de la médecine durant laquelle se verra démocratisée l'autopsie et l'analyse post-mortem des corps et organes, ce qui permettra une mise à niveau de tous les ouvrages de médecine, autrefois encadrée et limitée par le dogme religieux. En effet, dans son ouvrage *Cerebri Anatome : cui*



*accessit nervorum descriptio et usus* datant de 1663 (consultable numériquement à l'adresse web <https://archive.org/stream/cerebrianatomecu00will#page/n8/mode/1up>), on retrouve de sublimes illustrations de cerveaux et des nerfs crâniens (Scatliff and Johnston, 2014). Cette œuvre fut fondamentale, car c'est dans celle-ci que l'on trouve pour la première fois les notions de systèmes nerveux central, périphérique et autonome. C'est aussi la première fois que sera mentionnée l'importance du cortex cérébral dans les fonctions du cerveau, contrairement à la vision de Galen jusqu'alors en place qui proposait que l'intellect venait des ventricules et du liquide céphalo-rachidien (Molnár, 2004). Willis notera dans *Cerebri Anatome* la différence de taille du cortex et la taille et le nombre des circonvolutions entre l'homme et d'autres animaux (aux pages n71 et n75 de la numérisation, on peut trouver des illustrations de cerveaux d'homme et de mouton respectivement, montrant bien la différence de taille du cortex). Mais outre le fait que Willis permit de poser les bases de la neuroscience moderne, il fut un médecin précurseur, reliant pour la première fois des caractères comportementaux des patients qu'il suivait depuis plusieurs années aux aspects morphologiques de leurs cerveaux après leur mort : aux pages n99 et n103, on peut voir des illustrations d'un cerveau sain et d'un cerveau d'un patient atteint « d'idiotie congénitale » (Scatliff and Johnston, 2014; **Figure 15**).



**Figure 15 : Illustration de cerveau normal à gauche et d'un patient atteint d'idiotie congénitale, dessinés par Thomas Willis dans *Cerebri Anatome*. Les deux dessins ne sont pas à la même échelle, mais on peut voir une différence flagrante dans la taille et la forme des hémisphères cérébraux. Il est donc possible que le patient soit atteint de microcéphalie.**

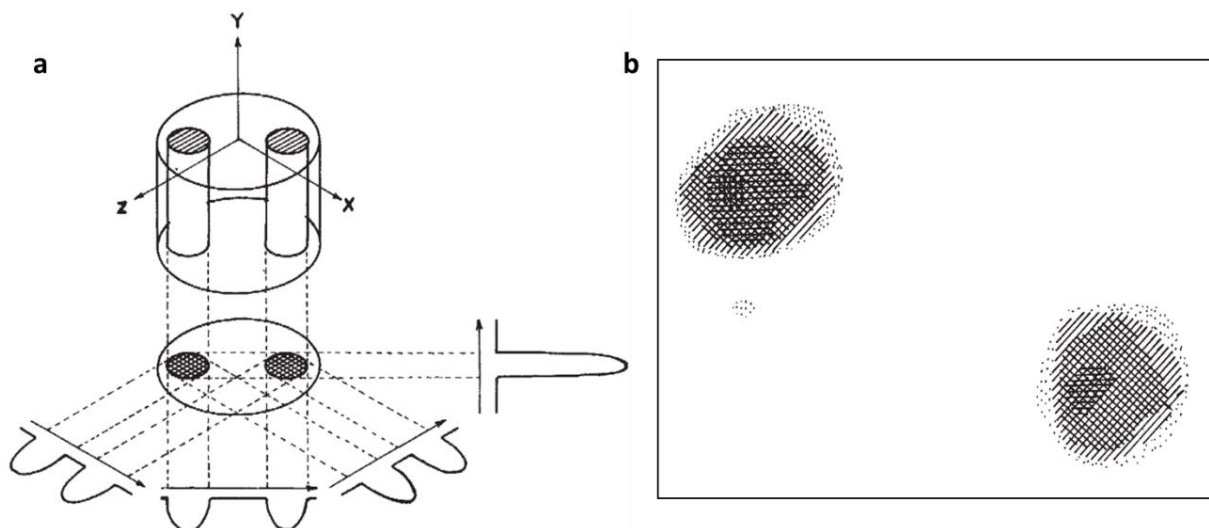
Pour la première fois de l'histoire, des troubles cognitifs furent corrélés à des altérations de la structure du cerveau et du cortex. S'en suivirent de nouvelles descriptions de pathologies et de malformations tout au long du XIXème siècle, comme l'association de l'épilepsie avec des malformations corticales (Francis et al., 2006). Mais un problème majeur demeurait pour la médecine : l'incapacité d'observer les organes internes sans l'utilisation de chirurgie exploratoire ou de l'autopsie.

Ceci changea avec la découverte des effets des rayons X sur le corps, et donc les prémices de l'imagerie médicale. Les rayons X furent découverts à la fin des années 1890 par un professeur de physique Allemand, Wilhelm Conrad Röntgen (Hessenbruch, 2002), et leur capacité à traverser les tissus mous et ne pas traverser les os, permettant la production de clichés du squelette des personnes exposées, intéressa la communauté médicale très rapidement (Abdallah, 2017). Röntgen obtiendra le prix Nobel de physique pour cette découverte. Une des premières, si ce n'est la première observation du cerveau par imagerie médicale, fut produite par tomodensitométrie (autrement appelé CT-scan) (Wijdicks, 2018). Les premiers clichés de patients vivants atteints de pathologies congénitales et de défauts de développement du cortex (telles que la LIS, la polymicrogyrie, l'agyrie, la microcéphalie et macrocéphalie, et d'autres régions du SNC), seront réalisés grâce au CT-scan. Mais s'il y a bien une méthode d'imagerie médicale qui a révolutionné les neurosciences et la neurologie, c'est l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM).

L'IRM décrit la réponse de noyaux d'atomes, qui possèdent une rotation intrinsèque définie par un axe et une intensité de rotation, appelé moment magnétique ou *spin*, lorsque placés dans un champ électromagnétique (McPhee et al., 2015; Vazquez and Misra, 2019). La mesure de cette réponse se fait très généralement sur des noyaux d'hydrogène (protons). On peut imposer une orientation de l'axe de rotation des noyaux en les soumettant à un champ magnétique orienté, ce qui va aligner le *spin* des atomes d'un système dans la même orientation que le champ. Ce champ magnétique est le plus souvent généré par l'utilisation d'un système d'aimant géant extrêmement puissant, un appareil d'imagerie IRM de routine peut générer un champ d'une intensité de 3 Tesla (3T), qui représente environ 60 000 fois l'intensité du champ magnétique terrestre. Une perturbation via une onde de radiofréquence (RF, ondes électromagnétiques de fréquence comprise entre 10 kHz et 1 GHz) va perturber le *spin* des atomes et les orienter de manière orthogonale à l'axe du champ magnétique. Lorsque la source de l'onde RF sera éteinte, la perturbation sera terminée, et les noyaux vont voir leur *spin* se réaligner avec l'orientation du champ magnétique lors d'un phénomène appelé « relaxation ». C'est la durée de cette relaxation qui est mesurée par les appareils de mesure de résonance magnétique nucléaire et qui permet d'obtenir des informations sur la qualité des atomes composant le système, et donc de produire des images, le plus souvent à but médical de nos jours. En fonction de l'axe du repère orthonormé dans lequel se situent les protons, on peut mesurer différents temps de relaxations, la relaxation T1 ou la relaxation T2 par exemple, et générer des images à partir des données T1 et T2 donnera des résultats avec des contrastes différents, permettant de mieux apprécier les caractéristiques du tissu, et ce, dans n'importe quel plan de l'espace. Tout ceci permet une visualisation des tissus internes avec une précision extrêmement efficace, et donc, par extension, la détection de troubles ou structures anormales. La différence fondamentale avec toutes les variantes de l'étude de l'absorption des rayons-X et l'imagerie basée sur la résonance magnétique nucléaire est que cette dernière est non-invasive et ne dépend pas de l'utilisation de rayonnements ionisants, un avantage non négligeable qui a permis à l'IRM de se

démocratiser très rapidement, et de devenir la méthode principale d'imagerie médicale en neurologie. Les principes fondamentaux et pratiques de l'IRM sont abordés plus en détails dans Vazquez & Misra, 2019.

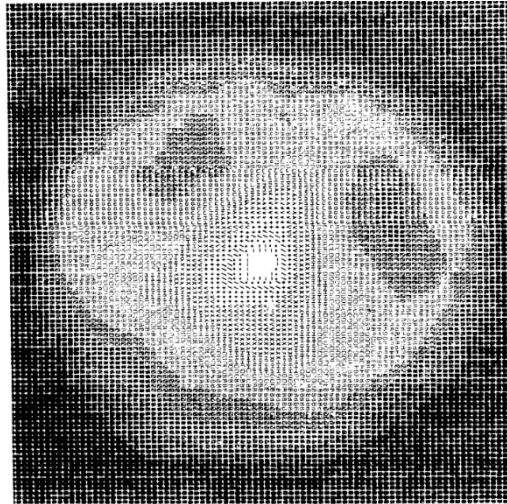
L'évènement fondamental qui inscrira la résonance magnétique comme outil exceptionnel permettant de générer les images que l'on connaît aujourd'hui arrivera en 1973 grâce à Paul Lauterbur qui générera pour la première fois une image en 2D à partir de signaux de résonance magnétique nucléaire (Lauterbur, 1973), et quelques années plus tard à Peter Mansfield qui perfectionnera la technique. Tous deux obtiendront le prix Nobel de physiologie de 2003 pour ces travaux (Boesch, 2004). Lauterbur, dans sa publication de 1973, utilisa la mesure de la relaxation des protons dans des capillaires de verre contenant soit de l'eau pure, soit de l'eau contenant des ions  $Mn^{2+}$  paramagnétiques, et pu reconstruire différentes images en fonction des paramètres de l'appareil, notamment la fréquence des ondes RFs. Il nommera ces images des zeugmatogrammes (**Figure 16**). On peut y voir que la résonance magnétique varie en fonction des milieux, et que l'image générée montre que le système permet de discriminer deux milieux en fonctions de leurs caractéristiques magnétiques (Lauterbur, 1973).



**Figure 16 : Première image générée par l'analyse de signaux de résonance magnétique nucléaire.** A) Représentation schématique d'une projection en deux dimensions XZ à partir d'un objet en trois dimensions XYZ, et de quatre projections en une dimension d'un objet en deux dimensions. Représente grossièrement la façon dont le signal de résonance est acquis et traité par le système de détection. B) Image de deux capillaires de verre contenant soit de l'eau pure, soit de l'eau contenant des ions  $Mn^{2+}$  paramagnétiques générés à partir de signaux de résonance magnétique des protons contenus dans les capillaires (*adaptée à partir de Lauterbur, 1973*).

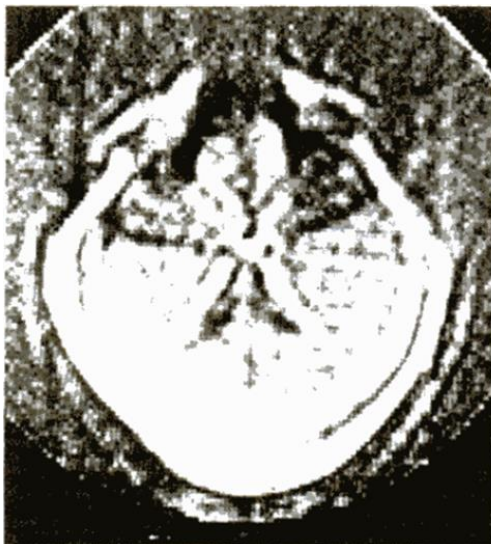
Preuve de son avant-gardisme, il note à la fin de son article princeps que : « *l'application de cette technique à l'étude d'objets non homogènes divers, pas nécessairement restreints à la taille de ceux communément étudiés par spectroscopie par résonance magnétique est à anticiper* » (Lauterbur, 1973). Il ne faudra qu'un an pour qu'il publie une nouvelle étude avec des images d'objets biologiques tels que la distribution de l'eau dans une branche de pin, la distribution d'huile dans une noix de pécan, ou enfin, la cavité thoracique d'une souris vivante (Lauterbur, 1974; **Figure 17**). S'en est suivi, notamment grâce à Mansfield, Lauterbur, Damadian et autres, une course à la publication des premiers

clichés humains, avec comme première étape, le doigt d'un des étudiants de Mansfield, puis les scans d'autres parties du corps humain (images de la cavité thoracique) (Mansfield and Maudsley, 1977; Mansfield and Pykett, 1978). La première image d'un cerveau fut publiée en 1977 par l'équipe du docteur Hugh Clow, mais une image produite par Mansfield l'année suivante sera de bien meilleure qualité, au point de pouvoir très nettement distinguer les différences entre la substance grise dessinant les circonvolutions du cortex cérébral et les noyaux sous-corticaux, et la substance blanche, grâce à la capacité de la résonance magnétique nucléaire de détecter l'hétérogénéité d'un tissu (Mansfield and Pykett, 1978; *Figure 18*).

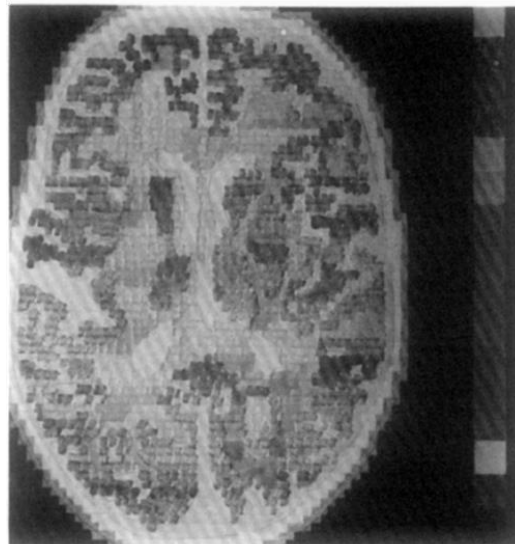


**Figure 18 : Zeugmatogramme de résonance magnétique nucléaire de protons de la cavité thoracique d'une souris vivante.** Premier cliché IRM d'un animal vivant. Le plan capté par la bobine réceptrice passe à travers des poumons, perpendiculairement à l'axe longitudinal du corps et l'image est similaire à une image générée par section transversale (Lauterbur, 1974).

**a**



**b**



**Figure 17 : Images de cerveaux prises par IRM à la fin des années 1970.** A gauche se trouve la première image IRM de la tête prise de l'Histoire (a). La légende lit : « Section au travers de la tête du Dr Hugh Clow du Laboratoire de Recherche Central de l'EMI, imagé par résonance magnétique nucléaire (New Scientist, 23 Novembre 1977). Les orbites et globes oculaires (en haut de l'image) ainsi que les ventricules (en dessous du centre de l'image, à gauche et à droite) sont clairement visibles ». A droite se trouve une IRM de cerveau prise par Mansfield et collègues en 1978 (b). On peut clairement discerner la matière grise corticale, formant les circonvolutions, et les noyaux corticaux, de la matière blanche (Mansfield and Pykett, 1978).

Les années 1980 furent riches en publication portant sur l'application de l'IRM au système nerveux, et ont permis à la neurologie de se transfigurer : des études montrant de meilleurs clichés de cerveaux normaux, des clichés de cerveaux ayant subi des lésions liés la radiothérapie (Dooms et al., 1986), des contusions (Hesselink et al., 1988), des abcès (Haimès et al., 1989)... C'est également à cette époque que les premiers clichés IRM de pathologies congénitales qui seront plus tard qualifiées du terme de MCDs seront effectués (Barkovich et al., 1987). Dans une étude de 1987, Dr A. James Barkovich publiera une étude proposant de nombreuses IRM de pathologies diverses de patients atteints de LIS, polymicrogyries, pachygyries et hétérotopies précédemment diagnostiquées par CT-scan et échographie. Il montrera que l'IRM est bien plus sensible pour parvenir à un diagnostic de ces pathologies grâce à sa capacité remarquable de discriminer la substance grise de la substance blanche, permettant une analyse plus fine du cortex cérébral et de la structure de la matière grise, et donc de mieux pouvoir caractériser l'aspect du cortex cérébral, et la présence ou non de noyaux gris ectopiques.

En parallèle à l'utilisation de l'IRM chez l'adulte, l'imagerie fœtale a également permis à l'IRM d'établir des diagnostics autrement impossibles à poser. L'IRM fœtale a débuté dans les années 1980 (Johnson et al., 1984), en conjonction avec l'imagerie par ultrasons (échographie), une technique de routine à bas coûts, et a permis de faire énormément de progrès sur l'étude du développement du SNC (Saleem, 2014). Tout comme pour l'adulte, une vague de publications sur les troubles du système nerveux chez le fœtus a permis d'établir une base pour l'établissement de diagnostics de diverses pathologies, telles que des troubles du développement du corps calleux, du cervelet, des hémorragies intraventriculaires et des MCDs (Levine, 2002; Sonigo et al., 1998). De plus, l'analyse caryotypique et chromosomique, ainsi que l'avènement du séquençage, permettra de lier les MCDs à de nombreux gènes, comme *LIS1*, *DCX*, *TUBA1A*, *ASPM*, *KIF1A* (Romero et al., 2018) et anomalies chromosomiques comme le syndrome de Miller-Dieker (Stratton et al., 1984), syndrome de l'X fragile, la trisomie 21 et les troubles associées aux anomalies de formation du tube neural (Greene and Copp, 2014).

Les techniques d'imagerie ont permis des avancées fondamentales dans l'établissement des diagnostics et la description clinique des MCDs. Cependant, l'imagerie seule ne permet pas souvent, si ce n'est pas du tout, d'évaluer les mécanismes causant ces malformations. L'utilisation en parallèle de la souris de laboratoire *Mus musculus* pour modéliser les maladies a permis de répondre à ce problème. En effet, malgré les différences fondamentales entre un être humain et une souris, le rongeur est un modèle très puissant pour étudier différents processus physiologiques ou pathologiques humains (Perlman, 2016). De plus, la souris a des paramètres qui la rendent particulièrement compatible avec la recherche des pathologies du SNC, comme sa durée de vie, sa durée de gestation de trois semaines, sa fécondité, l'efficacité de reproduction et la capacité à avoir des lignées stables (Gurumurthy and Kent Lloyd, 2019). Une des plus célèbres souris mutantes, et la première souris découverte ayant une mutation spontanée affectant le développement du cortex cérébral est la souris *reeler*, dont la première caractérisation date de 1951 (Falconer, 1951; Katsuyama and Terashima, 2009; Lambert de Rouvroit

and Goffinet, 1998). Parmi les autres souris mutantes spontanées liées à l'étude du fonctionnement du système nerveux, on peut noter la souris *Wld<sup>S</sup>* (*Walerian degeneration slow*), qui présente une résistance à la dégénérescence axonale après axotomie, montrant l'importance de l'action axo-protectrice du NAD<sup>+</sup> (Coleman and Freeman, 2010; Lunn et al., 1989), la souris *Lag* (*laggard*) muté pour la protéine motrice *Kif14* qui se présentent avec une ataxie cérébelleuse, des troubles de l'organisation du cortex cérébral et une réduction de la taille de la tête (Fujikura et al., 2013), ou encore la souris *HeCo*, mutée pour *Eml1*, protéine associée aux microtubules, et qui présente un phénotype d'hétérotopie très semblable à la maladie humaine (Croquelois et al., 2009; Kielar et al., 2014).

Une nouvelle transition sur l'étude des MCDs a été franchie quand les capacités de séquençages ont permis d'étudier les mutations des patients (Romero et al., 2018), ainsi que quand les génomes de l'être humain (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001) et de la souris (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002) furent publiés, et enfin que les premier outils de mutagénèse (dirigée ou non) furent adaptés à la souris (Doyle et al., 2012; Gurusurthy and Kent Lloyd, 2019). Ainsi furent développés des centaines et des centaines de modèles de souris mutantes spécifiquement pour un ou plusieurs gènes d'intérêts, de manière totale ou conditionnelle grâce à la recombinaison homologue des cellules souches embryonnaires (Babinet and Cohen-Tannoudji, 2001; Wang, 2000), à la transgénèse (Belizário et al., 2012; Burgio, 2018) et au système Cre-Lox (Kühn et al., 1995; Sauer, 1998). L'introduction de deux séquences LoxP de part et d'autre d'une séquence d'intérêt permet de la marquer comme cible pour la Cre-recombinase. L'expression de cette enzyme dans des cellules portant ces séquences LoxP entraînera l'excision des séquences. Il est possible d'induire l'expression de cette enzyme sous le contrôle d'un promoteur étant actif dans un type cellulaire particulier à un moment particulier (Feil et al., 2009). La force de ce système est donc qu'il est capable de restreindre l'expression de la Cre-recombinase de manière temporelle et/ou de manière spatiale. Le système CRISPR/Cas9 a également permis d'étudier de nombreux gènes impliqués dans les MCDs en introduisant des mutations présentes chez les patients humains dans le génome murin (Romero et al., 2018). Enfin, la mise au point de l'électroporation *in utero* a permis de donner les moyens de manipuler génétiquement les progéniteurs neuraux de manière temporelle et locale dans un contexte *in vivo* pour décortiquer les mécanismes moléculaires du développement cortical (Matsui et al., 2011).

Pour conclure, l'étude de cellules humaines *in vitro*, notamment via la plateforme des cellules souches pluripotentes induites (iPSCs : *induced pluripotent stem cells*) permet d'étudier les processus biocellulaires et biochimiques impliqués dans certaines pathologies, qu'il s'agisse de culture 2D ou 3D comme les corps embryoides (Brickman and Serup, 2017; Itskovitz-Eldor et al., 2000) ou des organoïdes cérébraux (Lancaster et al., 2013). Plus d'informations sur les organoïdes sont disponibles dans l'annexe (page 157).

## b) Description des différents types de MCDs

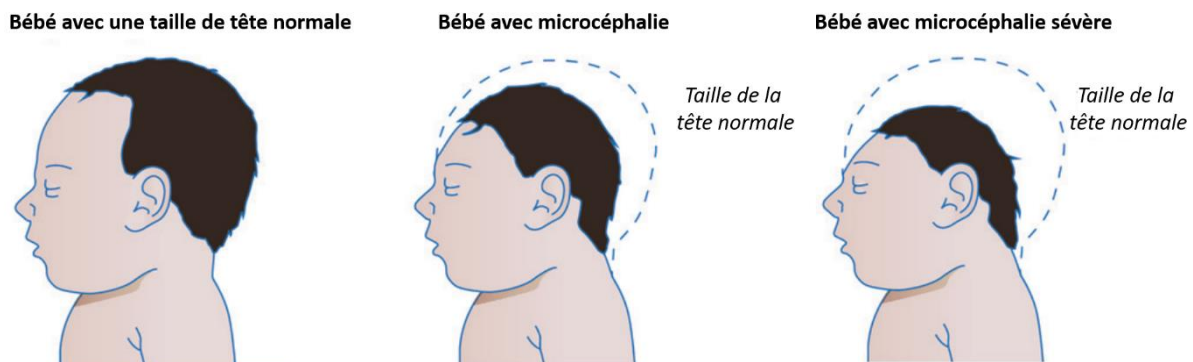
Le concept de « *Malformation of Cortical Development* » tel qu'on le connaît aujourd'hui apparaît pour la première fois dans la littérature en 1996 (Barkovich et al., 1996). James Barkovich, accompagné de William B. Dobyns, tous deux médecins praticiens qui apporteront beaucoup d'études de cas de MCDs, sera à l'avant-garde de l'étude des MCDs, proposant une revue qui pour la première fois tentera de classer les MCDs en trois grands groupes : les MCDs liées à des troubles de la prolifération cellulaire ou à l'apoptose, les MCDs liées à des troubles de la migration neuronale et les MCDs liées à des troubles d'organisation et post-migratoires. Les pathologies seront donc classées en fonction du moment, du *timing* de l'altération du développement normal du cortex, et font référence aux trois grandes étapes du développement cortical : de manière précoce si les mécanismes de prolifération des progéniteurs ou d'apoptose des cellules sont affectés pour le premier groupe, de manière intermédiaire si les mécanismes de migration des neurones (excitateur et inhibiteurs) sont affectés pour le second, et enfin de manière tardive si les mécanismes d'organisation et de maturation du tissu neural sont affectés. Cette revue aura énormément d'impact, car cette classification sera conservée jusqu'à aujourd'hui, mise à jour au fil des années (Barkovich et al., 1996, 2005, 2012).

Il est évident que classer une MCD de manière stricte dans un seul de ces groupes est beaucoup trop restrictif, comme nous le verrons plus bas, l'état de la recherche actuel nous laisse à penser que certaines des pathologies que j'introduirais présentent à la fois des troubles migratoires et des troubles de la prolifération. De plus en plus d'études de cas montrent que les MCDs ne se présentent pas de manière tranchée, avec qu'une seule classification clinique phénotypique (un patient présentant uniquement une LIS, ou une hétérotopie). Beaucoup de cas montrent une hétérogénéité dans leur présentation, associant plusieurs altérations (Guerrini and Dobyns, 2014). Cependant, cette classification permet néanmoins d'ordonner les MCDs dans 3 grands groupes dépendant chacun d'un mécanisme pathologique principal. J'emploierai donc le même système pour présenter les MCDs de manière ordonnée dans ma thèse de doctorat, en présentant la pathologie, sa présentation phénotypique et clinique, et les gènes qui sont associés. L'idée ici n'est pas de rentrer dans le moindre détail de chaque pathologie mais de présenter un panel de pathologies pour mieux appréhender les mécanismes cellulaires liés aux MCDs.

i) *MCDs liés à des troubles de prolifération ou d'apoptose*

- **Microcéphalies**

La microcéphalie est une MCD définie par une taille de la tête inférieure à 2, ou 3 écart-types de la moyenne selon l'âge, le sexe et l'origine, en fonction des définitions (Passemard et al., 2013). On parle de microcéphalie classique pour un écart de 2 écart-types, et de microcéphalie sévère pour écart de 3 écart-types (Nawathe et al., 2018; **Figure 19**, **Figure 20**). La microcéphalie peut se présenter à la naissance, on parle alors de microcéphalie congénitale, ou plus tard dans la vie de l'individu, on parle de microcéphalie acquise (Abuelo, 2007). Les microcéphalies acquises peuvent se déclencher à partir « d'agressions » intra-utérines, telles que l'hypoxie et autres incidents vasculaires, la consommation de tératogènes, ou le diabète maternel (Abuelo, 2007). Une cause récente de microcéphalie est la pandémie du virus Zika en 2015-2016, qui lorsque atteignant une femme enceinte, entraîne des perturbations du développement fœtal. L'infection entraîne une diminution de la prolifération et une augmentation de l'apoptose dans les neurones néoformés (de Araújo et al., 2018; Faizan et al., 2017; Mlakar et al., 2016).



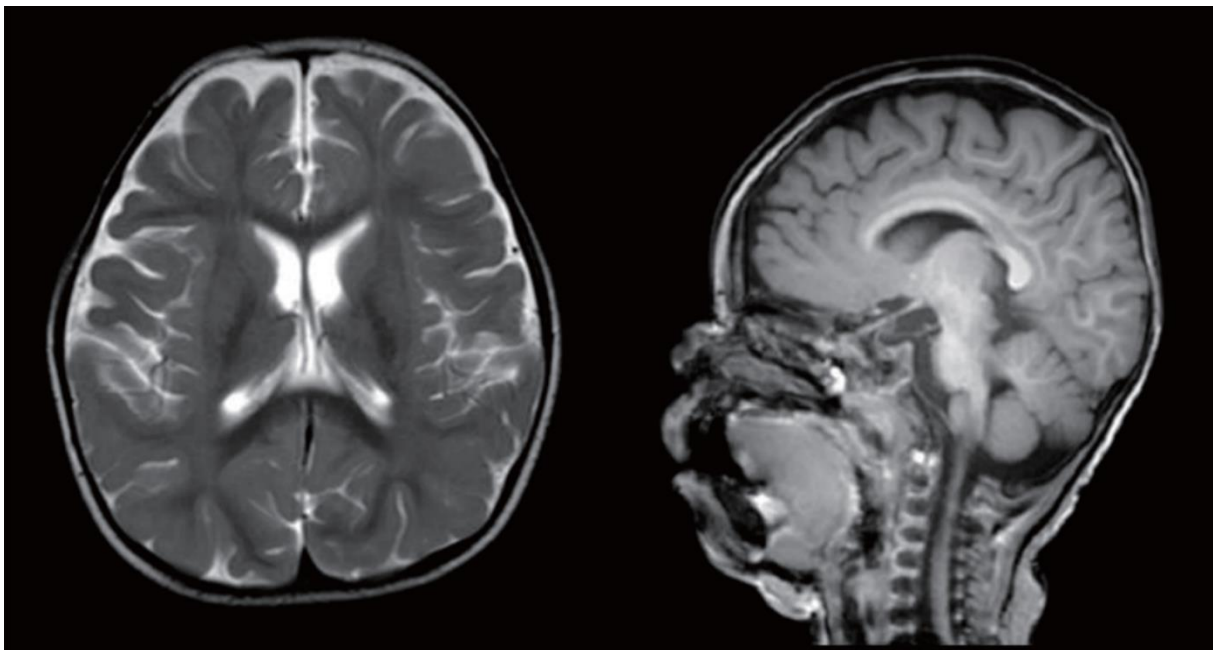
**Figure 19 : Représentation schématique de la taille normale de la tête d'un enfant sain, atteint de microcéphalie et atteint de microcéphalie sévère (adaptée de Nawathe et al., 2018)**

Les causes génétiques impliquent des syndromes liés à des altérations chromosomiques, ainsi que de nombreuses mutations autosomiques récessives et dominantes. On dénombre plus de 700 syndromes génétiques associés à la microcéphalie (Pirozzi et al., 2018). Des cas de microcéphalie sont associés à ces altérations chromosomiques, comme les aneuploïdies de type trisomies 13 (Aypar et al., 2011), les trisomies 18 (Tucker et al., 2007), les trisomies 21 (Korenberg et al., 1994), et les délétions de type syndrome de Wolf-Hirschhorn, lié au locus 4p (Akhtar, 2008), syndrome de Williams, associé au locus 7q11.23 (Faravelli et al., 2002) et syndrome Miller-Dieker (voir plus bas, Stengel-Rutkowski et al., 1994). Les gènes généralement impliqués dans la microcéphalie ont une fonction dans la prolifération cellulaire, la maintenance de la capacité des cellules souches à proliférer et la différenciation neuronale, autrement dit des gènes associés à la fonction des microtubules et aux grandes



voies de signalisation de la prolifération et du destin cellulaire comme la voie PTEN/AKT/mTOR et la voie des MAPK pour ne citer qu'elles (Guerrini et al., 2008; Romero et al., 2018).

La famille des gènes MCPH (*microcephaly primary hereditary*, microcéphalie primaire autosomique récessive) recense 18 gènes dont les mutations touchent 1/30 000 à 1/250 000 naissances (Naveed et al., 2018; Zaqout et al., 2017). Parmi ces gènes, les plus couramment mutés sont : *ASPM*, localisé au locus 1q31.3, codant pour une protéine associée au microtubules impliquée dans l'orientation du fuseau mitotique et la duplication des centrioles (Fujimori et al., 2014), et qui représente 68.6 % des cas de MCPH ; *WDR62* (*WD repeat-containing protein 62*), localisé au locus 19q13.12, codant pour une protéine impliquée dans la voie de signalisation c-Jun et dans les fonctions du centrosome (Chen et al., 2014; Nicholas et al., 2010; Yu et al., 2010), et comptabilisant 14.1 % ; *MCPHI*, localisé au chromosome 8p23 et codant pour la Microcéphaline, impliqué dans la condensation de la chromatine et représentant 8 % des MCPH (Gruber et al., 2011; Jackson et al., 2002; Trimborn et al., 2004).



**Figure 20 : Image IRM axiale (à gauche) et sagittale (à droite) d'un enfant de 18 mois atteint de microcéphalie congénitale. (Lee, 2017).**

De nombreux cas de microcéphalie touchent des patients portant des mutations dans les gènes codant pour les différents isoformes de la tubuline tels que *TUBA1A* (Myers et al., 2015), *TUBB2B* (Romaniello et al., 2012) et *TUBB5* (Breuss et al., 2016). Par ailleurs, les mutations dans les isoformes de la tubuline entraînent des MCDs au « large spectre », combinant plusieurs pathologies comme la microcéphalie, la polymicrogyrie, l'hypoplasie du cerveau, du cervelet et du pont cérébral (**Figure 21**). On qualifie les pathologies présentant des tableaux cliniques de tubulinopathies (Bahi-Buisson et al., 2014; Romero et al., 2018).

Les phénomènes cellulaires et moléculaires expliquant l'émergence d'un phénotype microcéphalique, évalués par l'utilisation de modèles animaux et cellulaires, peuvent inclure une déplétion du pool de progéniteurs liée à une entrée vers la différenciation neuronale précoce (Fujimori et al., 2014; Johnson et al., 2018; Pulvers et al., 2010), et/ou une augmentation de la quantité de cellules rentrant en apoptose (Magini et al., 2019).

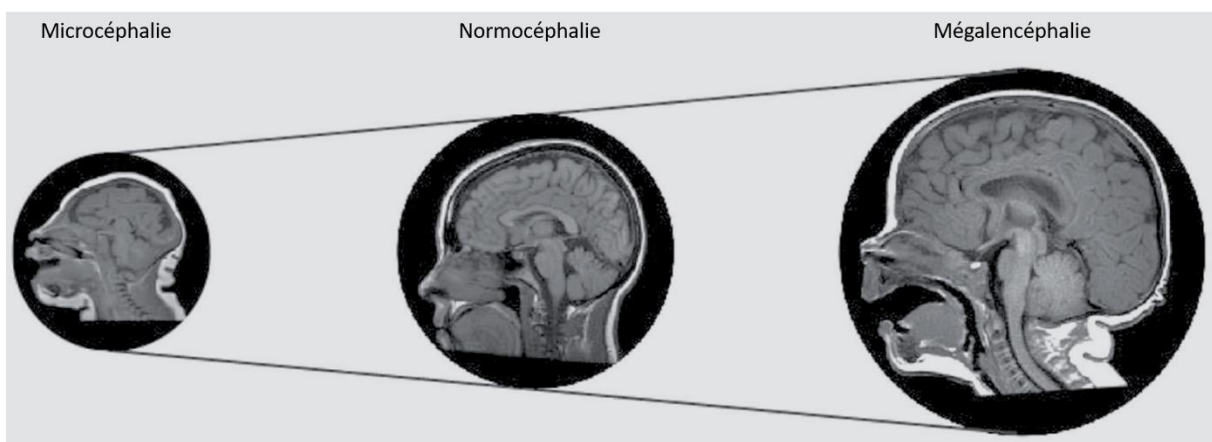


**Figure 21 : Images IRM d'une tubulinopathie associée à *TUBA1A*, caractéristique d'une maladie hétérogène.** « Images IRM T1 axiale (A), T2 axiale (B) et T2 sagittale (C) illustrant les caractéristiques morphologiques d'une microcéphalie associée à une mutation du gène *TUBA1A*. Une fonction de la tubuline impactée expliquera la microcéphalie (mitose/prolifération cellulaire), le cortex cérébral lissencéphalique (migration neuronale), le cervelet et le pont extrêmement petits (prolifération neuronale, migration cellulaire, croissance axonale), et l'absence de corps calleux avec un kyste interhémisphérique » (Desikan and Barkovich, 2016).

- **Macrocéphalies, mégalencéphalies et hémimégalencéphalies**

A l'opposé de la microcéphalie se trouvent la macrocéphalie et la mégalencéphalie, qui sont toutes deux diagnostiquées avec une taille de tête supérieure à 2 écart-types de la moyenne en fonction de l'âge, du sexe et de l'origine (DeMyer, 1986; Desikan and Barkovich, 2016; **Figure 22**). On estime que 2.3% de la population ont une circonférence de la tête supérieure à 2 écart-types de la moyenne (Dobyns and Mirzaa, 2019). La mégalencéphalie définit une augmentation de la circonférence de la tête liée à une hyperprolifération des progéniteurs neuronaux, entraînant une présence de cellules gliales ou de neurones anormalement élevés et une migration ou une différenciation des neurones aberrante (Windén et al., 2015). D'autres éléments du développement du cerveau peuvent également être affectés. La macrocéphalie est définie comme une augmentation de la circonférence de la tête liée à troubles de croissance de l'os crânien, l'hydrocéphalie, une présence de liquide sous-dural, des masses intracrâniennes ou encore des défauts de développement artérioveineux (Pavone et al., 2017). Globalement, les troubles liés à la taille du cerveau, qu'il s'agisse de microcéphalie ou de macrocéphalie/mégalencéphalie sont très souvent associés aux troubles du spectre autistique (Lainhart et al., 1997). Par exemple, 12 à 31% des cas d'autismes présentent une macrocéphalie (Kurata et al., 2018; O'Reilly et al., 2013). Enfin, la gyration du cortex n'est généralement pas impactée dans les cas de mégalencéphalie.

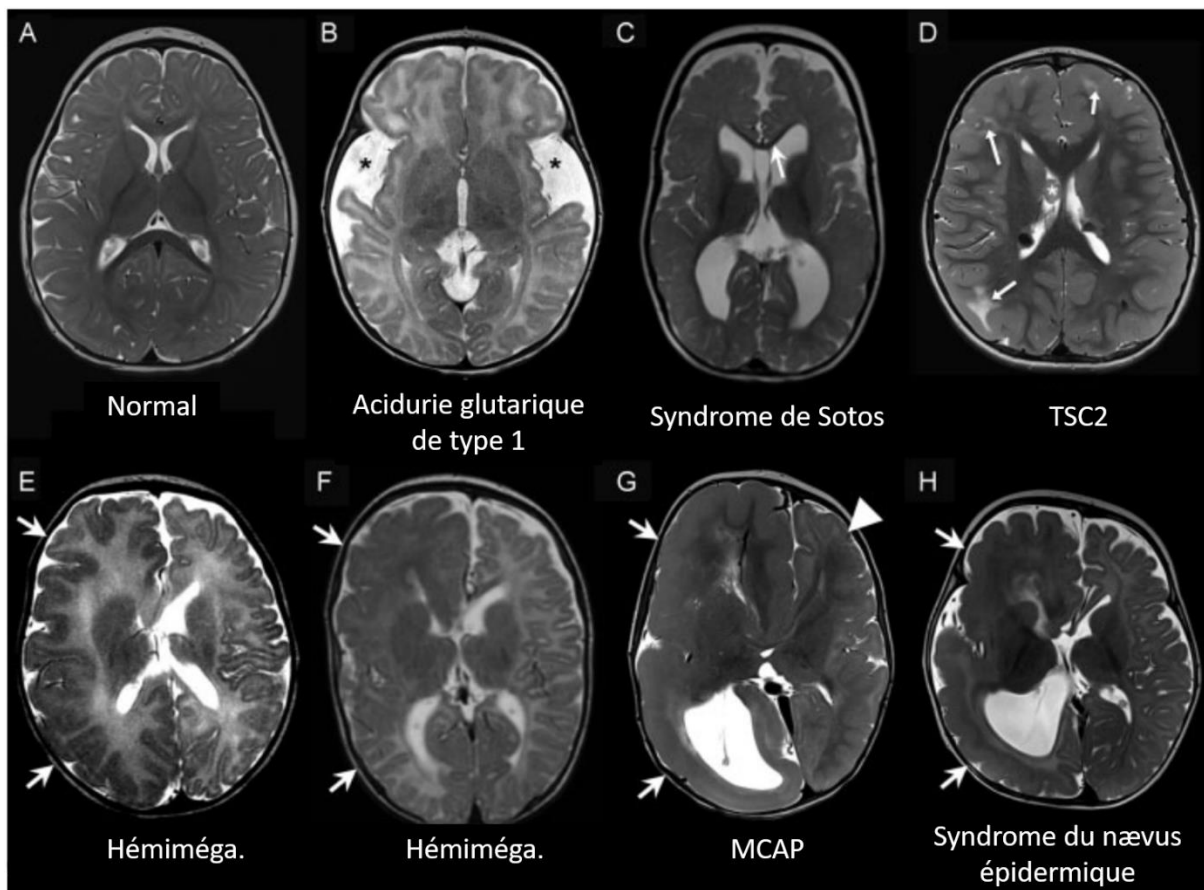
Les mégalencéphalies sont divisées en trois groupes : les mégalencéphalies idiopathiques (ou bénigne, n'ayant pas de troubles neurologiques associés), les mégalencéphalies causées par des troubles métaboliques, et les mégalencéphalies associées à des troubles anatomiques (**Figure 23**). Les mégalencéphalies métaboliques sont le plus souvent associées à des troubles du métabolisme des acides organiques cérébraux (Kölker et al., 2011; Pop et al., 2019; Steenweg et al., 2010), des troubles du métabolisme des lysosomes (Krivit et al., 1972), et des leucoencéphalopathies ou leukodystrophies, troubles liés aux cellules présentes dans la substance blanche comme les astrocytes (Rodriguez, 2013). Les mégalencéphalies métaboliques sont généralement associées à la formation de kystes sous-corticaux et à l'augmentation du volume cellulaire des astrocytes et/ou oligodendrocytes.



**Figure 22 : Comparaison des tailles de la tête entre Microcéphalies, normocéphalie, et mégalencéphalie.** Noter les déformations faciales associées au troubles de la taille de la tête (*adaptée de Pirozzi et al., 2018*).

Les mégalencéphalies anatomiques, également appelées mégalencéphalies développementales sont liés à des perturbations de la prolifération, différenciation et migration lors du développement cortical. Parmi les syndromes associés à ce type de mégalencéphalies (Winden et al., 2015), on trouve entre autres : le syndrome de Sotos (Tatton-Brown and Rahman, 2007), trouble de déficit intellectuel associé à des mutations du gène *NSDI* localisé au locus 5q35, codant pour une histone méthyltransférase, et qui a une incidence de 1/14 000 naissance (Foster et al., 2019) ; le syndrome de Weaver, associé à des mutations du gène *EZH2*, oncogène localisé au locus 7q36.1 codant pour la partie catalytique du complexe *PRC2* (*polycomb repressive complex 2*), un complexe ayant une activité méthyltransférase sur la lysine 27 de l'histone 3 (Tatton-Brown et al., 2011, 2013) ; et le syndrome de Bannayan–Riley–Ruvalcaba, associé à des mutations de *PTEN*, gène localisé au locus 10q23.31 codant pour la phosphatase du  $PIP_3$ , enzyme antagoniste de la PI3K et répresseur de l'activation de la voie AKT-mTOR (Gorlin et al., 1992; Zori et al., 1998). Il est peu surprenant de déceler chez les patients atteints de mégalencéphalies des mutations dans les gènes impliqués dans les voies de signalisation PI3K-PTEN-AKT-mTOR, MAPK et SHH (Winden et al., 2015), voies largement impliquées dans le contrôle de la prolifération des progéniteurs neurax. En effet, lors du diagnostic de mégalencéphalie, on retrouve souvent des mutations dans les gènes impliqués particulièrement dans la voie AKT-mTOR

(Dobyns and Mirzaa, 2019), tels que *PIK3CA*, gène localisé sur le chromosome 3q26.32 et codant pour la sous-unité catalytique de la PI3K (Keppler-Noreuil et al., 2015; Mirzaa et al., 2012), *PIK3R2*, codant pour la sous-unité régulatrice de la PI3K et localisé au 19p13.11 (Osterling et al., 2011; Rivière et al., 2012) et *AKT3* codant pour un membre de la famille des kinases AKT et localisé au locus 1q43-q44 (Alcantara et al., 2017; Jansen et al., 2015) ou encore *RAB39B*, gène localisé au locus Xq28 et codant pour une protéine de la famille des RAB GTPases qui inhibe l'activité de la PI3K (Woodbury-Smith et al., 2017; Zhang et al., 2020).



**Figure 23 : Panel d'images IRM représentant un cerveau normal et des cerveaux atteints de différentes formes de macrocéphalies et mégalencéphalies.** Images IRM en pondération T2. « A) Enfant d'un an sans troubles neurologiques, avec deux hémisphères symétriques et une myélinisation normale. B) Individu avec acidurie glutarique de type 1 avec symptômes classiques comme les espaces extra-axiaux élargis et hypoplasie des lobes temporaux (astérisques) et retard de myélinisation. C) Individu avec syndrome de Sotos avec dolichocéphalie (crâne allongé) et amincissement du corps calleux (flèche). D) Individu avec sclérose tubéreuse de Bourneville à la suite d'une mutation du gène *TSC2*, et présente les caractéristiques classiques telles que les tubers corticaux dans le lobes frontal et pariétal (flèches) et un astrocytome sous épendymaire à cellules géantes (astérisque). E) Individu avec une hémimégalencéphalie d'origine inconnue, la flèche indique l'élargissement d'un des hémisphères. F) Individu avec une hémimégalencéphalie associée à une mutation du gène *AKT3*, la flèche indique l'élargissement d'un des hémisphères. G) Individu avec syndrome MCAP (mégalencéphalie – malformation capillaire – polymicrogyrie) présentant une hémimégalencéphalie (flèche) et une gyrification anormale sur le côté controlatéral (pointe de flèche). H) Individu avec syndrome du nævus épidermique présentant un élargissement d'un des deux hémisphères (flèche) (Adaptée de Winden et al., 2015).

Parmi les études de cas associés à la mégalencéphalie, on retrouve de nombreux patients atteints de formes focales d'excroissance du cerveau, entraînant des malformations ne couvrant pas l'entièreté du cerveau (Dobyns and Mirzaa, 2019; Mirzaa and Poduri, 2014). Ces cas sont appelés hémimégalencéphalies ou dysplasies corticales focales, en fonction de la taille de la région excroissante.

Ces pathologies présentant une altération incomplète de la forme et de la taille du cerveau sont généralement associées à des mutations somatiques, entraînant une mosaïque cellulaire avec des cellules souches mutantes dans un environnement sain au sein du cerveau, produisant localement un nombre anormal de divisions (Winden et al., 2015).

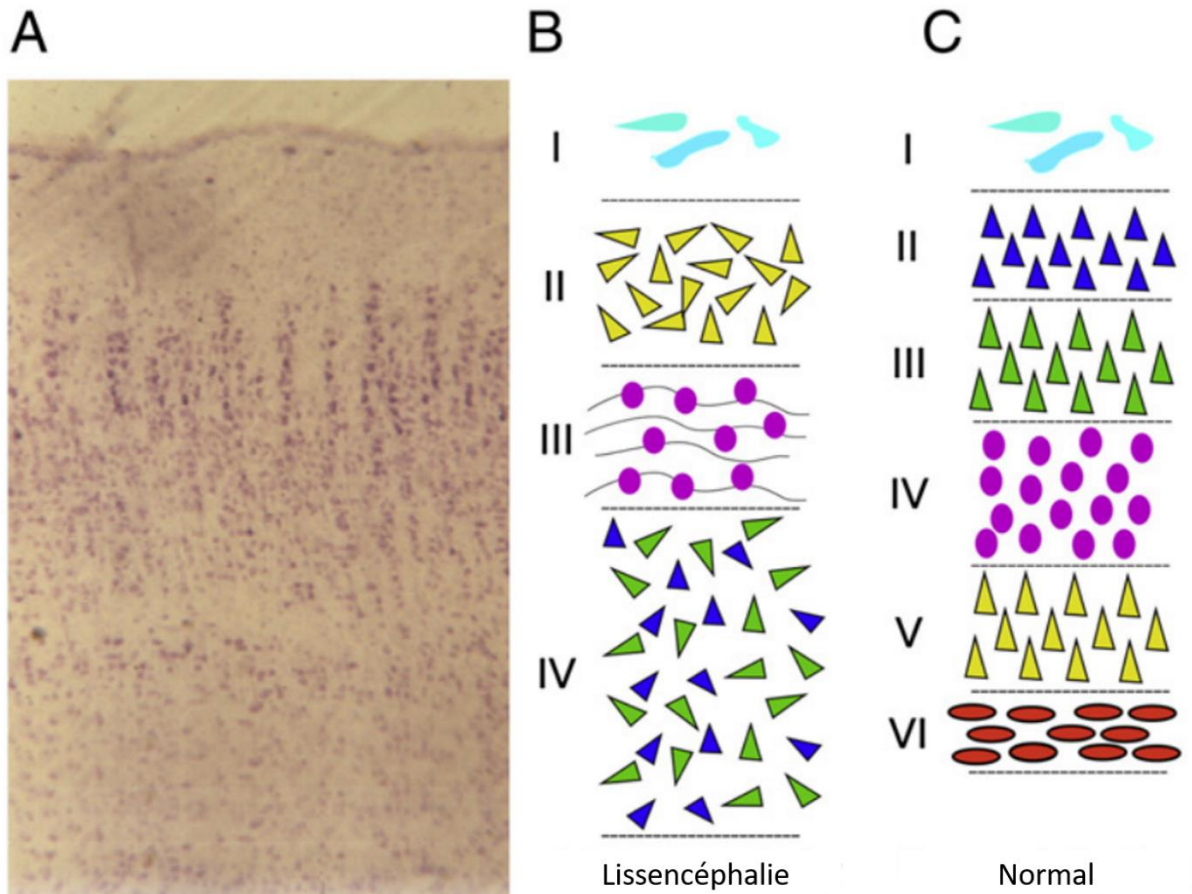
## ii) *MCDs liées à des troubles de migration cellulaire*

Une des particularités du développement cortical vient de la migration neuronale : les neurones excitateurs néoformés doivent quitter les zones germinales (VZ et SVZ) et migrer de manière basale vers la CP grâce aux fibres de la glie radiaire, et doivent stopper leur mouvement au bon endroit dans le but de former une organisation laminaire (*inside-out*) indispensable au bon fonctionnement du cortex. Les neurones inhibiteurs doivent quant à eux migrer tangentiellement du télencéphale ventral pour rejoindre le pallium. Cette migration neuronale a donc besoin de réussir plusieurs étapes critiques à son bon déroulement : la migration doit débuter, elle doit être dirigée vers le bon endroit, elle doit être maintenue tout du long jusqu'à son terme, et elle doit s'arrêter quand le neurone a rejoint sa destination. Les MCDs liées à des troubles de la migration cellulaire peuvent impliquer des altérations d'une ou plusieurs de ces étapes. Parmi cette classe de MCDs, on retrouve les pathologies liées à des troubles du cortex (LIS de types 1 et 2) et des pathologies liées à la présence ectopique de noyaux gris au sein de la substance blanche (hétérotopies).

- *Lissencéphalies : pachygyries, agyries*

Les LIS classiques (littéralement : cerveau lisse) regroupent les pathologies appelées pachygyries (peu de circonvolutions) et agyries (pas de circonvolutions) (Di Donato et al., 2017). Ces pathologies se présentent sous la forme d'un cortex épais (10 à 20 mm contre 4 mm pour un cortex normal) avec peu ou pas de gyri et sulci, causées par l'incapacité des neurones à migrer correctement depuis la VZ/SVZ jusqu'à la CP pour venir se positionner dans la couche qui leur est dédiée (Dambaska et al., 1983; Guerrini and Parrini, 2010; Lee, 2017). Le cortex humain atteint de LIS classique se présente généralement avec 4 couches, *a contrario* des 6 couches normalement présentes (Dobyns et al., 1984; **Figure 24**). On appelle alors ce type de pathologie la lissencéphalie classique de type I. Les LIS de type 1 présentent 6 niveaux de sévérité, allant du grade 1 le plus sévère (agyrie complète) au grade 6 représentant des hétérotopies (Cardoso et al., 2002; Di Donato et al., 2017). De manière intéressante, les LIS peuvent avoir un gradient antéro-postérieur ou postéro-antérieur, avec par exemple une agyrie postérieure et une pachygyrie antérieure (Kadoshima et al., 2013; Leventer et al., 2001). Comme pour les autres MCDs, les LIS sont largement associées à des retards mentaux et des crises d'épilepsies. Les LIS peuvent se présenter sans autres malformations, ou alors accompagnées de traits faciaux chez les enfants particulièrement marqués avec un front haut, un petit nez pointé vers le haut et d'autres malformations. De plus, de la même manière que les tubulinopathies, les LIS sont associées à des

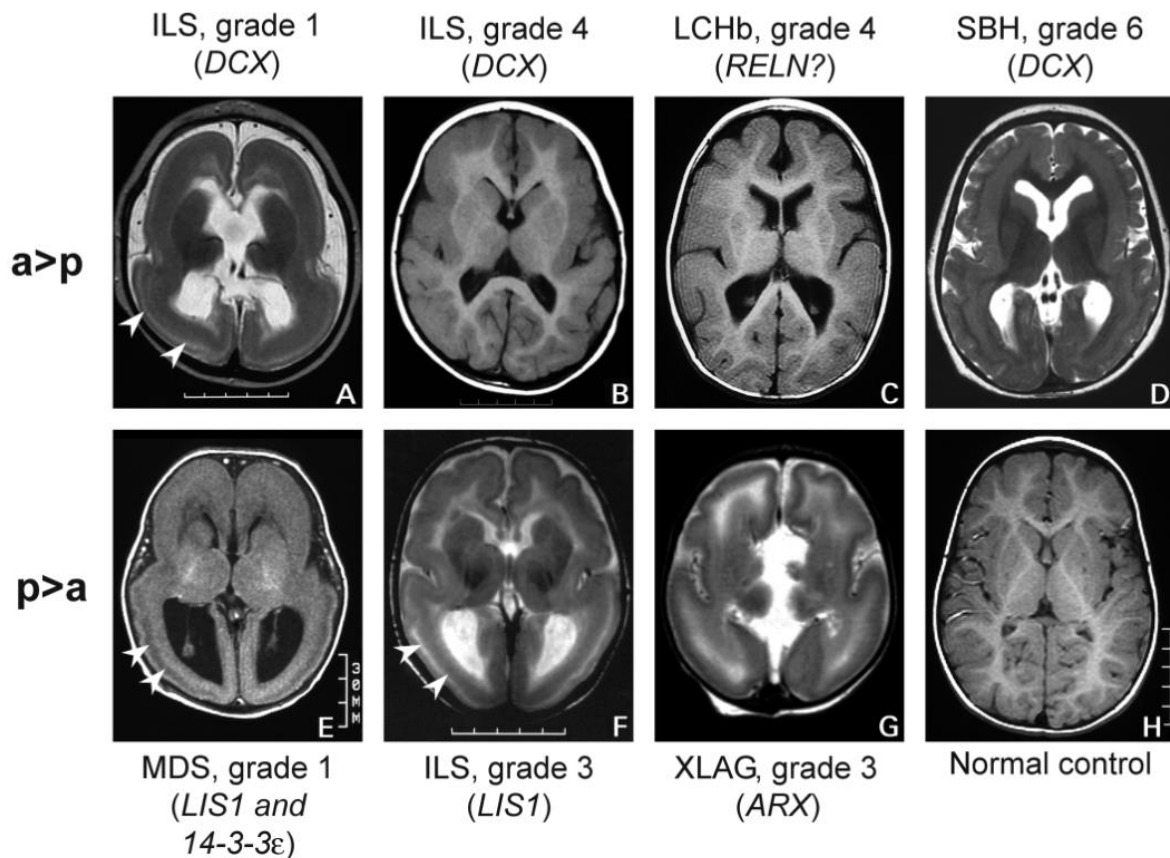
tableaux neuroanatomiques complexes et hétérogènes, parmi lesquels on observe classiquement l'association d'une LIS et d'une microcéphalie, autrement appelé microlissencéphalie (Bahi-Buisson et al., 2014; Harding et al., 2016). Globalement, l'incidence des LIS est de 1.2/100 000 naissances (Romero et al., 2018).



**Figure 24 : La désorganisation du cortex induite par la lissencéphalie.** A) Section histopathologique d'un patient atteint de lissencéphalie. B,C) Représentation schématique de l'organisation du cortex lissencéphalique, dans lequel le cortex ne présente que 4 couches anormales (B) et dans un contexte sain dans lequel le cortex présente 6 couches ordonnées (C) (Adaptée de Guerrini and Parrini, 2010).

Les causes génétiques de la LIS sont catégorisées en deux groupes, qui ont des sévérités variables : les syndromes incluant des anomalies chromosomiques, et les LIS isolées (ILS, *isolated lissencephaly sequence*), causées par des mutations ou des délétions de gènes individuels (**Figure 25**). Le syndrome principal associé à la LIS le premier découvert est le syndrome de Miller-Dieker (MDS, *Miller-Dieker syndrome*) (Dobyns et al., 1983; Stengel-Rutkowski et al., 1994), causé par des anomalies chromosomiques (délétions le plus souvent) au niveau du chromosome 17p13 (Dobyns et al., 1983, 1993; Stratton et al., 1984). Quelques années plus tard, *LIS1* (*Lissencephaly 1*), gène localisé dans les délétions chromosomiques du MDS fut le premier gène découvert associé à une malformation causée par un trouble de la migration neuronale (Reiner et al., 1993). *LIS1* est le gène le plus souvent associé à la LIS, comptabilisant 40% des cas (Guerrini et al., 2008; Di Donato et al., 2018). Il code pour la protéine

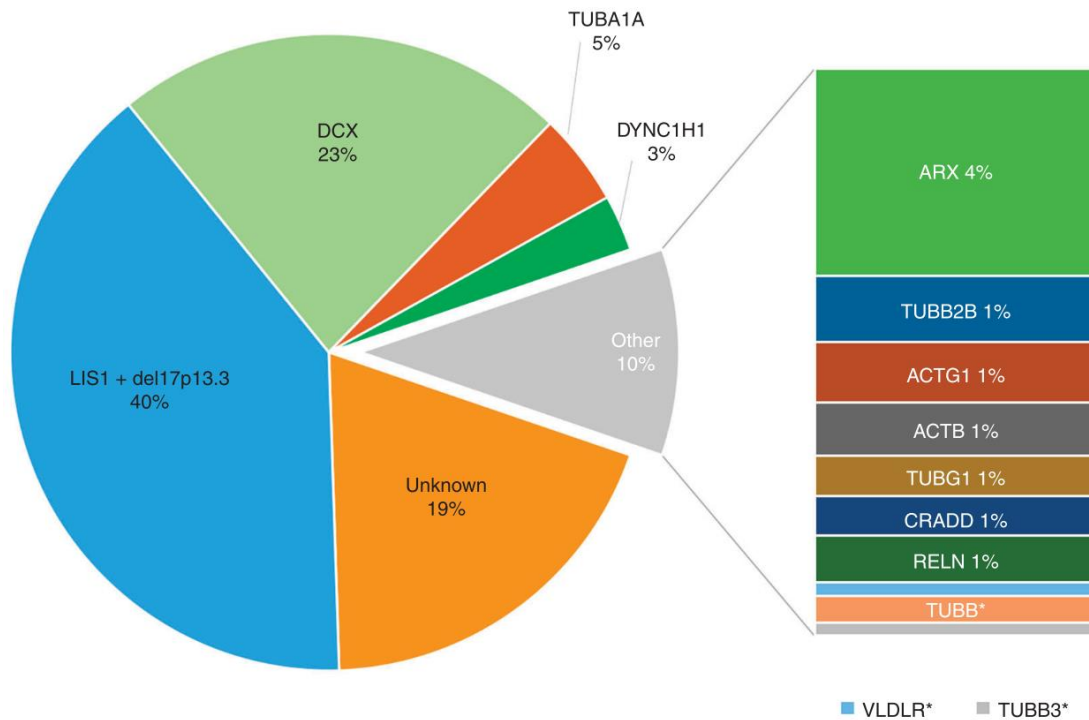
LIS1, aussi nommé PFAFH1B1, une protéine associée aux microtubules et qui régule l'activité de la dynéine. Compte tenu de l'importance de *LIS1* et de ses rôles potentiels dans la production et la fonction des bRGs dans le contexte de mon doctorat, j'aborderai les caractéristiques de la LIS causées par des mutations, délétions ou duplications de *LIS1*, de ses rôles connus lors du développement cortical, notamment grâce à l'utilisation de modèles animaux transgéniques pour *Lis1*, dans la prochaine section de l'introduction. Un autre gène impliqué dans la délétion du 17p13.3 (Cardoso et al., 2003; Yingling et al., 2003) est *YWHAE* (codant pour la protéine 14-3-3ε), associé à des pathologies entraînant des déficits intellectuels et malformations du cerveau (Toyo-oka et al., 2003). Les duplications du locus 17p13.3 sont également la cause d'anomalies de la structure du cerveaux et de déficits cognitifs (Curry et al., 2013), suggérant que le développement cortical est particulièrement sensible au dosage des gènes impliqués.



**Figure 25 : Panel d'IRM présentant différents types de lissencéphalies avec leurs causes génétiques.** Images IRM en pondération T1 (B, C, E, H) ou T2 (A, D, F, G) au niveau des ganglions de la base dans 5 types de lissencéphalie. À l'opposé du contrôle (H), tous les types de LIS présentent des gyris larges ou absents et un cortex épais, à l'exception de la LIS de grade 6, la SBH (hétérotopie sous-corticale en bande), pour laquelle les sulci sont particulièrement peu profonds. Les gradients antéro-postérieurs ou postéro-antérieurs dépendent entièrement du gène impliqué. En effet, des mutations de *DCX* ou *RELN* résultent en un gradient antéro-postérieur (A-D), alors que les mutations de *LIS1* avec ou sans *14-3-3ε* ou *ARX* entraînent un gradient postéroantérieur (E-G). L'épaisseur du cortex dépend elle aussi du gène impliqué. Chez les patients portant des mutations de *DCX* (A, B) ou de *LIS1* (E, F) le cortex est très épais, allant de 10 à 20 mm, et des zones d'exclusion cellulaire sont visibles dans les zones d'agyrie (têtes de flèches). Chez les patients atteints de LIS avec hypoplasie cérébelleuse (C) ou des mutations dans *ARX* (G), le cortex est modérément épais et il n'y a pas de zones d'exclusion cellulaire. Chez les filles, des mutations de *DCX* entraînent des SBH (D) (Kato, 2003).

Parmi les autres causes génétiques causant des LIS, on note une forme associée au chromosome X, impliquant des mutations du gène *DCX*, localisé au locus Xq23 et codant pour une protéine associée

aux microtubules, la Doublecortine (Bahi-Buisson and Guerrini, 2013; Caspi et al., 2000; Des Portes et al., 1998; Francis et al., 1999; Pramparo et al., 2010) mais aussi d'autres ILS associant une agyrie, pachygyrie ou hétérotopie avec par exemple, des mutations dans de nombreux isotypes de la tubuline tels que *TUBA1A*, *TUBA8*, *TUBB*, *TUBB2B* et *TUBB3* (Bahi-Buisson and Cavallin, 1993), et d'autres gènes associés aux microtubules comme la *DYNC1H1* (codant pour la chaîne lourde de la dynéine), *KIF2A*, codant pour une autre protéine motrice associée au microtubules (Cavallin et al., 2017), *NDE1*, ou encore *RELN* (codant pour la Reeline) (Di Donato et al., 2018). LIS1 et toutes les protéines des gènes mentionnés dans ce dernier paragraphe sont toutes des protéines intervenant dans le cytosquelette, qu'il s'agisse d'éléments constitutifs ou de protéines associées. De plus, on peut mentionner le syndrome de Baraitser-Winter, causé par des mutations des gènes *ACTB* (locus 7p22.1) et *ACTG1* (locus 17q25.3) (Yates et al, 2017), codant deux isoformes de l'actine. Ceci relève l'importance du cytosquelette dans la migration neuronale, et de la sensibilité de développement cortical à des altérations de ce processus crucial (**Figure 26**).



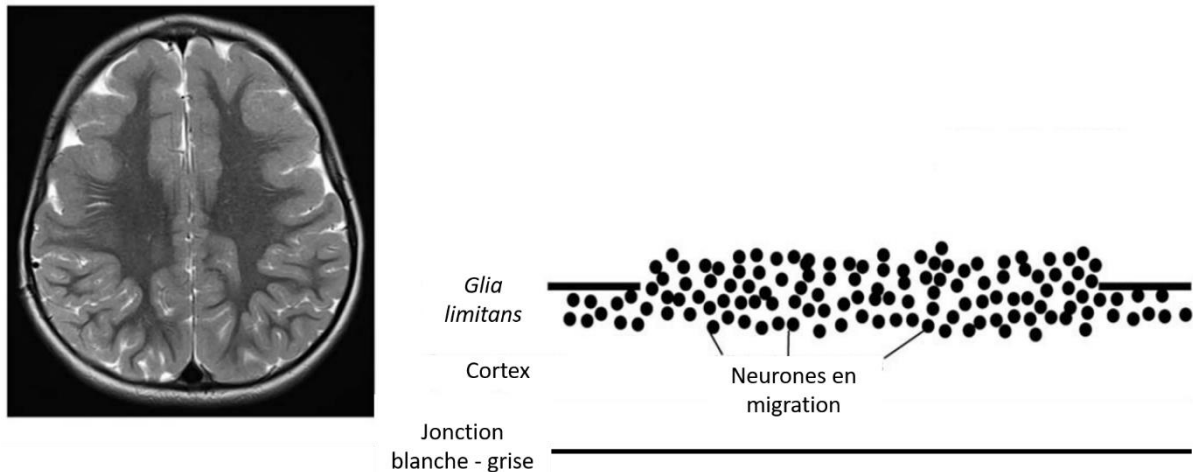
**Figure 26 : Gènes impliqués dans la lissencéphalie et leur proportion.** \*VLDLR, TUBB et TUBB3 comptent pour moins de 1% des cas identifiés (Di Donato et al., 2018).

- **Lissencéphalie de type 2 : Lissencéphalie pavimenteuse**

La lissencéphalie de type 2 est appelé 'pavimenteuse' (*cobblestone lissencephaly, COB*). Cette pathologie se présente cliniquement avec des dysplasie corticale nodulaires, une perte de définition claire entre substance blanche et substance grise, une démyélinisation et l'apparition de kystes (Barkovich et al., 2012; Devisme et al., 2012; Lerman-Sagie and Leibovitz, 2016). Cette pathologie est



généralement caractérisée par une perte de l'attachement des fibres de RGs à la surface piale, entraînant une désorganisation de la *glia limitans*, région la plus basale du cortex formé par la terminaison des processus basaux des RGs, et une sur-migration des neurones (**Figure 27**). Cette forme de lissencéphalie se démarqua de la LIS classique dans les années 80 lors des analyses neuropathologiques (Dambaska et al., 1983).



**Figure 27 : Lissencéphalie pavimenteuse.** A gauche, image IRM en pondération T1 d'un patient atteint de COB. A droite, représentation schématique des mécanismes cellulaires causant la LIS pavimenteuse : une destruction de la *glia limitans*, partie la plus superficielle du cortex en développement, entraîne une sur-migration des neurones qui vont au-delà de la CP (*Adaptée de Desikan and Barkovich, 2016*).

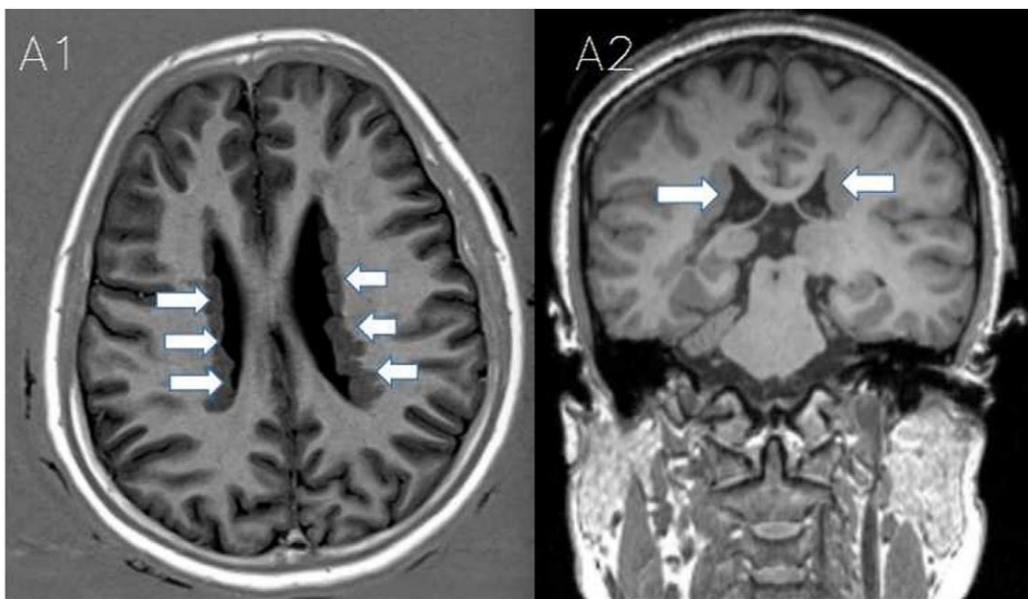
Parmi les causes génétiques induisant cette MCD, on retrouve souvent dans ces pathologies liant une forme de dystrophie musculaire, des anomalies des yeux aussi bien que le cerveau anormal, tels que le syndrome de Walker-Warburg (Tuuli and Odibo, 2017; Vajsar and Schachter, 2006), le syndrome MEB (*Muscle Eye Brain*) ou la dystrophie musculaire de Fukuyama (Silfeler et al., 2012), associés à des mutations des gènes *POMT1* (9q34.13), *POMGNT1* (1p34.1), *POMT2* (14q24.3) et *FKRP* (19q13.32) par exemple. Ces maladies sont généralement associées à des troubles de la glycosylation de l' $\alpha$ -dystroglycan (Endo, 2015), et ces altérations se retrouvent dans 66% des cas (Devisme et al., 2012). En fonction des gènes impliqués, la COB présente une sévérité variable, allant de la classe A, la plus sévère et associée à des mutations de *POMT1* pour 34% des cas, à la classe C, la moins sévère et associée à des mutations de *POMGNT1* (18% des cas).

- **Hétérotopies**

Les hétérotopies se caractérisent par la présence d'amas de neurones ectopiques, localisés près des ventricules, ou dans la substance blanche, n'appartenant pas aux cortex, ou des noyaux des ganglions de la base et autres noyaux du télencéphale ventrale. La localisation et la taille de ces noyaux ectopiques peut varier, et ils peuvent se présenter de manière symétrique dans les deux hémisphères, ou alors uniquement dans un des deux hémisphères (Desikan and Barkovich, 2016).

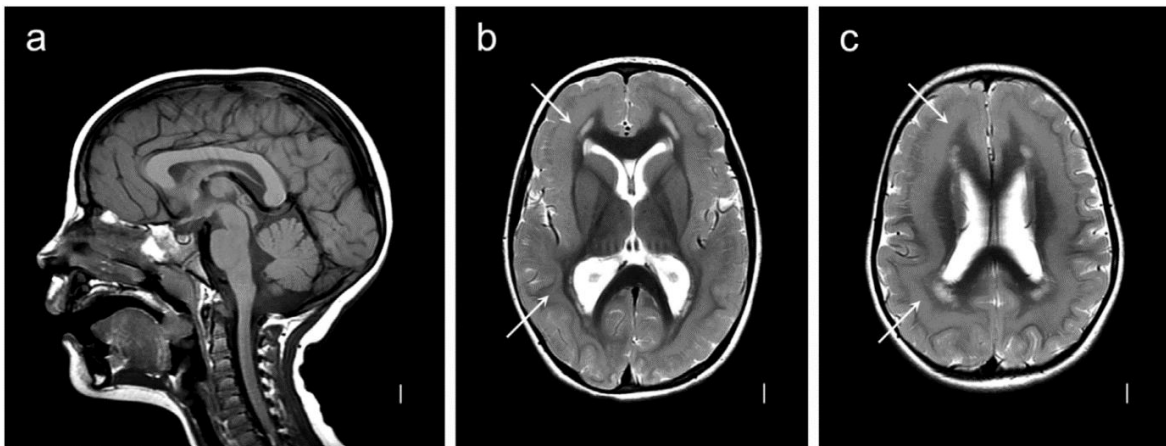
Dans le cortex, on décrit généralement deux type d'hétérotopies, en fonction de la localisation des neurones : les hétérotopies nodulaires périventriculaires (PNH, *periventricular nodular heterotopias*, **Figure 28**), qui sont les plus courantes, et les hétérotopies sous-corticales en bande (SBH, *subcortical band heterotopias*, **Figure 29**), également nommée « LIS double cortex » (Parrini et al., 2016). D'un point de vue clinique, les PNH et SBH sont souvent associées à la dyslexie et des crises d'épilepsie, pharmacologiquement résistante dans une proportion de cas (Lange et al., 2015; Liu et al., 2017b), dues aux connexions anormales qui seront générées entre les régions normales et les nodules hétérotopiques, ou les connexions intra et inter-nodulaires, ou en dehors des nodules, entraînant une synchronie des transmissions nerveuses et à terme l'apparition de crises (Christodoulou et al., 2012; Khoo et al., 2019).

Les PNH sont généralement bilatérales, présentent des nodules de substance grise longeant les deux ventricules latéraux (Fallil et al., 2015, **Figure 28**) et peuvent être soit isolées, soit incluse dans des syndromes alliant plusieurs anomalies congénitales (Guerrini et al., 2008). Les PNH affectent préférentiellement les femmes, associées à un gène lié au chromosome X, avec la majorité des embryons mâles n'arrivant pas à terme (Sheen, 2001). Ce gène, le plus souvent impliqué dans les PNH, est *FLNA* (Xq28), codant pour la Filamine A, protéine associée aux microfilaments d'actine et permettant de maintenir leur structure tridimensionnelle. On retrouve également le gène *ARFGEF2* (*ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor-2*) muté dans quelques rares cas de PNH (Sheen et al., 2004). D'autres gènes sont également cités dans Romero et al, 2018. Ces hétérotopies peuvent également se retrouver associées à certains autres syndromes, comme des anomalies de structure du chromosome 5p15 qui entraîne aussi des SBH (Sheen et al., 2003), le syndrome d'Ehlers-Danlos ou le syndrome de l'X fragile, ou à d'autres pathologies comme des hydrocéphalies ou des dysplasies fronto-nasales (Parrini et al., 2006).



**Figure 28** : Images IRM représentant une patiente atteinte de PNH bilatérale causé par une mutation sur *FLNA*. Image axiale (A1) et coronale (A2), la substance grise hétérotopique est très clairement visible le long des ventricules latéraux. Sur l'image axiale (flèches), on peut noter l'aspect nodulaire, comme des bourgeons, qui envahissent le ventricule au-delà de la surface ventriculaire (Liu et al., 2017b).

Les SBH, comme leur nom l'indique, se présentent sous la forme d'une bande, d'un ruban de neurones localisés dans la substance blanche, sous le cortex (**Figure 29**). A l'instar des PNH, les SBH peuvent être unilatérales ou bilatérales sur les deux hémisphères. *DCX*, très majoritairement, et *LISI* sont deux gènes associés aux SBH. Dû au fait que ces gènes sont impliqués dans la LIS, et que les patients atteints de mutations peuvent avoir une LIS, une SBH ou les deux, on les classe généralement dans le spectre LIS/SBH (Barkovich et al., 2012; Guarnieri et al., 2018; Lee, 2017). Compte tenu de la localisation du gène *DCX* sur le chromosome X, comme pour les PNH liées à *FLNA*, les SBH sont principalement observées chez les femmes (Tanaka and Gleeson, 2007), même si quelques cas mâles ont pu être détectés (implication de mutations somatiques et de cas mosaïques) (Pilz et al., 1999).

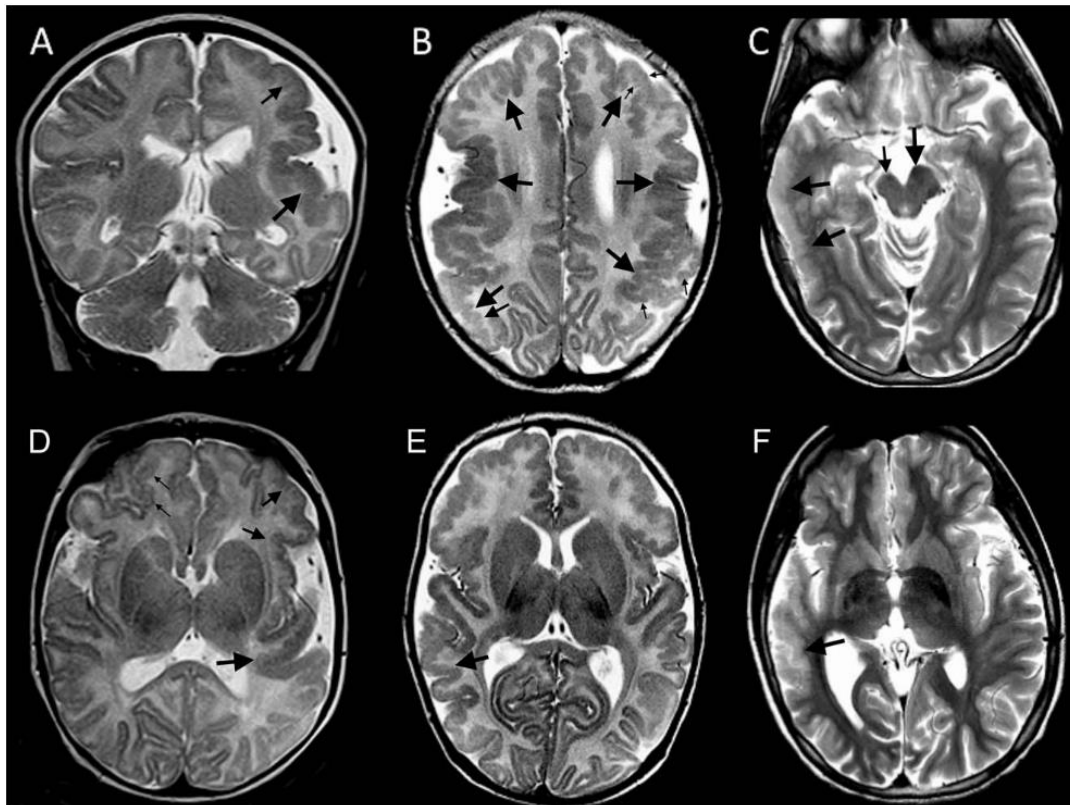


**Figure 29** : Images IRM d'un patient atteint de SBH bilatérale. Vue sagittale (a) et coronales (b et c). Les flèches indiquent la position de l'hétérotopie qui apparaît sous forme de bande en dessous du cortex (Di Donato et al., 2017).

Un nouveau gène a récemment été décelé dans des patients atteints d'une hétérotopie sous-corticale, le gène *EML1* localisé au locus 14q32.2 et codant pour un autre partenaire des microtubules. La particularité des altérations de *EML1* vient du fait que ces mutations entraînent la présence de progéniteurs Pax6+ ectopiques, par exemple chez la souris *HeCo* (Kielar et al., 2014), portant une mutation spontanée pour *Eml1* et qui présente un phénotype très similaire à la SBH humaine (Croquelois et al., 2009; Croquelois and Welker, 2007). Les SBH pourraient être donc causées par des perturbations intrinsèques de la migration neuronale (ex. mutations dans *DCX*), mais également dans des formes atypiques, par des altérations du fonctionnement et de la localisation des progéniteurs (perturbation non-cellule autonome de la migration). Ceci rejoint ce que j'ai mentionné au début du chapitre 3b), une classification définitive des MCDs dans des cases fermées serait une erreur car certaines pathologies pourraient être engendrées par des anomalies de plusieurs étapes de développement. Enfin, d'autres gènes tels que *TUBB*, *KATN1*, *CENPJ* et *GPSM2* (LGN) sont également impliqués dans les SBH (Oegema et al., 2019).

iii) *MCDs liés à des troubles post-migratoires ou d'organisation du cortex : Polymicrogyrie et schizencéphalie*

La polymicrogyrie (PMG) est une des MCD les plus courantes, comptabilisant 20% des cas (Stutterd and Leventer, 2014). Un cerveau atteint de PMG se caractérise par la présence de nombreuses petites convolutions entraînant un repliement excessif de la surface corticale et d'une organisation des couches corticales anormale (Desikan and Barkovich, 2016). La PMG est une pathologie complexe, ayant un spectre de sévérité et d'anomalie neuropathologiques associées dont le point commun est la description neuroanatomique mentionnée ci-dessus (**Figure 30**). La schizencéphalie en fait partie, et se distingue par la présence d'ouvertures, de fentes linéaires s'étendant des ventricules à la surface corticale permettant la communication entre le fluide cérébro-spinal et l'espace sous-pial et présentes sur un ou les deux hémisphères (Braga et al., 2018). De plus, malgré le grand nombre de cas de PMG étudiés, l'étiologie de la maladie reste mal connue et sa caractérisation par imagerie IRM est compliquée car les présentations neuroanatomiques sont très variables (Barkovich, 2010). De plus, plusieurs autres pathologies, comme la COB, peuvent avoir l'apparence d'une PMG en fonction de l'âge et du développement de la pathologie, car la *glia limitans* est également endommagée dans la PMG ponctuellement, laissant les neurones migrer au-delà de la CP et former des nodules superficiels.



**Figure 30 : Panel d'images IRM présentant différents types de PMG.** Le patient 1 (A, D) présente 3 types de gyri : des petits et fins microgyri (petite flèche dans le lobe frontal droit dans l'image D), des petits microgyris (flèches moyennes dans le lobe frontal gauche), et d large et profond gyri (flèches large dans le cortex sylvien postérieur gauche). Le patient 2 (B, E) a une PMG étendue dans les lobes frontal, temporal et pariétal. Le cortex apparaît épais au premier coup d'oeil mais une microgyrie peut être observé dans certaines zones (petites flèches dans les lobes frontal et pariétal gauche). Le patient 3 (C, F) a un cortex épais avec une surface interne quasiment lisse dans le lobe temporal gauche (grandes fleches, D, F) (Desikan and Barkovich, 2016).

Les causes de PMG sont multiples, génétiques et non génétiques, tels que les tératogènes et les infections virales et bactériennes (Stutterd and Leventer, 2014). Ces causes génétiques sont pourtant difficiles à établir, car les mutations décelées chez des patients atteints de PMG ne montrent pas forcément de liens de cause à effet (des patients portant des mutations sur le même gène ne présenteront pas forcément le même phénotype). De plus, on note de nombreux gènes impliqués dans d'autres MCDs tels que les gènes de la voie AKT-mTOR (Stutterd et al., 2018), et les gènes codant pour les isotypes de la tubuline comme *TUBA1A* et *TUBA8* (Abdollahi et al., 2009; Jaglin et al., 2009). Les anomalies chromosomiques les plus couramment associées à la PMG sont les délétions au locus 1p36.3 et 22q11.2, mais encore une fois, l'identification des gènes causant la pathologie reste difficile à mettre en place.

Comme nous avons pu le voir lors de cette description globale des MCDs, nombre d'entre elles sont causées par des mutations des gènes codant pour des protéines du cytosquelette, et ce quel que soit le type de pathologie (**Figure 31**). En particulier, beaucoup de protéines associées aux microtubules, qu'il s'agisse des différents isotypes de la tubuline, des protéines associées aux microtubules ou des protéines régulant la physiologie des centrosomes, sont nécessaires pour un développement cortical normal. Compte tenu de l'implication des multiples fonctions des microtubules dans la structure du cil primaire, dans la mitose (orientation du fuseau mitotique, séparation des chromatides sœurs) et dans la migration neuronale, il est peu surprenant que ces mutations induisent des troubles du développement cortical.

	Mécanismes cellulaires							Gènes		Schéma des MCDs		IRM		
	VZ	ISVZ	OSVZ	IZ	CP	MZ								
Normal/Contrôle														
Lis pavementuse							<b>FKTN, POMT1, POMT2, POMGNT1, POMGNT2, POMK, FKRP, LARGE, LAMB1, TMTC3, ISPD, TMEEM5, B4GAT1, GPR56, B3GALNT2, DAG1</b>							
PNH							<b>FLNA, ARFGGF2, C6orf70, FAT4, DCHS1, LRP2, NEDD4L</b>							
SBH							<b>DCX, KIF2A, LIS1, TUBA1A, TUBG1 (EMIL1-atypical)</b>							
LIS avec agyrie							<b>LIS1, DCX, ARX, TUBA1A, TUBB3, TUBG1, CDK5, VLDLR, ACTG1, ACTB</b> With microcephaly: <b>DYNC1H1, RELN</b>							
Microcéphalie							<b>ASPM, CKSRAP2, MCPH1, CENPJ, WDR62, STIL, KNL1, CEP135, CDK6, CEP152, CEP63, KIF2A, TUBB, TUBB3, DYNC1H1, RTTN, EOMES, PAX6, RAB3GAP1, RAB3GAP2, RAB18</b>							
Microlissen-céphalie							<b>WDR62, NDE1, TUBB3, CIT, KIF5C, CDK5, TUBA1A, TUBB2B, KTTN, LIS1</b>							

**Figure 31 : Schéma récapitulatif des MCDs, des gènes principaux qui leur sont associés et les mécanismes cellulaires impliqués.** Pour chaque pathologie, une image IRM axiale, un schéma basé sur cet IRM représentant le phénotype présent, les gènes qui lui sont principalement associés ainsi qu'une illustration des mécanismes cellulaires impliqués. Code couleur des types cellulaires : aRGs = violet, IPs = vert, BRG = orange, neurone immature en migration = rouge, neurone mature = bleu foncé, cellules de Cajal-Retzius dans la MZ = vert (*adaptée de Romero et al., 2018*).

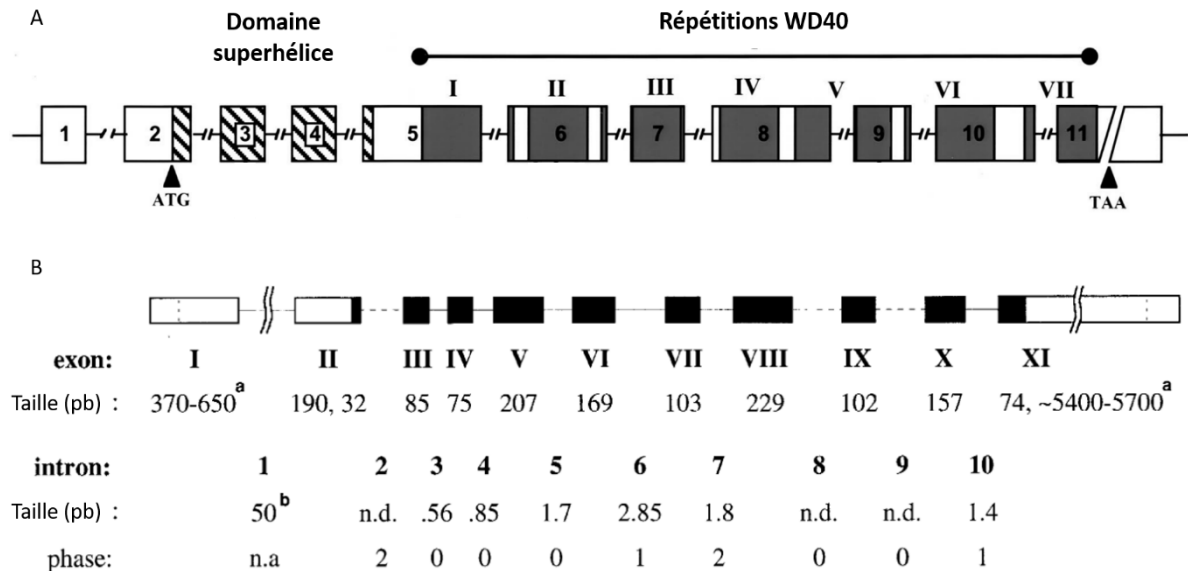
#### 4) LIS1 : du gène à la lissencéphalie

Comme dit plus tôt, des mutations dans le gène *LIS1* sont impliquées dans des LIS et des SBH. En effet, ce gène semble avoir un rôle prépondérant pour le bon fonctionnement des processus du développement cortical. Faisant parti de mon sujet de doctorat, dans la partie qui suit, je décrirai donc plus précisément le gène, la structure de la protéine et ses partenaires. Je présenterai les différents types de mutations qui peuvent survenir dans les LIS. Enfin, je détaillerai les concepts mis en avant par les différentes études, utilisant des modèles animaux et humains, notamment la souris et les organoïdes cérébraux respectivement. Enfin dans la dernière section de l'introduction, je développerai plus les aspects subcellulaires de la protéine LIS1, notamment par son interaction avec la dynéine.

##### a) *LIS1* : gène, structure et partenaires

Comme mentionné déjà, *LIS1* fut le premier gène séquencé impliqué dans le syndrome de MDS, et de manière générale, associé à une pathologie liée à des troubles de la migration neuronale (Reiner et al., 1993). *LIS1* fut originalement cloné lors d'une tentative d'identifier les gènes contenant des domaines  $\beta$ -transducin-like-repeats, également appelés domaines de répétition WD40, à partir d'une banque d'ADN de cerveaux fœtaux humains. Des délétions de la région 5' ou 3' du clone furent identifiées dans deux patients MDS ayant des délétions du locus 17p13.3, suggérant le rôle de LIS1 dans la pathologie. *LIS1* est exprimé dans plusieurs tissus, notamment le cerveau, le cœur, le muscle squelettique, le foie et les reins, suggérant une expression ubiquitaire. La cartographie du gène sera effectuée en 1997 : le gène possède 11 exons avec une région codante de 1 233 paires de bases s'étalant de l'exon 2 à l'exon 11 (Lo Nigro et al., 1997). Une analyse plus fine que la première réalisée en 1993 montrera que chez l'homme, deux transcrits de *LIS1* de 5.5 et 7.5 kb sont exprimés, avec seulement une différence de polyadénylation et de 3' UTR. Ces deux transcrits codent pour une protéine de 410 acides aminés appartenant au complexe des facteurs d'activation plaquettaire (PAF, *platelet activating factor*) (Hattori et al., 1994). En effet, LIS1 porte également le nom PFAH1B1, sous-unité régulatrice de l'acétyl-hydrolase du PAF, protéine trimérique composée de LIS1, PFAH1B2 et PFAH1B3. LIS1 reste l'acteur principal lorsqu'il s'agit du développement cortical et de la part que les mutations de *LIS1* ont dans les MCDs. Pourtant, la présence de l'hétérotrimère pourrait également être nécessaire pour un développement cortical normal (Sweeney et al., 2000). LIS1 est très conservée au cours de l'évolution (Cardoso et al., 2002), n'ayant par exemple qu'un acide aminé différent entre l'être humain et la souris (Péterfy et al., 1994) et ayant 70% d'homologie avec le gène de la drosophile (Liu et al., 1999).

La protéine LIS1 possède donc 410 acides aminés et deux domaines fonctionnels (**Figure 32**). Le domaine en N-terminal (section codée par les exons 2 à 5) code pour un domaine LisH (domaine d'homologie à LIS1 découvert dans d'autres protéines comme TBL1 et OFD1) et une superhélice (*coiled-coil domain*), permettant la dimérisation de LIS1. Le deuxième domaine en C terminal contient les répétitions WD40.

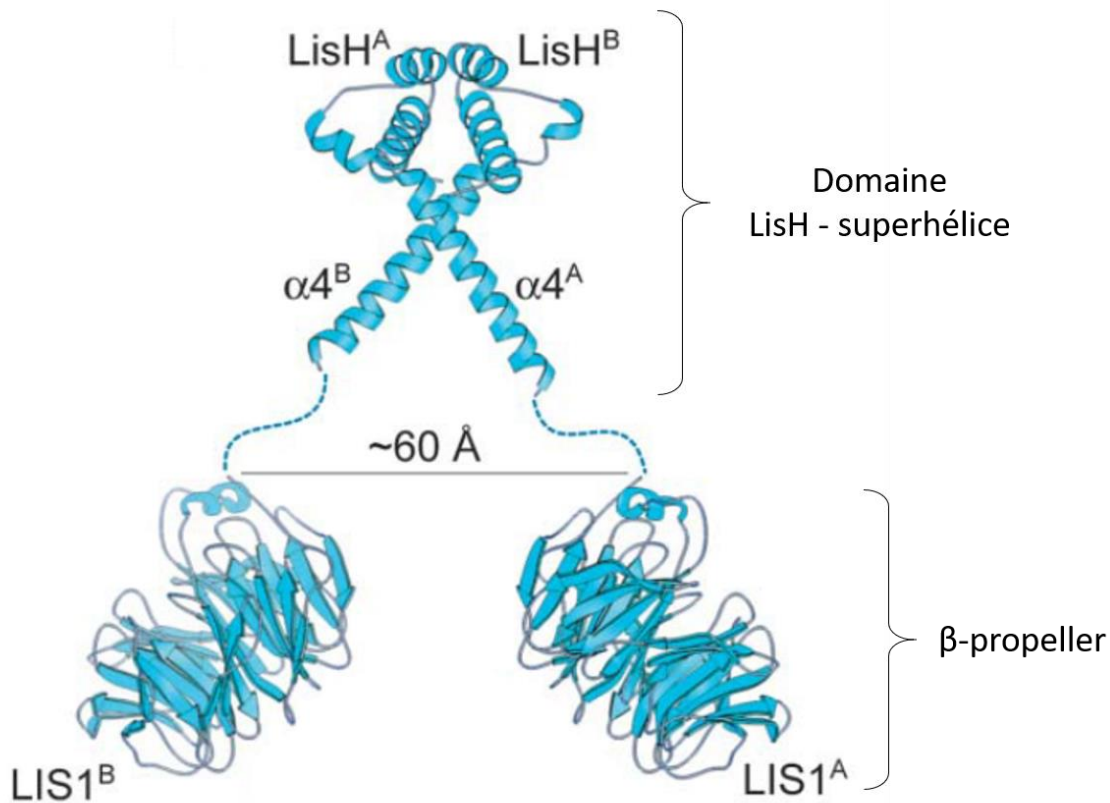


**Figure 32 : Structure du gène LIS1.** Le gène possède deux domaines fonctionnels : un domaine qui sera qualifié de domaine d'homologie à Lis1 (Lis1H) superhélice en N-terminal, et un domaine  $\beta$ -propeller composé de 7 domaines de répétition WD40, en C-terminal (A). La taille en pb de chaque exon et chaque intron est indiqué en bas de la figure (B) (*adaptée de Leventer et al., 2001; Lo Nigro et al., 1997*).

En effet, LIS1 est généralement trouvée en homodimère *in vivo* (Garcia-Higuera et al., 1996), et cette homo-dimérisation est cruciale pour sa fonction (Mateja et al., 2006; **Figure 33**). La délétion du premier exon de *Lis1* chez la souris entraîne l'expression d'une protéine tronquée à partir de la deuxième méthionine, et ceci empêche le domaine N-terminal de correctement se former, et perturbe la migration neuronale et l'organisation des RGs (Cahana et al., 2001). Le domaine LisH serait également crucial au maintien de la protéine, des mutations dans ce dernier réduisent la demi-vie de LIS1 et altèrent sa localisation cellulaire (Gerlitz et al., 2005). Certaines mutations faux-sens touchant le gène LIS1 peuvent se trouver dans ce domaine N-terminal (Kim et al., 2004).

En C-terminal (section codée par les exons 5 à 11) se trouvent 7 domaines de répétition WD40 qui forment un domaine  $\beta$ -propeller (hélice) composé de 7 pales. Le domaine WD est une séquence de 40 à 60 résidus contenant le dipeptide WD en C-terminal, et représente un des domaines fonctionnels les plus couramment trouvés dans le génome des eucaryotes (Letunic et al., 2015). Les structures  $\beta$ -propeller entraînent des replis dans la structure tridimensionnelle des protéines, et servent de plateforme pour permettre des interactions protéine-protéine multiple (Stirnemann et al., 2010; Xu and Min, 2011). Les domaines de répétition WD40 n°3, 6, avec le domaine N-terminal, jouent également un rôle dans la dimérisation de LIS1, impliquant le  $\beta$ -propeller également dans ce processus (Caspi et al., 2003).

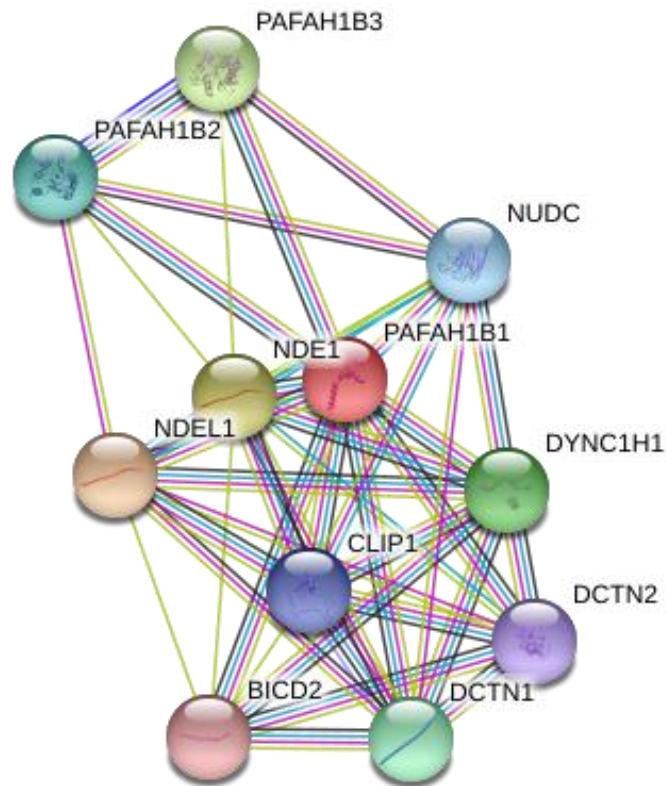




**Figure 33 : Structure tridimensionnelle d'un homodimère de LIS1.** L'interaction des deux protéines LIS1 se fait via le domaine N-terminal, grâce au domaine LisH. Le domaine superhélice joue le rôle de linker entre les domaines LisH et le domaine C-terminal, et il est composé de 4 hélices  $\alpha$ . L'interaction de LIS1 et ses partenaires se fait via le côté C-terminal grâce aux domaines  $\beta$ -propeller (adaptée de Tarricone et al., 2004).

En effet, l'interaction de LIS1 avec ses partenaires est médiée par le  $\beta$ -propeller, grâce auquel LIS1 interagit avec, pour ne nommer qu'eux, PAFAH1B2 et PAFAH1B3 (Tarricone et al., 2004), DYNC1H1 (la chaîne lourde de la dynéine, Faulkner et al., 2000; Smith et al., 2000), NDE1 (*Nuclear distribution protein nudE homolog 1*, impliquée dans la duplication du centrosome et la formation du fuseau mitotique, Pawlisz et al., 2008; Liu et al., 2018), NDEL1 (*Nuclear distribution protein nudE-like 1*, impliquée dans l'organisation des microtubules et leur ancrage au centrosome, Sasaki et al., 2000), NUDC (protéine impliqué dans la motilité nucléaire, Morris et al., 1998), DCX (Caspi et al., 2000), CLIP-170 (*CAP-Gly domain-containing protein*, protéine permettant le ciblage au pôle plus des microtubules, Coquelle et al., 2002), DCTN1 et DCTN2 (sous-unités 1 et 2 de la dynactine, protéine activatrice de la dynéine impliquée dans presque toutes ses fonctions Payne et al., 2003; Siller et al., 2005) et BICD2 (*bicaudal D homolog 2 protein*, protéine adaptatrice entre la dynéine et ses différents cargos, Splinter et al., 2012) (**Figure 34**). Cependant, la dimérisation de LIS1, médiée par le domaine N terminal, semble indispensable pour l'interaction de LIS1 avec ses partenaires. En effet, pour interagir avec les sous-unités  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 de la PAFAH, LIS1 requiert les domaines LisH-superhélice et les domaines de répétitions WD40 n°2, 3 et 7. Je reviendrai en détail sur l'interaction fonctionnelle de la dynéine avec LIS1 dans la dernière section de l'introduction, de manière à faire le lien entre les mécanismes subcellulaires et les pathologies induites pas les mutations dans *LIS1*. La majorité des mutations faux-

sens de *LIS1* identifié chez les patients se trouvent dans les répétitions WD40, ce qui d'une part suggère l'importance du  $\beta$ -propeller dans la fonction de la protéine, et d'autre part semble évident, puisque la séquence ADN dédiée au  $\beta$ -propeller représente la majorité du cadre de lecture ouvert.



**Figure 34 : Interactome de LIS1.** DCX n'apparaît pas sur cet arbre, mais interagit bien avec LIS1. Lien rouge : données de fusion de gènes, rose : données expérimentales, noir : données de co-expression, violet : données d'homologie, bleu clair : données provenant de bases de données, jaune : données de la littérature présentant les deux protéines liées, lien vert : voisins dans le génome (*string-db.org*)

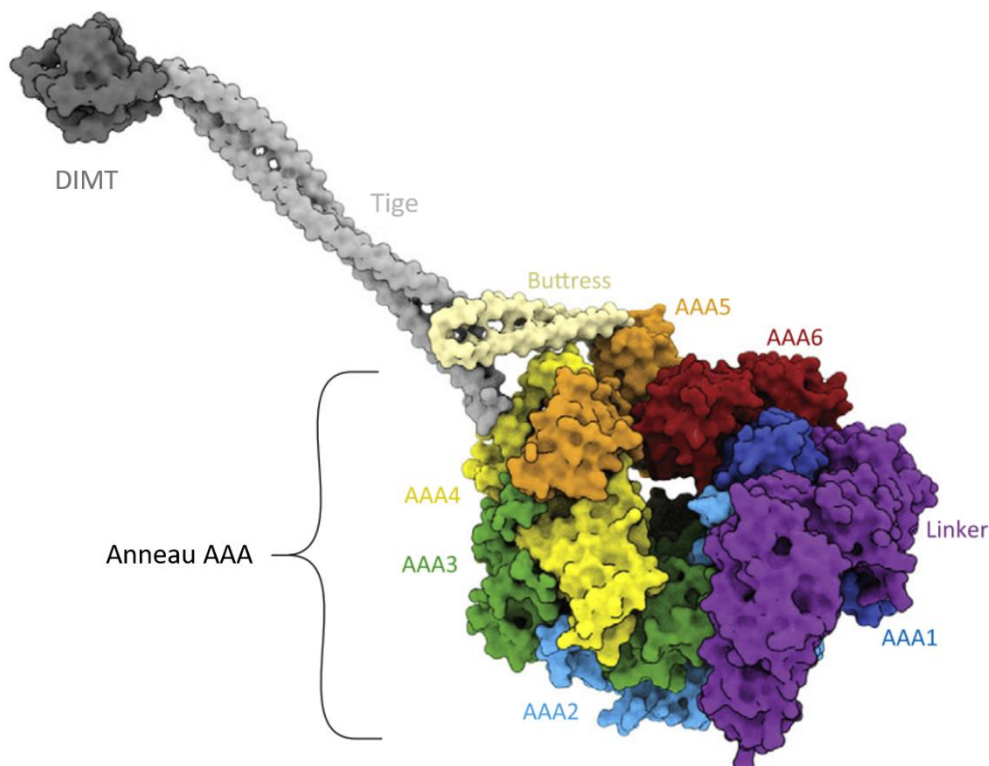
## b) Régulateur de l'activité de la dynéine

Comme mentionné de nombreuses fois durant cette thèse de doctorat, LIS1 régule l'activité de la dynéine. Pour mieux comprendre cette fonction de LIS1, ce chapitre se focalisera donc sur la dynéine. Je décrirai sa structure, ses fonctions, et en quoi LIS1 module ses fonctions.

La dynéine est une protéine associée aux microtubules (Paschal and Vallee, 1987), qui joue le rôle de protéine motrice associée au transport de cargos et organelles vers le pôle - des microtubules, et a donc une action opposée aux kinésines qui migrent vers le pôle +. Autre caractéristique la distinguant des autres protéines motrices comme les kinésines et myosines, la dynéine-1 est le seul membre cytoplasmique de cette famille présent chez les eucaryotes (Wickstead and Gull, 2007). La dynéine-2 a des fonctions dans les cils et flagelles (Hou and Witman, 2015, **Figure 4**). La dynéine est complexe macromoléculaire de 1.4 MDa fonctionnant en dimère et composée d'au moins 8 chaînes

polypeptidiques. Parmi ces chaînes, la chaîne lourde, la plus volumineuse (500 kDa), est composée de deux régions fonctionnelles : la queue, responsable de la dimérisation de la protéine, de l'association des autres sous-unités de la dynéine et des cargos qu'elle va transporter, et le domaine moteur, qui s'associe au microtubule et hydrolyse l'ATP pour engager la processivité de la dynéine. Le gène codant ce chaîne montrent des mutations chez des patients atteints des malformations corticales et/ou d'autres maladies neurologiques (Poirier et al., 2013; Schiavo et al., 2013).

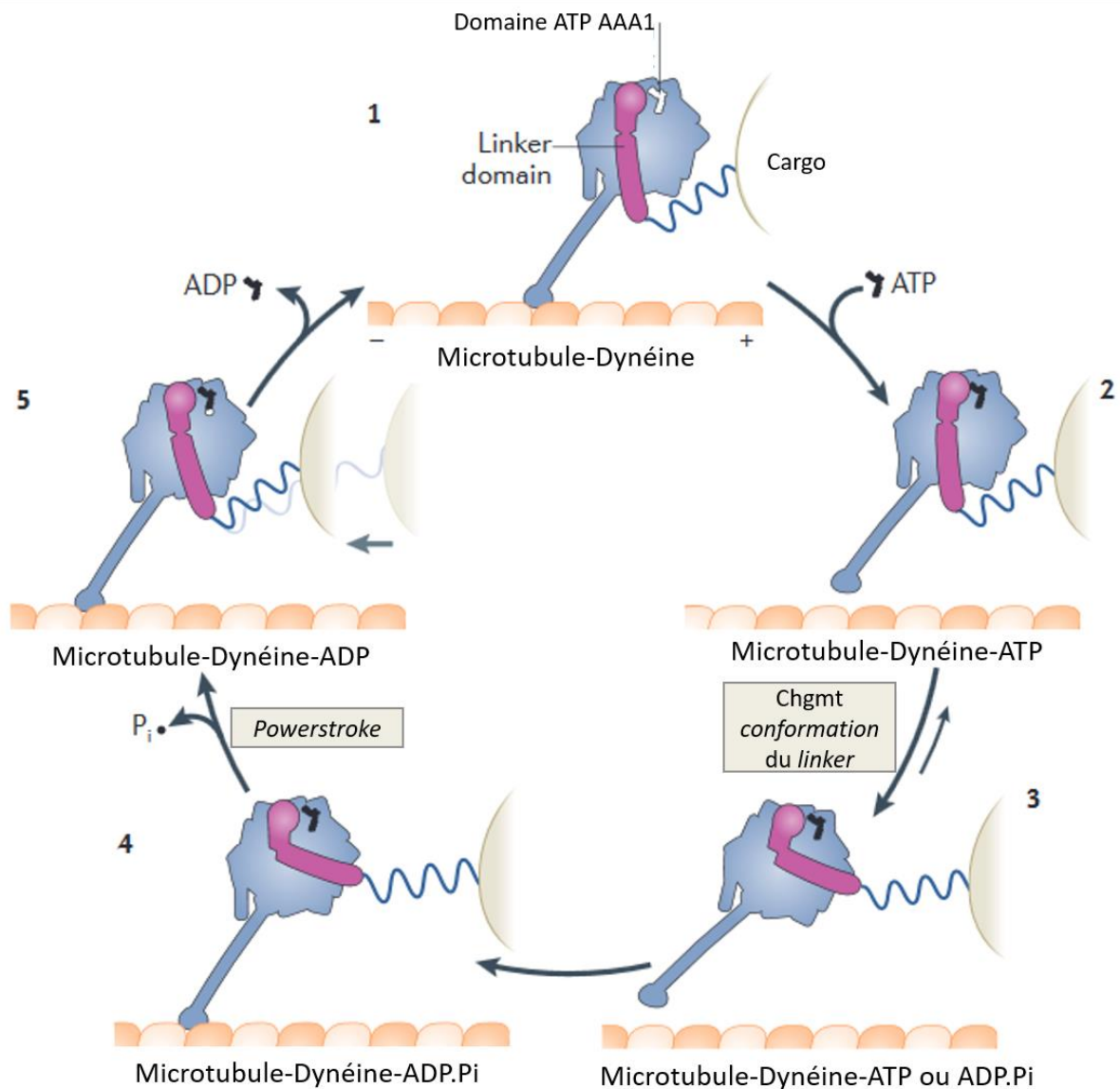
Le domaine moteur possède une structure complexe, composé de 6 régions AAA+ (ATPase associée à des activités cellulaires variées) nommées de 1 à 6 et agencée en anneau (Cianfrocco et al., 2015). Le domaine AAA1 est le domaine principal d'hydrolyse de l'ATP, et il est nécessaire pour l'activité motrice de la dynéine (Kon et al., 2004). Les autres domaines capables de lier l'ATP et l'hydrolyser sont les sites AAA3 et 4, mais ils permettent uniquement de réguler l'activité motrice de la dynéine. Le domaine d'interaction aux microtubules de la dynéine réside au bout d'une tige formée d'une région superhélice *coiled-coil* émergeant du domaine AAA4. Enfin, autre région importante, le *linker* se trouve en N-terminal du domaine moteur et change de conformation en fonction de l'état nucléotidique de la sous-unité AAA1 et permet de générer une force mécanique permettant la mobilité de la dynéine (Burgess et al., 2003, **Figure 35**).



**Figure 35 : Architecture tridimensionnelle de la chaîne lourde de la dynéine.** La chaîne lourde est composée d'un anneau de 6 domaines AAA, d'une tige émanant du domaine AAA4 et d'un domaine d'interaction aux microtubules (DIMT). Le *linker* est présent au niveau N-terminal de la protéine, au niveau du site AAA1. Enfin, le *buttress* (littéralement aqueduc), est une structure de soutien pour la tige (*adaptée de Bhabha et al., 2016*).

Le principe fondamental du cycle mécano-chimique de la dynéine repose sur des changements conformationnels dépendant de l'état de liaison aux nucléotides purinergiques du domaine moteur (Bhabha et al., 2016; Cianfrocco et al., 2015; Roberts et al., 2013, **Figure 36**). Sans ATP au site AAA1, la dynéine est fortement associée aux microtubules. L'association d'ATP au site AAA1 induit des changements conformationnels de l'anneau et du *linker* et induit une diminution de l'affinité de la dynéine pour les microtubules. L'hydrolyse de l'ATP au site AAA1 fait avancer la tige du domaine d'interaction aux microtubules vers le pôle - et force l'interaction de la dynéine avec les microtubules, et la libération du phosphate inorganique du site AAA1 entraîne un mouvement de force du *linker* (appelé *powerstroke*) qui fait basculer la queue, les autres sous-unités de la dynéine et les cargos vers l'avant. L'ADP peut ensuite être libéré, et le domaine moteur est prêt à réaliser un nouveau cycle. Le cycle mécano-chimique de la dynéine est présenté en plus de détails dans Cianfrocco et al., 2015.

De nombreuses études *in vitro* ont permis d'étudier les mécanismes fonctionnels de l'interaction de LIS1 avec la dynéine, avec des résultats parfois contradictoires en fonction des isoformes et des modalités des protocoles utilisés. En effet, des données montrent que Lis1 (forme bovine) permet de stimuler l'activité enzymatique de la dynéine, avec une augmentation de l'hydrolyse de l'ATP, suggérant une stimulation de l'activité motrice. Pourtant, il sera montré plus tard que LIS1 interagit avec l'anneau de la chaîne lourde de la dynéine au niveau des domaines AAA3/AAA4 et perturbe les changements conformationnels du *linker* qui sont absolument nécessaires pour une processivité normale de la dynéine (Huang et al., 2012), entraînant un état de forte affinité de la dynéine avec les microtubules, et limitant la vitesse de processivité de la protéine (McKenney et al., 2010). LIS1 se fixe donc à ce domaine grâce à un deux domaines  $\beta$ -propeller du dimère, et cette interaction induit le maintien d'une conformation semblable à celle présente lorsqu'il n'y a pas d'ATP associé au domaine AAA1 (Toropova et al., 2014). J'ai mentionné plus tôt qu'en fonction des nucléotides associés au cycle AAA, la conformation, l'affinité pour les microtubules et donc la mobilité de la dynéine varie. Ceci est également vrai lorsque LIS1 est associée. En effet, LIS1 a des effets variables en fonction de l'état du site AAA3 (DeSantis et al., 2017). Lorsque LIS1 interagit avec la dynéine, si le site AAA3 est lié à l'ATP, LIS1 diminue l'affinité de la dynéine pour les microtubules et stimule la processivité de cette dernière, et si le site a hydrolysé son ATP, ou n'a pas de nucléotides associés, LIS1 promeut l'affinité et diminue l'activité motrice. Enfin, une étude récente a montré que LIS1 stimule l'initiation de l'activité motrice de la dynéine lorsqu'elle est en présence de complexes dynéine-dynactine (Htet et al., 2020). Cette étude a aussi montré que LIS1 interagit également au niveau de la tige, et permet de recruter un deuxième dimère dans des complexes dynéine-dynactine-BicD2. L'effet positif sur la migration de ces complexes avait déjà été décrit quelques années auparavant (Gutierrez et al., 2017). Pour conclure, il semblerait que LIS1 soit également cruciale pour l'adressage des complexes dynéine-EB1 (*end-binding protein 1*) au pôle + des microtubules et leur vitesse. Donc, dépendant du contexte, LIS1 pourrait avoir des effets



**Figure 36 : cycle mécano-chimique de la migration de la dynéine le long des microtubules.** Sans ATP lié au site de liaison destiné à cet effet dans le domaine AAA1, la dynéine est fortement associée aux microtubules (1). La liaison de l'ATP entraîne une diminution de l'affinité de la dynéine pour les microtubules (2) et un changement de *conformation* du *linker* qui est déplacé au-dessus de l'anneau AAA (3). L'hydrolyse de l'ATP en ADP.Pi propulse la dynéine vers l'avant (en direction du pôle - des microtubules) et entraîne une association faible entre la protéine et la tubuline (4). Le relargage du phosphate inorganique du domaine AAA1 induit la *powerstroke*, mouvement qui entraîne la queue de la dynéine et le cargo vers l'avant et entraîne une association forte entre la dynéine et les microtubules (E) (*Adaptée de Roberts et al., 2013*).

variables, dépendant donc des propriétés de la dynéine elle-même, mais également des partenaires présents dans le complexe.

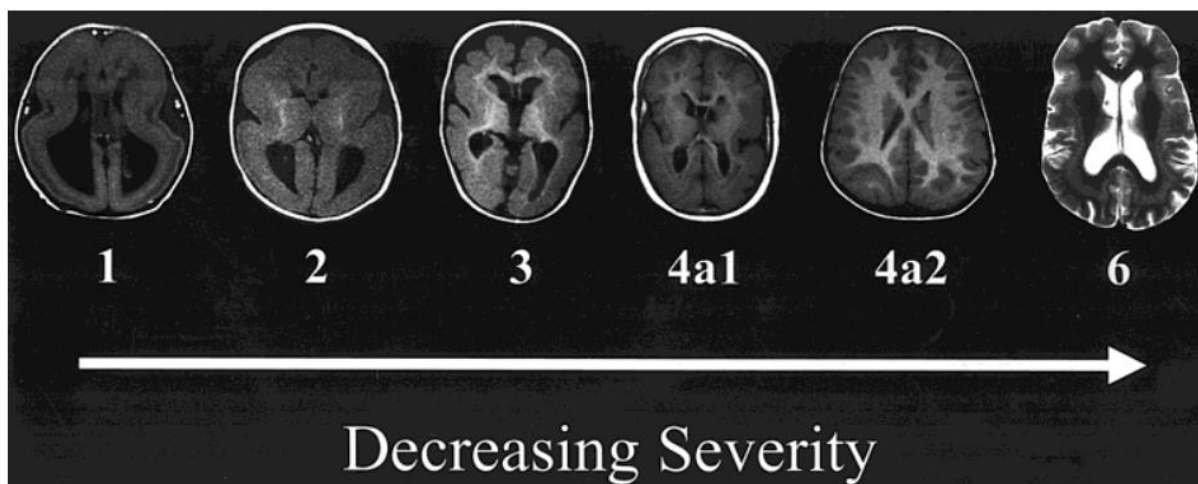
Enfin, compte tenu des nombreuses fonctions de la dynéine (Cianfrocco et al., 2015), LIS1 a une importance dans de multiples processus cellulaires, tels que, comme nous l'avons vu plus tôt, la vélocité et l'affinité de la dynéine pour les microtubules (Huang et al., 2012; Jha et al., 2017; Splinter et al., 2012; Yamada et al., 2013), l'adressage de la dynéine au pôle + des microtubules (Baumbach et al., 2017; Li et al., 2005; Markus et al., 2009; Yamada et al., 2008) et la stabilisation du cargo transporté par la dynéine (Egan et al., 2012; Pandey and Smith, 2011). Enfin, de par son interaction avec cette protéine motrice, LIS1 est également impliquée dans des fonctions cellulaires importantes pour le

développement cortical, telles que la migration nucléaire (Bertipaglia et al., 2017; Lei and Warrior, 2000; McInnes et al., 2007), l'orientation du fuseau mitotique et la division cellulaire (Cockell et al., 2004; di Pietro et al., 2016).

### c) Neuropathologie : mutations du gène *LIS1* et lissencéphalies

*LIS1* est donc le gène le plus couramment impliqué dans les LIS. Le clonage et séquençage du gène en 1993 et le développement de sondes génétiques a permis de détecter de nombreuses altérations génétiques hétérozygotes sur le locus du gène *LIS1*. Ces altérations incluent des mutations entraînant une haploinsuffisance de *LIS1*, soit par délétions de bases entraînant un décalage du cadre de lecture ou par délétions intragéniques, soit par mutations non-sens entraînant l'apparition d'une protéine tronquée incapable d'exercer sa fonction, ou des mutations faux-sens entraînant la production d'une protéine *LIS1* anormale, et enfin des mutations entraînant une augmentation du dosage de *LIS1* par duplication ou mutations dans les séquences régulatrices. Ces mutations se présentent principalement dans les cellules germinales, mais quelques cas portant des mutations somatiques ont été identifiés, quel que soit le type de mutation (insertion/délétion, faux-sens et non-sens). Toutes ces altérations génétiques entraînent des MCDs appartenant au spectre de la LIS, de la microlissencéphalie et des hétérotopies.

*LIS1* est délété dans le MDS, avec une vingtaine d'autres gènes (Cardoso et al., 2003; Yingling et al., 2003). On peut donc se demander la part de *LIS1* dans l'établissement du phénotype associé au MDS, sachant que certains gènes comme *YWHAE* sont également associés à des MCDs et des perturbations de développement cortical (Toyo-oka et al., 2003). Mais comme mentionné plus haut, plusieurs patients MDS et atteint d'ILS possèdent des délétions partielles au locus de *LIS1* (Lo Nigro et al., 1997). De plus, les patients MDS se caractérisent par des déformations faciales qui sont absentes du tableau neuroanatomique des patients ILS, suggérant que *LIS1* est responsable de la LIS, et les autres gènes des autres phénotypes associés au syndrome MDS (Chong et al., 1997). Enfin, la majorité des ILS causées par des mutations de *LIS1* ont un phénotype présentant un gradient de sévérité postéro-antérieur (Di Donato et al., 2017; Saillour et al., 2009). On peut classer ces MCDs par un grade allant de 1 à 6 (Cardoso et al., 2002; **Figure 37**).



**Figure 37 : Méthode de classement des LIS en fonction de leur sévérité, représentée par des images IRM de patient ayant des délétions ou des mutations de LIS1.** « Grade 1 : agyrie complète, grade 2 : agyrie postérieure et sulci antérieur peu profond, grade 3 : agyrie postérieure et pachygyrie antérieure, grade 4a : pachygyrie généralisée avec gradient postéroantérieur, grade 4b : pachygyrie postérieure et normogyrie antérieure, grade 6 : SBH. ». A noter que des grades intermédiaires pour les grades 2 et 3 (2a, 2b, 3a, 3b) seront définis plus tard pour caractériser avec plus de précisions les différents niveaux de sévérité des LIS (Cardoso et al., 2002).

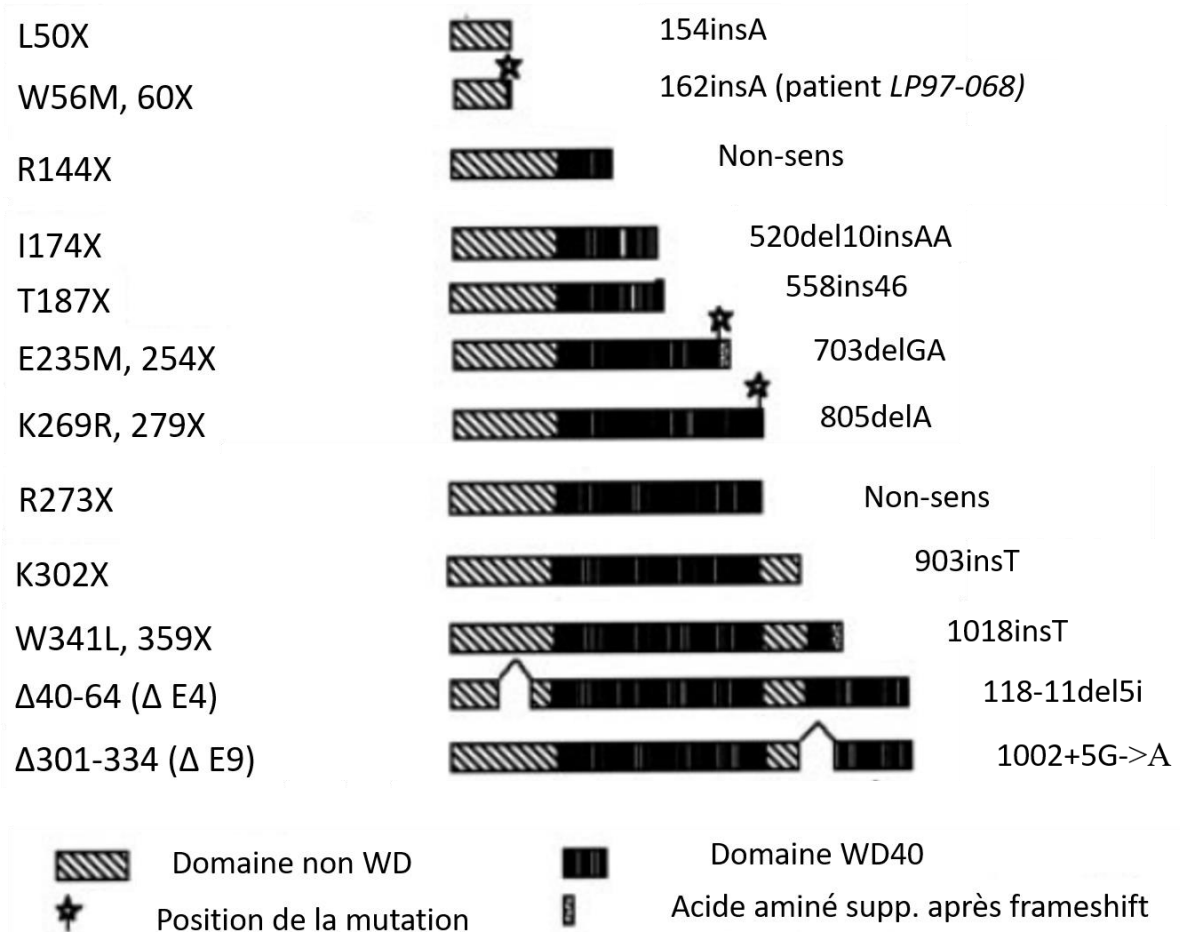
La fonction de LIS1 semble être particulièrement sensible au dosage (Fogli et al., 1999). En effet, de nombreuses mutations entraînent soit une diminution de l'expression de *LIS1*, soit l'expression d'une protéine tronquée liée à un décalage du cadre de lecture ou une altération de l'épissage introduisant un codon-stop. Il est fort probable que les protéines LIS1 mal conformées soient dégradées et les ARNm de *LIS1* aussi via dégradation des ARNm non-sens (Lykke-Andersen and Jensen, 2015). Certaines duplications peuvent également entraîner une augmentation du dosage de *LIS1*, associées aux patients présentant un retard dans le développement (Bi et al., 2009).

Bien que proposé initialement (Cardoso et al., 2000), il ne semble pas y avoir de corrélation génotype-phénotype claire pour les pathologies LIS1 (Saillour et al., 2009; Tan et al., 2018). Ce qui est encore plus particulier est qu'il n'y a pas forcément de cohérence entre les phénotypes observés entre deux patients atteints de la même mutation. Ce chapitre servira donc d'un recueil d'informations sur les différentes analyses de cas au cours des années, et nous verrons au cours de ce chapitre la grande hétérogénéité de phénotypes que les mutations de *LIS1* peuvent induire, représentant un véritable spectre de MCDs.

#### *i) Délétions, insertions, altération du cadre de lecture et de l'épissage*

Les premières études qui se sont proposées d'étudier un groupe de patients par dépistages par hybridation *in situ* ont suggéré que les mutations par délétion représentent la majorité des cas d'ILS (40% dans Pilz et al., 1998; 45% dans Cardoso et al., 2002). Comme mentionné plus haut, nombreuses de ces délétions entraînent l'apparition prédite de protéines tronquées par l'apparition d'un codon-stop (**Figure 38**). De plus, certaines mutations non-sens furent révélées. Parmi les 41 patients de l'étude de

Cardoso et al., 2002, la majorité des mutations intragéniques est localisée dans les séquences codantes des exons 8, 9 et 10, qui codent pour les domaines WD40 4, 5 et 6. Plus tard, l'étude de Saillour et al., 2014 montrera des cas avec des mutations intervenant sur presque l'intégralité du gène *LIS1*. Globalement, les délétions complètes du gène entraînent des LIS extrêmement sévères de manière similaire au MDS, avec un grade 1 à 2, alors que les délétions intragéniques, qu'elles consistent en une délétion de quelques bases ou d'exons entiers, et les insertions sont classées dans les LIS de classes 2 et 4 avec une agyrie postérieure et une pachygyrie antérieure (Fogli et al., 1999; Cardoso et al., 2000, 2002; Haverfield et al., 2009; **Figure 39**).



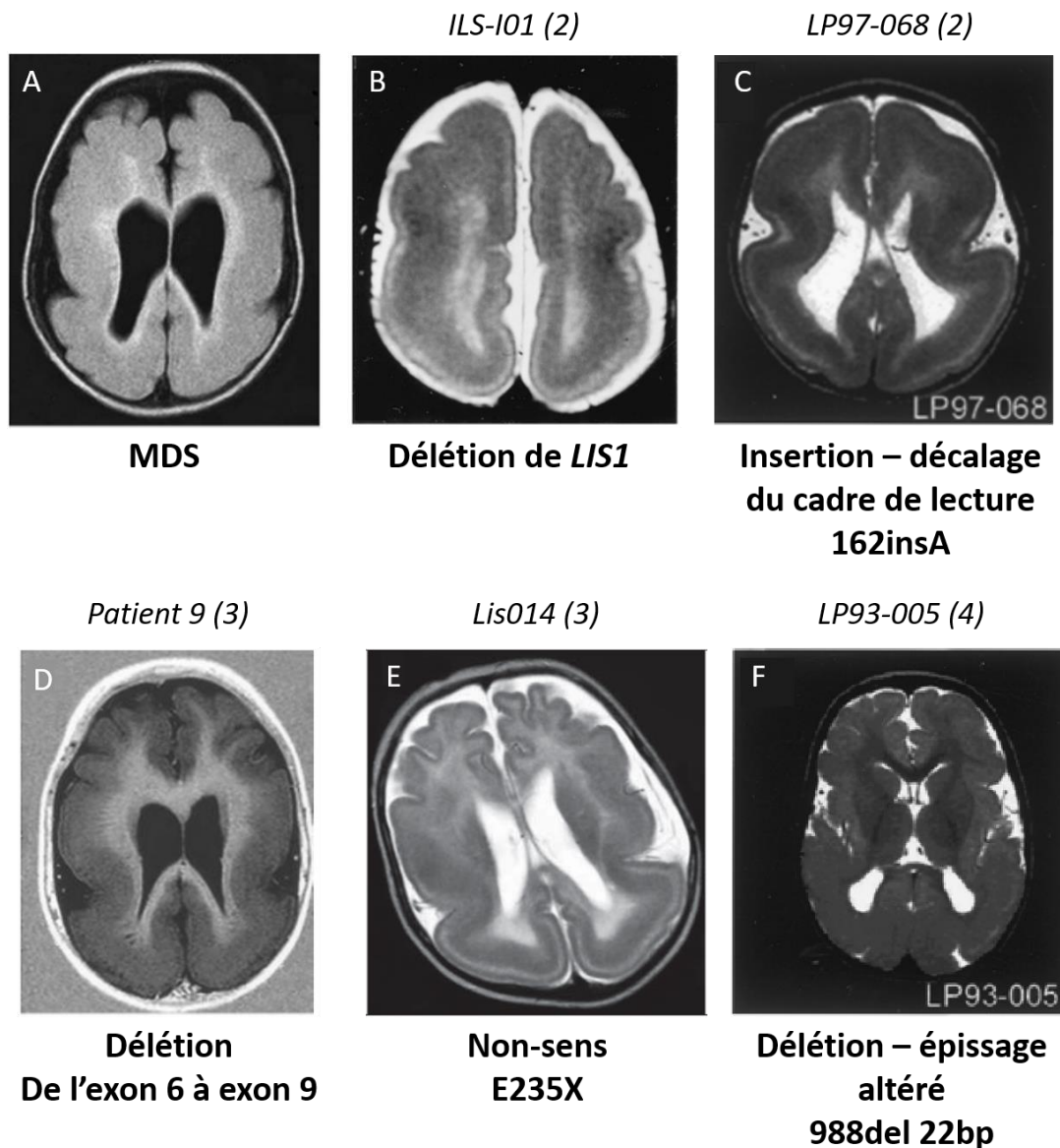
**Figure 38** : Représentation schématique de l'effet de quelques mutations de types délétion, insertion ou faux-sens identifiées chez des patients ILS sur la protéine *LIS1*. Le codon-stop ou la fin du gène causé par les délétions, insertions ou mutations non-sens est indiqué pour chacune des mutations (*adaptée de Sapir et al., 1999*).

Les différentes mutations de délétion et d'insertion identifiées chez des patients incluent donc : des délétions complètes du gène *LIS1* (Fogli et al., 1999) ; des délétions des exons 6 à 9, des exons 8 à 9 ou des exons 2 à 9, suggérant une zone de fragilité au niveau de la région codant pour le 9<sup>ème</sup> exon ; des délétions incluant des segments de gènes avoisinant *LIS1* comme de l'intron 3 de *LIS1* à l'exon 7 de *KIAA0664* représentant 331.9 kb (Mei et al., 2008) ; des délétions ou insertions de paires de bases uniques ou d'ensembles plus ou moins grands de paires de bases comme la délétion 988del22bp



induisant un problème d'épissage de l'exon 2, la délétion 805delA entraînant un décalage du cadre de lecture et faisant apparaître un codon-stop au résidu 279X, l'insertion intronique 1159+3 bp ins CA, entraînant des défauts d'épissages des exons 10 et 11 ou l'insertion 162insA entraînant un décalage du cadre de lecture et faisant apparaître un codon-stop prématuré au 60<sup>ème</sup> résidu ; la mutation c.569-10T>C dans le site accepteur de l'épissage de l'intron 7 (Philbert et al., 2017) ; ou encore des mutations non-sens comme les mutation R89X, R113X, R144X, K175X, C226X, R273X et S289X. Plus d'une quarantaine de mutations différentes sur *LIS1* ont été identifiées (Lo Nigro et al., 1997; Sapir et al., 1999; Cardoso et al., 2002; Saillour et al., 2009, **Figure 38**).

Comme mentionné plus haut, dans l'introduction de ce chapitre, aucune corrélation génotype-phénotype n'est possible lorsqu'il s'agit des mutations touchant *LIS1*, et ceci est aussi vrai lorsqu'il s'agit de diverses formes de protéines tronquées. En effet, on pourrait s'attendre naïvement à ce que l'haploinsuffisance de LIS1 ait les mêmes conséquences, que cette diminution d'expression soit liée à une délétion complète du gène, ou à l'expression d'une protéine tronquée vouée à soit ne pas être exprimée, soit être dégradée. Il n'en est rien : les études de Saillour et al., 2014 et Mei et al., 2008 nous proposent un panel très complet avec tous les types de mutations et on peut y voir que la position des codons-stop précoces ou tardifs n'ont pas d'incidence sur la sévérité de la LIS observée. De plus, on peut y voir dans le tableau 1 de Saillour et al. que les patients Lis010/F/2 et Lis011/M/27 présentent tous deux une mutation R144X dans la transition entre les domaines WD 1 et 2. Pourtant, le patient Lis010/F/2 présente une LIS de grade 2 avec microcéphalie (circonférence de la tête au 25 percentile), et le patient Lis011/M/27 présente une pachygyrie avec SBH et normocéphalie. La même remarque peut se faire en comparant les deux études en ce qui concerne les délétions intragéniques affectant un nombre plus ou moins grand d'exons, il n'y a pas de correspondance claire entre la taille ou la position de la délétion. Enfin, la mutation 162\_163insA a induit une LIS de grade 3 et une de grade 4 dans deux patients différents (Saillour et al., 2009; Uyanik et al., 2007).



**Figure 39 :** Panel d'images IRM axiales de patients atteints de différents types de mutations. A) Patient MDS (Mei et al., 2008). B) Délétion complète du gène LIS1 (Fogli et al., 1999). C) Insertion 162insA (Cardoso et al., 2000). D) Délétion intragénique des exons 6 à 9 (Mei et al., 2008). E) Mutation non-sens (Saillour et al., 2014). F) Délétion 988del 22pb (Cardoso et al., 2000). Le code ou identité du patient comme indiqué dans l'étude d'origine accompagné du degré de sévérité apparaissent au-dessus de l'image.

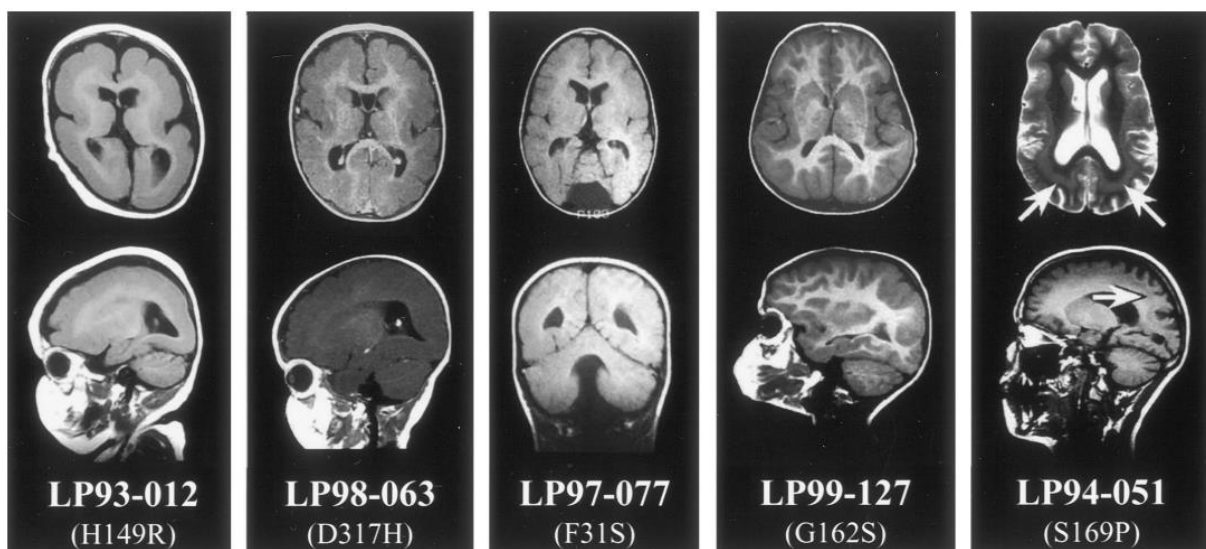
ii) *Duplications, augmentation d'expression*

Les duplications de *LIS1* sont plus rares que les autres types de mutations, mais certains cas ont pu être identifiés. Les duplications, à l'instar des délétions impliquées dans le MDS, peuvent impliquer le locus 17p13.3, et donc les gènes *LIS1* et *YWHAE*, ainsi que les autres gènes du MDS (Blazejewski et al., 2018). Cela étant dit, certains patients présentent une duplication de *LIS1* (duplication de segments de 336.9 à 408.1 kb), et présentent comme phénotype un retard de développement léger à sévère (poids inférieur de 3 à 5 écart-types à la moyenne et taille inférieure de 3.5 à 6 écart-types de la moyenne), une hypotonie, des déficits intellectuels et dysmorphie faciales avec microcéphalie, mais pas de LIS (Bi et al., 2009). Un patient avec une duplication de l'intron 1 uniquement présente un phénotype très

semblable à celui d'une duplication du gène (Lockrow et al., 2012). Nous verrons lors du chapitre suivant sur les modèles animaux que les introns peuvent jouer un rôle important dans le niveau d'expression du gène.

### iii) Mutations faux-sens

Enfin, bien que plus rares que les délétions et insertions, certains patients avec des mutations faux-sens ont été identifiés. Les mutations identifiées dans le domaine superhélice sont les mutations F31S (grade 4a) et L51S (grade 4a avec microcéphalie). Celles identifiées dans le domaine WD40 2 sont les mutations H149R (grade 2a à 3a), G162S (grade 4a), S167F (grade 2a), S169P (grade 6a). Les mutations dans le domaine WD3 incluent W177C (grade 2a), la D213V (grade 4a), W219G (agyrie-pachygyrie avec gradient postéro-antérieur, données supplémentaires de Di Donato et al., 2018) et W219R (cas particulier d'une famille avec une mère et un fils tous les deux affectés, De Vita et al., 2018). Peu de mutations ont été identifiées dans les domaines WD4, 5 et 6, on retrouve les mutations L248P à la transition 4-5 (agyrie-pachygyrie avec gradient postéro-antérieur, données supplémentaires de Di Donato et al., 2018), D317H (grade 4a) dans le domaine WD40 n°5 et C356R (grade 2) dans le domaine 6. Enfin, pour le domaine WD40 7, les mutations V383F (somatique, grade 4), D387N (grade 3a) et S399R (grade 2) ont été identifiées. Comme pour les insertions/délétions et mutations non-sens, tout le spectre de sévérité des LIS se retrouvent dans ces mutations faux-sens, allant de LIS sévères à un phénotype de SBH (**Figure 40**). De plus, des mutations dans les mêmes domaines peuvent entraîner des phénotypes très différents, comme les mutations touchant le deuxième domaine de répétition WD40.



**Figure 40** : Panel d'images IRM en pondération T1 axiales et sagittales de 5 patients portant 5 mutations différentes. Tous les patients présentent un gradient de sévérité postéro-antérieur, cohérent avec les LIS affectant le gène *LIS1*. Le patient LP93-012 présente une LIS de grade 3a. Le patient LP98-063 présente une LIS de grade 4a. Le patient LP97-077 présente une LIS de grade 4a avec un hypoplasie du vermis cérébelleux. Le patient LP99-127 présente une LIS de grade 4a avec normocéphalie antérieure. Le patient LP94-051 présente une LIS de grade 6a avec SBH postérieure avec une relative normocéphalie antérieure (Leventer et al., 2001).

Des expériences *in vitro* ont permis d'élucider certains des effets de ces mutations faux-sens sur LIS1. Tout d'abord, elles entraînent une diminution de la stabilité de LIS1 lorsqu'elle est exprimée dans des cellules HEK 293 (Caspi et al., 2003). Cependant, toutes les mutations n'impactent pas la demi-vie de LIS1 de la même manière, la mutation F31S induit une demi-vie d'environ 2h, la mutation H149R, 10h, alors que la version sauvage de LIS1 a une demi-vie de 20h. De plus, le domaine  $\beta$ -propeller est une structure qui normalement résiste à la protéolyse légère, mais un traitement à la trypsine est plus efficace lorsque la protéine est mutée, suggérant une perturbation de la structure tridimensionnelle de la protéine. Le domaine  $\beta$ -propeller est suggéré comme jouant le rôle de plateforme d'interaction pour les protéines en possédant un. La capacité de LIS1 d'interagir avec quelques-uns de ses partenaires (NudE, NudEL, CLIP-170 et les autres sous-unité de la PAFAH) est diminuée ou empêchée dans un contexte mutant H149R, S169P et D317H (Caspi et al., 2003; Sasaki et al., 2000; Sweeney et al., 2000), suggérant un rôle important du domaine 2 et du domaine 5 pour les interaction inter-protéiques avec les partenaires de LIS1. L'acide aminé H149 est particulièrement conservé, et joue un rôle primordial dans la conformation du 2ème domaine WD40 (Sapir et al., 1999). Enfin, le domaine WD n°5 est suggéré comme permettant l'interaction de LIS1 avec la  $\beta$ -Spectrine (protéine impliquée dans la stabilité du cytosquelette d'actine) (Leventer et al., 2001). Cependant, on peut se poser la question de la pertinence de ces résultats *in vitro* lorsque l'on revient au patient. En effet, il n'est pas à l'heure actuelle confirmé que ces mutations puissent permettre l'expression d'une protéine mutée, compte tenu de la demi-vie des formes mutées de LIS1. Cela étant dit, il est difficile de concevoir un tel spectre de phénotype à sévérité variable si toutes ces mutations (faux-sens et autres) n'induisaient qu'une perte d'expression de LIS1. C'est cette considération qui met en exergue la complexité des LIS et SBH liées aux mutations de *LIS1*. Plus d'études, notamment en tirant parti de l'utilisation d'iPSCs de patients, doivent être effectuées pour nous permettre de mieux comprendre la physiopathologie et la pathogenèse des ILS.

#### d) Etudes chez des modèles animaux et humains : que sait-on des rôles de LIS1 lors du développement cortical ?

Depuis l'identification de *LIS1*, de nombreuses études publiées ont cherché à élucider les mécanismes cellulaires et subcellulaires qui sous-tendent les MCDs associées à *LIS1*. Dans ce chapitre, je décrirai les résultats principaux d'études primordiales qui ont permis une meilleure compréhension des rôles de LIS1 dans les processus impliqués lors du développement cortical. La première étude *in vivo* utilisant un modèle de souris mutante pour *Lis1* sera publiée en 1998 (Hirotsume et al., 1998). En effet, la souris est un puissant outil d'étude du développement cortical car, malgré les différences de taille et anatomiques, les processus du développement murin font fortement écho au développement humain (Molnár et al., 2006). De plus, le gène murin *Lis1* est extrêmement proche de son homologue humain (Péterfy et al., 1994), et il est exprimé lors du développement cortical et chez l'adulte, comme

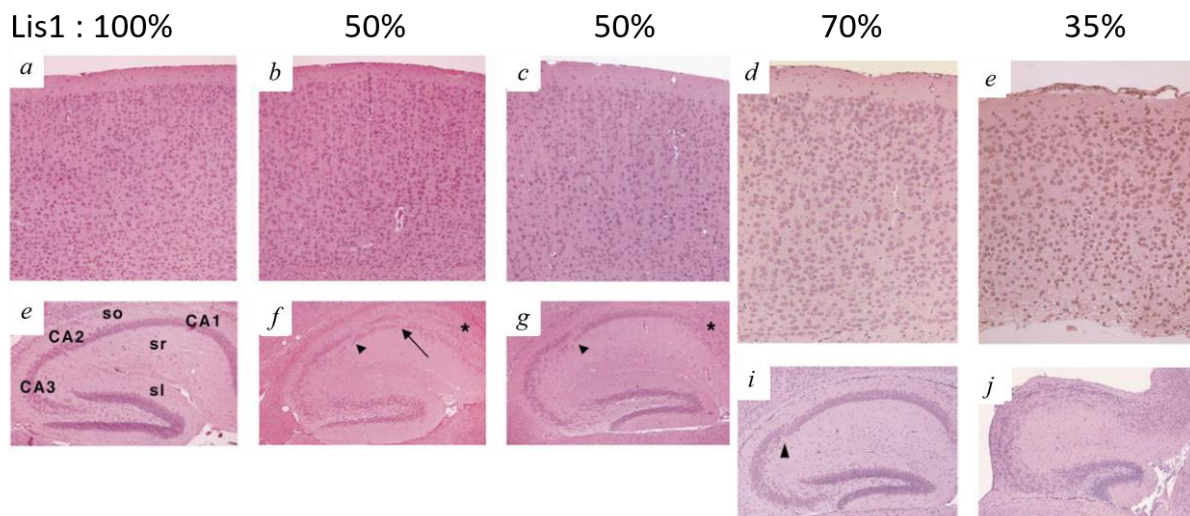
chez l'homme (Reiner et al., 1995). Plusieurs allèles mutés seront générés : tout d'abord un allèle contenant une cassette PGK-Neo (utilisé pour la sélection des cellules souches embryonnaires portant l'allèle modifié) positionnée sur une partie de l'exon 6 et tout l'exon 7, résultant en l'expression d'une protéine tronquée (*Lis1*<sup>-</sup>) ; un allèle avec la cassette PGKNeo dans l'intron 2 et deux sites LoxP dans l'intron 2 et l'intron 6 (allèle floxé, *Lis1*-Neo<sup>F</sup>); et un allèle pour lequel la séquence flanquée des deux sites LoxP est délétée par l'expression ubiquitaire de la Cre très précocement durant le développement embryonnaire en croisant les animaux *Lis1*-Neo<sup>F</sup> avec des souris Ella-Cre (*Lis1*-del, équivalent à *Lis1*<sup>-</sup>). Les animaux hétérozygotes de chaque génotype sont viables, en bonne santé et se reproduisent de manière mendélienne. Ce résultat présente déjà une différence fondamentale avec l'humain, chez lequel l'haploinsuffisance de *LIS1* entraîne des troubles sévères du développement. L'état homozygote KO (*Lis1*<sup>-/-</sup>) entraîne une mort au stade embryonnaire précoce. La protéine est toujours présente au stade de la segmentation embryonnaire, venant des stocks gamétiques, mais elle est déplétée au stade du blastocyste, c'est à ce moment que l'expression génique embryonnaire prend le relai en ce qui concerne *Lis1* (Cahana et al., 2003). Les blastocystes déplétés pour *Lis1* peuvent se développer *in vitro*, mais la croissance est bien plus faible que pour les contrôles, suggérant que la protéine *Lis1* n'est pas absolument nécessaire pour la prolifération des cellules de l'embryon précoce, mais qu'elle joue néanmoins un rôle dans la prolifération des cellules souches.

#### *i) LIS1 régule la migration neuronale*

L'analyse du développement cortical des hétérozygotes (*Lis1*<sup>-/+</sup> et *Lis1*-del/+) montre que l'architecture du cortex était légèrement désorganisée, et surtout l'hippocampe présente une morphologie discontinue. Un résultat inattendu et particulièrement intéressant réside dans l'analyse d'animaux *Lis1*-Neo<sup>F</sup>/*Lis1*-Neo<sup>F</sup> qui présentent un phénotype intermédiaire entre les animaux sauvages et les animaux hétérozygotes, et les animaux *Lis1* Neo<sup>F</sup>/- qui présentent un phénotype très largement affecté, avec une diminution de l'épaisseur et une désorganisation sévère du cortex, de l'hippocampe, du cervelet et des bulbes olfactifs, suggérant que la présence de la cassette PGK-Neo affecte l'expression de *Lis1*, et qu'un dosage inférieur à 50 % induirait un phénotype plus sévère (**Figure 41**). Enfin, des expériences *in vitro* ont montré que les neurones mutants sont moins motiles que les neurones sauvages.

Il sera confirmé dans une étude faisant suite à celle-ci (Gambello et al., 2003) d'une part que l'insertion de la cassette PGK-Neo dans l'intron 2 génère de manière fortuite un allèle hypomorphe, réduisant l'expression de *Lis1* d'environ 15%, les animaux *Lis1*-Neo<sup>F</sup>/- ayant donc une expression de *Lis1* de 35% du niveau contrôle. L'allèle hypomorphe est communément nommé « HC » dans la littérature, pour hypomorphe conditionnel. Et d'autre part, les auteurs confirmeront que le dosage de *Lis1* est important pour le développement du cortex murin, un dosage de 50% n'ayant pas d'effets

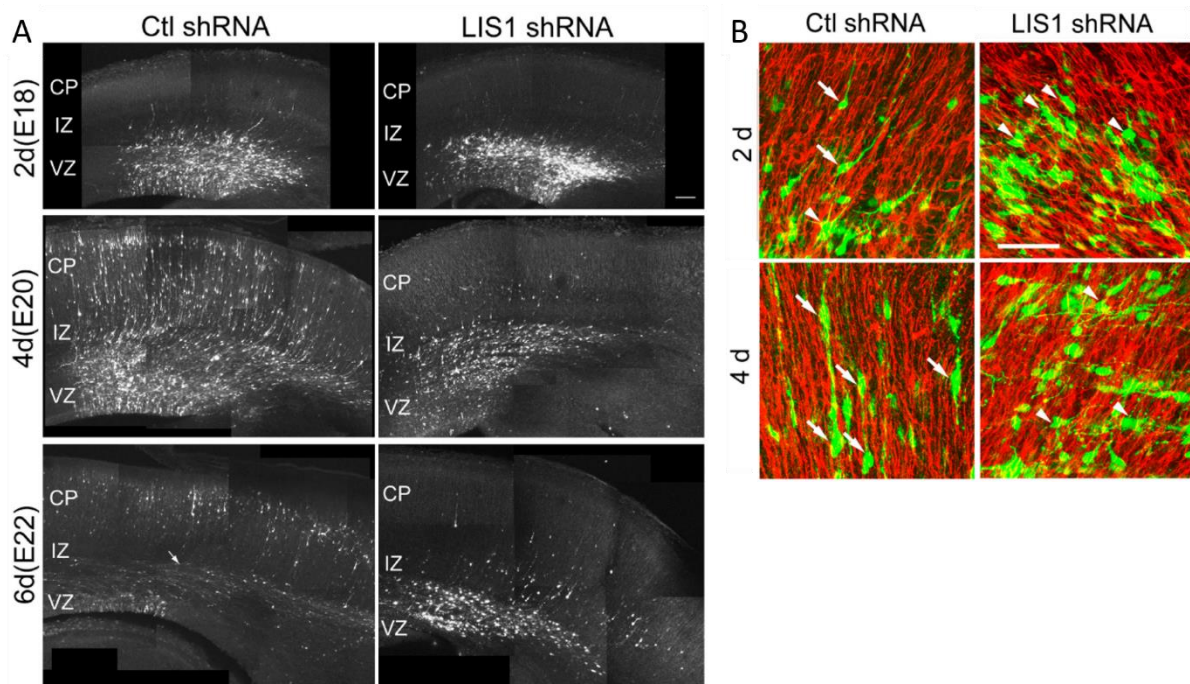
prononcés, mais diminuer en dessous de 50% entraîne un phénotype sévère, avec une désorganisation majeure des couches corticales potentiellement causée par une diminution de la production de neurones, une augmentation de la mort cellulaire, une accumulation de neurones prématures dans la VZ associée à une incapacité de ces cellules à rejoindre la CP (Gambello et al., 2003). L'étude de Cahana et al., 2001 dont nous avons déjà discuté plus haut, avait pour la première fois montré une altération de la migration neuronale, ici causée par l'expression hétérozygote d'une forme tronquée de *Lis1* sans domaine N-terminal. En ce qui concerne l'organisation des couches corticales, une délétion de *Lis1* s'accompagne d'une disparition des neurones superficiels (*Cux1+*) et d'une diminution du nombre et d'un éparpillement des neurones *FoxP1+* (couches 3/4) (Youn et al., 2009).



**Figure 41 : Anomalies morphologiques induites dans le cortex et l'hippocampe en fonction du dosage de *Lis1*.** Coupes sagittales traversant le cortex et l'hippocampe de cerveaux de souris WT (a, e), *Lis1* +/- (b, f), *Lis1* +/-del (c, g), *Lis1* Neo<sup>F</sup>/Neo<sup>F</sup> (d, i) et *Lis1* Neo<sup>F</sup>/-. (e, j). Les animaux hétérozygotes présentent une désorganisation légère du cortex et une discontinuité de l'hippocampe (tête de flèche) avec des cellules moins ordonnées en double couche (flèche). Les animaux *Lis1* Neo<sup>F</sup>/Neo<sup>F</sup> présentent un cortex relativement normal et de légères altérations de la structure hippocampique, suggérant que la présence de la cassette PGK-Neo a un effet sur l'expression du gène. Les animaux *Lis1* Neo<sup>F</sup>/- présentent de sévères altérations de la structure du cortex (formation des couches très perturbée et cortex plus petit) et de l'hippocampe (cellules encore plus éparpillées). Au dessus des images est indiqué le pourcentage restant de *Lis1* dans chacune des conditions (cette information sera obtenue plus tard dans Gambello et al., 2003. CA1, CA2, CA3 : régions 1, 2, 3 de la Corne d'Ammon (CA), so : *stratum oriens*, sr : *stratum radiatum*, sl : *stratum lacunosum-moleculare* (Hirotsune et al., 1998).

Des expériences d'interférence à l'ARN par électroporation *in utero* chez le rat à E16 ont également permis de mettre en évidence des défauts de migration neuronale lors que *Lis1* est réprimé (Tsai et al., 2005). Dans la condition contrôle, les cellules migrent progressivement des zones germinales (VZ et SVZ) à 2 jours post-électroporation, traversent l'IZ et rejoignent la CP à 4 jours, et commencent à envoyer leurs axones pour connecter leurs cibles, notamment par le corps calleux à 6 jours. Dans la condition shRNA *Lis1*, les cellules gardent grossièrement la même position à 2, 4 et 6 jours, bloquées dans la VZ/SVZ (**Figure 42Erreur ! Source du renvoi introuvable.A**). Ces cellules conservent leur expression de Tuj1 (marqueur de neurones immatures) et restent bloquées dans une morphologie multipolaire, alors que les neurones contrôlent transitionnent tous d'une morphologie multipolaire à bipolaire entre 2 et 4 jours pour permettre la migration (**Figure 42B**). Ceci suggère que les neurones sont bloqués avant l'entrée dans la phase migratoire bipolaire. Ces résultats confirment donc l'hypothèse

qu'une haploinsuffisance de *Lis1* induit une migration neuronale altérée. Les défauts de migration corticale affectent donc également les neurones hippocampiques, ces neurones n'arrivent pas à migrer correctement et sont éparpillés. De plus, la transmission synaptique des neurones est également perturbée, les souris hétérozygotes sont plus susceptibles de générer des crises d'épilepsies dans un modèle hyperkaliémique d'épilepsie (modèle  $[K^+]_o$ ) (Fleck et al., 2000). Les perturbations de la structure de l'hippocampe pourraient donc contribuer à des épilepsies dans les cas d'ILS et MDS.

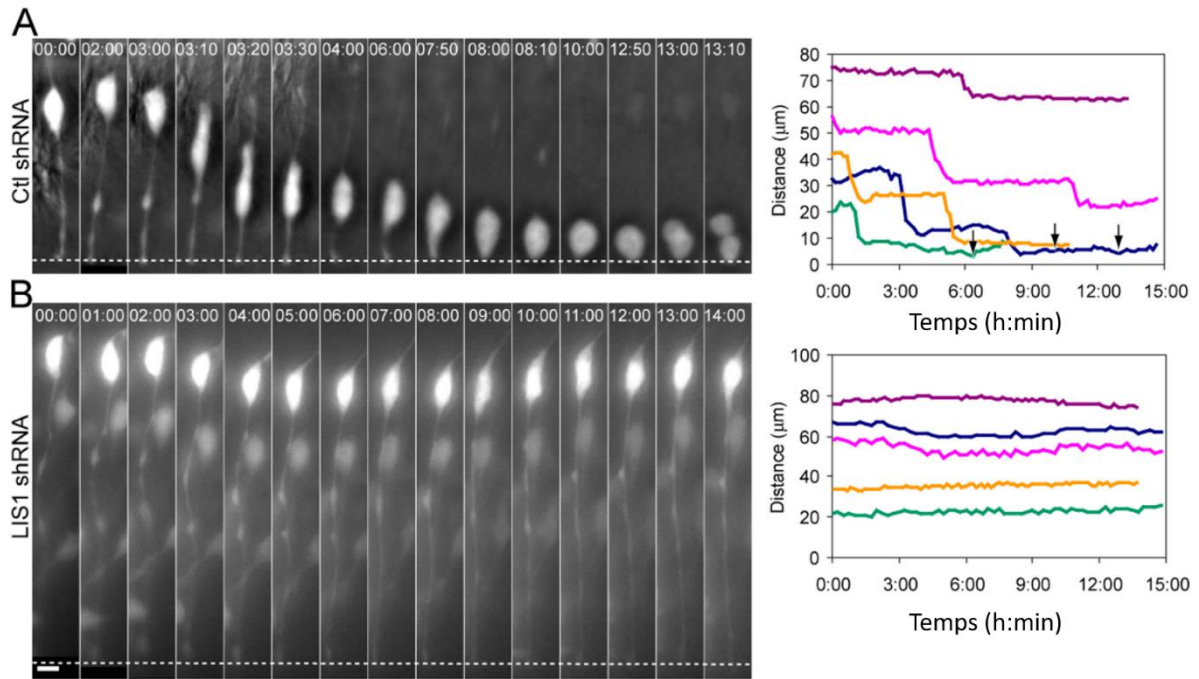


**Figure 42 : La déplétion de *Lis1* altère la morphologie des neurones et perturbe leur migration.** A, B) Coupes coronales de cerveaux de rats à E18, E20 et E22 après électroporation *in utero* à E16 d'un vecteur exprimant la GFP et un shRNA contrôle ou un shRNA *Lis1*. A) Dans le contrôle, les cellules migrent progressivement jusqu'à la CP et commencent à envoyer leurs axones vers le corps calleux (flèche). Dans la condition *Lis1* shRNA, les cellules restent bloquées dans la SVZ et l'IZ. B) Acquisition après immunofluorescence anti-GFP (vert) et anti-Nestin (rouge) pour marquer la RG. Les neurones contrôles adoptent progressivement une morphologie bipolaire leur permettant de migrer le long des fibres RG (flèches). Les neurones transfectés par le shRNA *Lis1* conservent leur morphologie multipolaire immature et ne migrent pas (têtes de flèches) (Tsai et al., 2005).

ii) *Fonction des progéniteurs apicaux : LIS1 régule l'INM, la mitose et l'acquisition du destin cellulaire des cellules filles*

La LIS a originellement été caractérisée de pathologie dépendant de trouble de la migration neuronale. Cependant, les progéniteurs pourraient tout à fait être également impliqués. En ce qui concerne LIS1, les premières études des souris mutantes pour *Lis1* ont montré des altérations du fonctionnement des aRGs. En effet, la prolifération est diminuée chez les animaux *Lis1-Neo<sup>F/-</sup>* (Gambello et al., 2003), et la répression de *Lis1* par shRNA bloque l'INM, les noyaux restent bloqués et ne réalisent que des mouvements courts et aléatoires (Tsai et al., 2005; **Figure 43**).

L'utilisation de différentes lignées Cre pour induire la déplétion de *Lis1* par recombinaison résulte en des phénotypes dont la sévérité dépend du *timing* et du patron de l'expression du Cre (Yingling

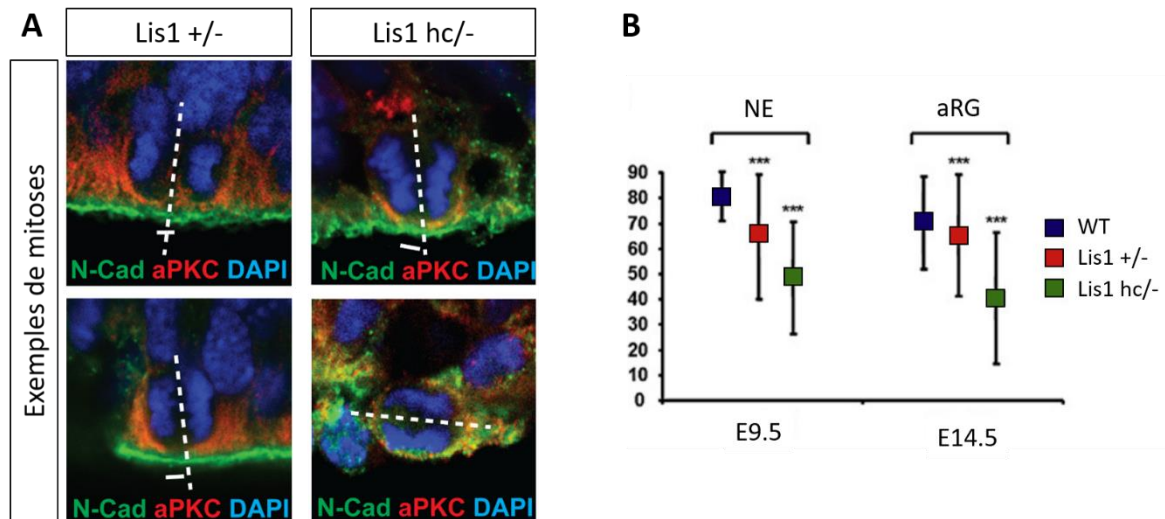


**Figure 43 : La déplétion de Lis1 bloque le soma des aRGs et empêche le déroulement normal de l'INM.** A, B) Videomicroscopie sur tranche de cerveaux électroporés par vecteur contrôle ou shRNA *Lis1*, et représentation graphique des mouvements effectués par 5 cellules dans chaque condition. Dans la condition contrôle, les cellules migrent par à-coups et rejoignent la surface ventriculaire (A), alors que les neurones réprimés pour *Lis1* restent immobiles (B) (Tsai et al., 2005).

et al., 2008). En effet l'utilisation d'une lignée Pax2-Cre ou Wnt-Cre qui exprime la Cre précocement et induit un KO homozygote entraîne des phénotypes très sévères avec l'absence du développement normal du cortex. L'utilisation d'une lignée Gfap-Cre, dont expression de la Cre commence aux alentours de E12.5 induit un phénotype beaucoup moins sévère. Ceci suggère donc que *Lis1* est absolument nécessaire pour le fonctionnement des NEs et moins pour les aRGs. Chez le mutant hypomorphique croisé avec des animaux *Emx1-Cre (Lis1-Neo<sup>F/-</sup>)*, on observe une altération drastique du neuroépithélium, avec la relocalisation ou la perte de certains marqueurs de polarité (centrosome,  $\beta$ -caténine,  $\alpha$ PKC, **Figure 44A**). Cette altération est associée à des modifications des angles du fuseau mitotique. En effet, on observe un décalage dose-dépendant des angles de mitose des NEs et des aRGs vers des angles obliques, avec également une augmentation de la variabilité des angles (**Figure 44B**). Ce phénotype pourrait être associé à une augmentation de l'apoptose chez les NEs, et une altération du destin cellulaire chez les aRGs, induisant une déplétion du pool de progéniteurs (Yingling et al., 2008). La perte de *Lis1* est également associée à une augmentation de la proportion de cellules mitotiques, notamment basale. Ces données suggèrent que la concentration de *Lis1* régule les propriétés prolifératives des progéniteurs neuraux. Pour mieux décortiquer les mécanismes cellulaires impliqués dans ces altérations de l'orientation du fuseau mitotique, des expériences *in vitro* dans des cellules MEFs (fibroblastes embryonnaires de souris, *mouse embryonic fibroblasts*) ont été réalisées. Lors de ces expériences, la perte de *Lis1* entraîne un arrêt de la mitose, une altération des microtubules astraux (fins, petits et moins nombreux) faisant le lien avec le cortex de la cellule. Ce résultat peut suggérer que



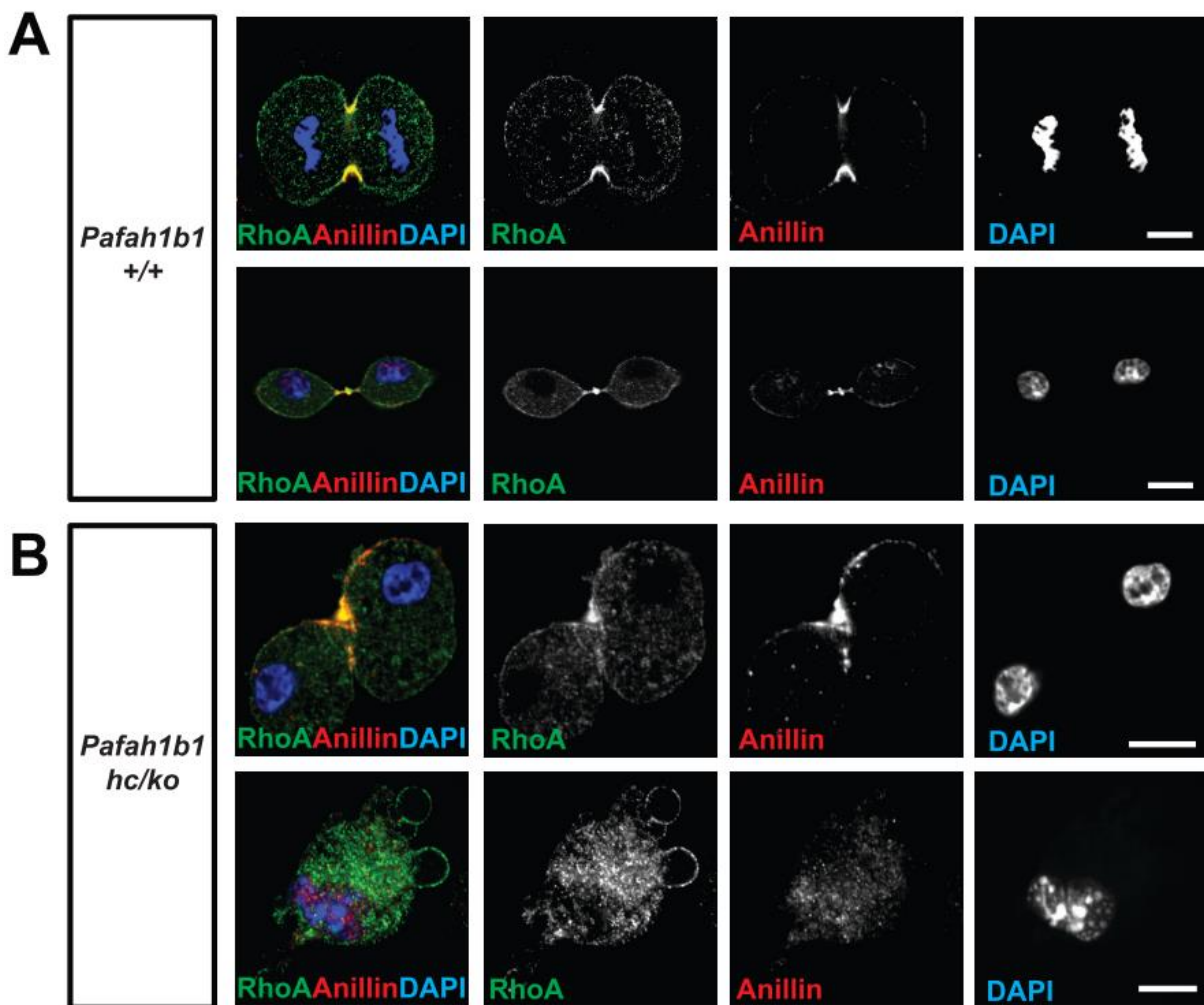
l'augmentation du taux de cellules mitotiques dans le cortex mutant est associée à une accumulation des cellules à la suite du blocage de ces dernières en mitose. La formation du fuseau mitotique se voit perturbée, avec des chromosomes qui traînent lors de la séparation durant la division. La perte de Lis1 entraîne enfin une délocalisation de ses partenaires. Les auteurs (Yingling et al., 2008) posent alors la question du lien entre les expériences *in vitro* et *in vivo*, et se demandent si la perte des microtubules astraux, et de la distribution de la dynéine conduisent aux phénotypes observés. En tout et pour tout, ces résultats montrent l'importance de Lis1 dans les processus prolifératifs des aRGs.



**Figure 44 : Le dosage de Lis1 joue un rôle dans l'orientation du fuseau mitotique des aRGs.** Immunofluorescence anti-N-Cadhérine (vert), anti-aPKC (rouge) et DAPI (bleu) illustrant la cytokinèse d'aRGs dans les cerveaux *Lis1* +/- et *Lis1* hc/-. La déplétion progressive de Lis1 entre la condition hétérozygote et hypomorphique induit des anomalies de l'orientation du fuseau mitotique, entraînant une ségrégation asymétrique d'aPKC (Moon et al., 2020). B) Mesures de l'angle du fuseau mitotique lors de divisions des NEs à E9.5 (à gauche) et des aRGs à E14.5 (à droite). Les angles deviennent plus obliques et plus aléatoires (augmentation de la variabilité) plus le dosage de Lis1 diminue (Yingling et al., 2008).

Une étude relativement récente a utilisé un modèle de souris transgéniques très élégant permettant de marquer différenciellement des cellules ayant des dosages de Lis1 différents avec des protéines fluorescentes de couleur différente au sein du même animal (Moon et al., 2020). En effet, le système  $MADM^{GT/TG}$  (*mosaic analysis with double markers*) couplé aux allèles *Lis1* floxés permet de générer une mosaïque de cellules fluorescentes rouges, jaunes ou vertes, ayant respectivement soit 100%, 50% (hétérozygotes) ou 0% (KOs) de *Lis1*. Les cellules hétérozygotes présentent une localisation anormale d'Anilline et de la protéine RhoA GTPase au moment de la division cellulaire, et l'apparition de mitoses ayant des angles de divisions aberrants. Ces deux protéines sont toutes deux impliquées dans la cytokinèse, et sont des protéines associées au cytosquelette d'actine (Piekny et al., 2005; Piekny and Glotzer, 2008). Les cellules KOs quant à elles se retrouvent bloquées en prométaphase. Les auteurs ont également observé que la ségrégation de certains marqueurs comme l'Anilline au moment de la mitose était altérée, la protéine étant agrégée dans une seule des cellules filles. Ces résultats suggèrent que *Lis1* est impliquée dans la localisation correcte de protéines jouant un rôle dans l'orientation du fuseau mitotique (Anilline et RhoA) et que la perte de *Lis1* induit plus de divisions asymétriques. Ceci est cohérent avec les résultats précédents montrant une augmentation de la production des neurones

précoces. En effet, la perte de Lis1 pourrait entraîner des perturbations de la ségrégation des facteurs influençant le destin cellulaire lors de la mitose. Enfin, les auteurs se sont proposés d'étudier un dosage plus faible que l'état hétérozygote avec l'utilisation des allèles hypomorphes dans des cellules MEFs. Une dépression plus sévère de Lis1 induit alors des troubles sévères de la mitose avec une oscillation du fuseau mitotique et des chromosomes qui y sont attachés, des perturbations du recrutement de l'anneau contractile, entraînant un décalage du sillon de division et la formation de cellules binucléées (**Figure 45**). De manière cohérente avec les perturbations des localisations de l'Anilline et de RhoA, et de la position de l'anneau contractile d'actine, la F-actine et la myosine II sont également affectés par la perte de Lis1, induisant un phénomène d'hyper-contractilité de l'actomyosine, potentiellement générés par une hyperactivation de RhoA.



**Figure 45 : La perte de Lis1 entraîne des altérations de localisation de l'anneau contractile d'actine, ce qui perturbe la position du sillon de division lors de la cytokinèse des MEFs.** Immunocytochimie sur des MEFs sauvages (A) ou hypomorphes pour Lis1 (B). Les MEFs sauvages présentent un sillon de division normal avec l'Anilline et RhoA localisées au niveau du plan équatorial. Les MEFs mutants présentent un décalage de RhoA et d'Anilline entraînant des mitoses aberrantes et l'apparition de cellules binucléées. Les cellules présentent également des blebs à la membrane plasmique (Moon et al., 2020).

Enfin, des MEFs hypomorphes présentent des centrosomes surnuméraires, associés à des cils primaires multiples en anaphase, et une morphologie anormale du fuseau mitotique, avec des pôles du fuseau élargis (Moon et al., 2014). Ceci suggère que Lis1 est nécessaire pour une bonne intégrité du

centrosome. Enfin, au cours de la mitose, il y a un délai lors de la transition de la métaphase et l'anaphase. Puis, lorsque l'anaphase débute, les chromosomes traînent avec des troubles de la ségrégation correcte des chromosomes. Le ciblage de Lis1, mais également des partenaires comme la dynactine, la dynéine, CLIP-170, au kinétochores est diminué dans les conditions mutantes. Enfin, les microtubules astraux sont également anormaux, ils sont moins nombreux et courbés, et il y a une diminution de l'adressage de la dynactine au cortex des cellules suggérant une diminution des forces motrices nécessaires au bon déroulement de la cytotérière.

Tous ces résultats suggèrent que LIS1 a un rôle fondamental dans le déroulement correct des processus dépendant des microtubules et des processus dépendant de l'actine, lors de la migration neuronale, mais aussi lors de la division cellulaire. Ceci est tout à fait cohérent avec la présence de mutations de gènes codant pour des partenaires du cytosquelette d'actine et de tubuline dans de nombreuses formes de MCDs. Chez les patients atteints d'ILS, il est donc possible que la pathogenèse des LIS et SBH dépendent de la perte de LIS1 et de la régulation de ces processus cellulaires.

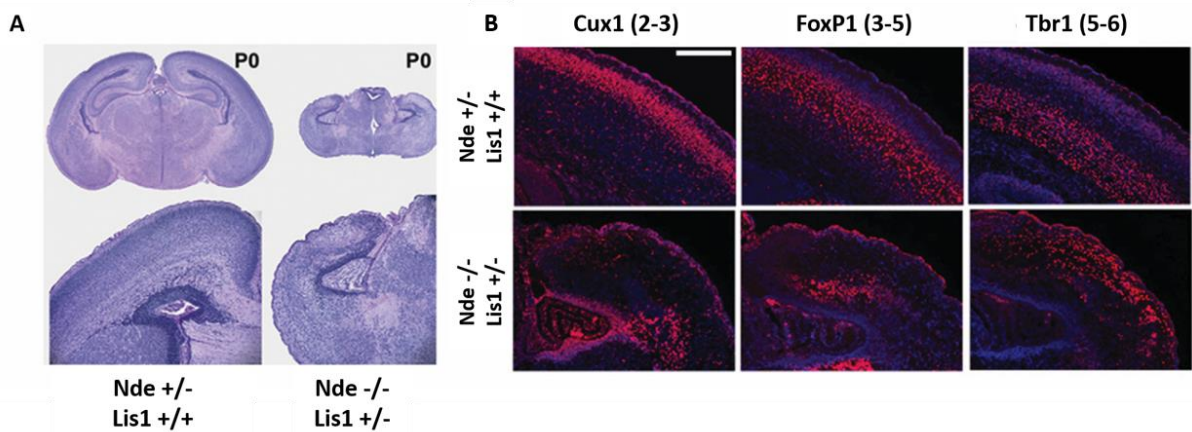
Pour conclure, l'analyse des éléments reliant LIS1 aux fonctions des progéniteurs, une surexpression de Lis1 chez la souris, générée en croisant des animaux Lis1-DsRed (lignée Tg(CAGG-loxP-LacZ-neo-loxP-PAFAH1B-DsRed)) avec la lignée Foxg1-Cre pour exprimer la Cre dans le télencéphale en développement, montre un phénotype très comparable aux syndromes associés à des duplications de Lis1 chez l'homme (Bi et al., 2009). En effet, une augmentation du dosage de Lis1 de 20% entraîne une microcéphalie. L'analyse du cortex montre que la VZ est désorganisée, les cellules PH3+ sont plus nombreuses et dispersées au lieu d'être localisées à la surface ventriculaire principalement. Un des éléments pouvant expliquer cette désorganisation de la VZ est la perte de la polarité des cellules apicales, avec une altération de la localisation des centrosomes, de l'actine, de la protéine de polarité Numb. Ceci est associé à une INM perturbée, les cellules migrent plus rapidement et dans des directions aléatoires (Bi et al., 2009). Cette étude suggère donc que les altérations de dosage de LIS1, qu'il s'agisse d'une augmentation ou une diminution de la concentration de la protéine, induisent des perturbations de la fonction des progéniteurs.

Il est assez surprenant de voir que les phénotypes observés lors des dépressions ou de l'augmentation de la concentration de Lis1 chez la souris se ressemblent, avec une diminution de la prolifération et une augmentation de l'apoptose, une perte de polarité des cellules de la VZ, l'apparition de mitoses basales et des dysfonctionnements de l'INM. Ceci est d'autant plus surprenant que les pathologies associées à des pertes d'expression ou des duplications de LIS1 présente des tableaux cliniques bien distincts. Il semblerait donc que la fonction de LIS1 soit extrêmement sensible à son dosage. Cela étant dit, tous ces éléments confirment une fois de plus l'importance de LIS1 lors de la mitose, suggérant un rôle prépondérant de la protéine dans la fonction des progéniteurs neuronaux.

### iii) *Rôle de l'interaction de LIS1 avec ses partenaires*

Comme nous l'avons vu plus tôt, la protéine Lis1 interagit avec la dynéine et des protéines associées à cette dernière comme Nde1, Ndel1 et Dcx. Une série d'étude ont cherché à étudier le rôle fonctionnel de l'interaction de Lis1 avec ces protéines durant le développement cortical, et pour ce faire, des animaux doubles transgéniques furent souvent générés.

LIS1 forme un complexe avec NDE1 et NDEL1 pour réguler la dynéine (Monda and Cheeseman, 2018; Zylkiewicz et al., 2011). Lis1, Nde1 et Ndel1 co-localisent au centrosome dans les neuroblastes précoces (Sasaki et al., 2000). Pour étudier l'interaction entre Lis1 et Nde1, des souris portant des combinaisons d'allèles mutés pour ces deux gènes furent produites (Pawlisz et al., 2008). Les souris doubles hétérozygotes (*Lis1 +/- ; Nde1 +/-*) présentent une microcéphalie par rapport aux hétérozygotes simples (*Lis1 +/-* ou *Nde1 +/-*). Des croisements supplémentaires ont permis d'obtenir des animaux *Lis1 +/- Nde1 -/-* qui présentent une létalité post-embryonnaire avec des défauts corticaux sévères (**Figure 46**). Ces défauts se caractérisent par une population de neurones précoces éparpillés et très peu de neurones tardifs. En effet, cette souris mutante ne présente pas de troubles avant E11.5, c'est à partir du début de la neurogenèse que ces troubles commencent à se manifester. La différenciation dans ces mutants est largement perturbée, avec une sortie du cycle cellulaire augmentée et une surproduction de neurones précoces aussi bien que cellules de Cajal-Retzius associée à une expression ectopique de Reeline. Cette différenciation perturbée se fait au détriment des progéniteurs, la prolifération des mutants *Lis1 +/- Nde1 -/-* est diminuée et il y a une forte diminution des cellules Pax6+, pVim+ et Tbr2+. Une augmentation du nombre de mitoses basales, et des cellules pVim+ a également été observée. Globalement, les aRGs semblent largement affectés, avec un détachement du processus apical et des altérations de structure des fibres radiaires. Enfin, la progression de la métaphase est également perturbée. Ces résultats suggèrent donc que l'interaction de Lis1 avec Nde1 est nécessaire au maintien de la morphologie des aRGs et de leurs fonctions prolifératrices.



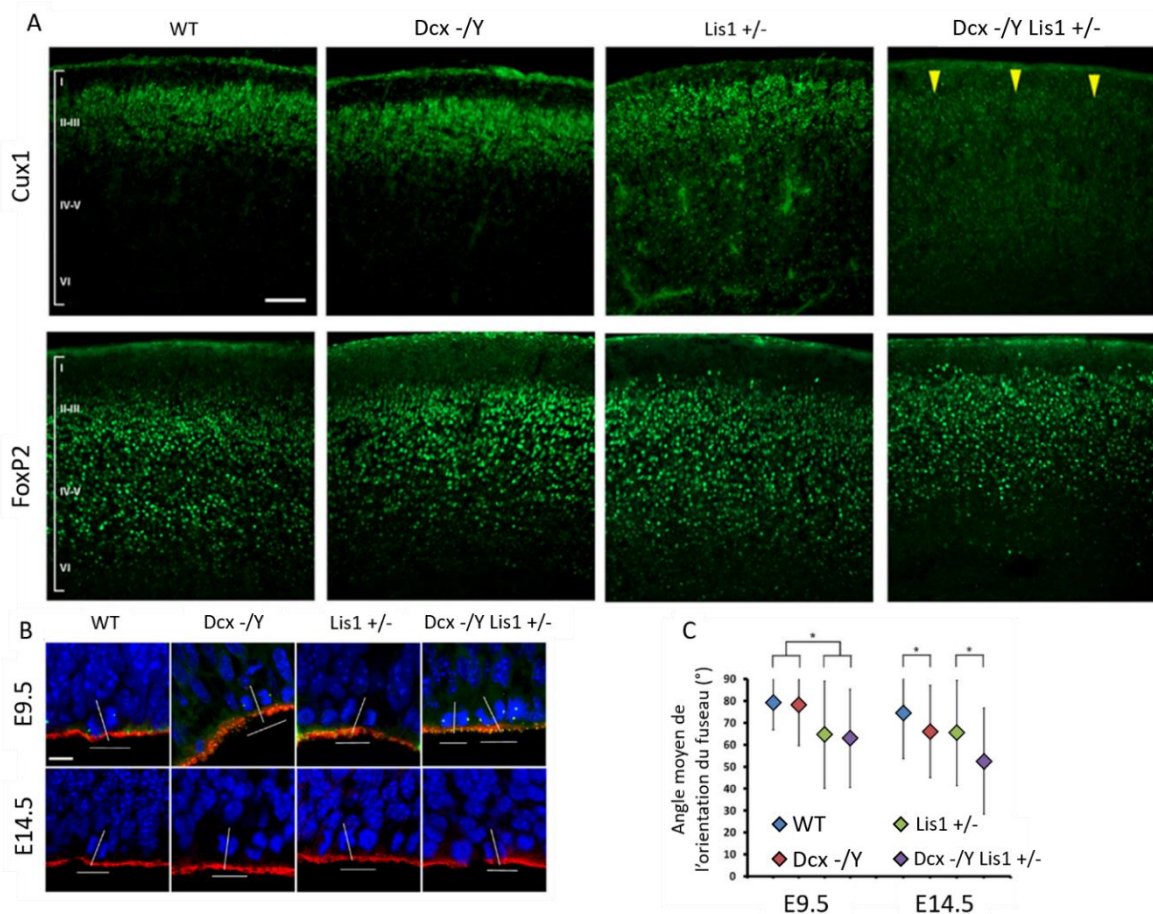
**Figure 46 : La perte du complexe Lis1-Nde1 entraîne des anomalies de la taille et de la forme du cortex.** Marquages histologiques (A) et d'immunofluorescence d'animaux doubles transgéniques Lis1 / Nde1, montrant de sévères altérations corticales pour les animaux Lis1 +/- Nde1 -/-. Cux1, FoxP1, Tbr1 : marqueurs de différentes couches corticales (Pawlisz *et al.*, 2008).

Ndel1 est également une protéine nécessaire pour le développement normal du cortex. En effet, une perte de Ndel1 entraîne des phénotypes tout à fait similaires à ceux de la perte de Lis1, avec une létalité embryonnaire pour les mutants KO, un développement cortical sans trouble flagrant pour les hétérozygotes et un effet dose-dépendant car comme pour Lis1, un mutant hypomorphe pour *Ndel1* présente des troubles du développement cortical bien plus sévère (Sasaki *et al.*, 2005). Une étude se proposant de comparer les mutants Lis1 et Ndel1 montra que les deux gènes induisent des troubles de la migration neuronale, avec également une diminution de la vitesse de migration dose-dépendante, et une absence de migration quand elles les deux sont complètement absentes, des morphologies neuronales aberrantes et des altérations centrosomales (Youn *et al.*, 2009).

J'ai montré au cours de cette introduction que Lis1 participe activement à la régulation de l'orientation du fuseau mitotique. Cette régulation passe par l'activité d'un complexe composé de Lis1-Ndel1-Nde1-dynéine-dynactine. En effet, plusieurs études ont montré que l'interaction de Lis1 avec ces protéines régule l'orientation. La perte de Lis1 ou dynactine perturbe l'alignement du fuseau mitotique chez les neuroblastes de drosophile, en altérant la motilité liée aux microtubules astraux (Siller *et al.*, 2005; Siller and Doe, 2008). Enfin, dans l'œuf de Xénope, Ndel1 régule l'interaction de Lis1 et de dynactine à la dynéine, et ce faisant, permet de réguler l'orientation du fuseau mitotique. Lis1 retarde la motilité de la dynéine, et la dynactine l'active, et la balance entre ceux deux protéines permet d'orienter le fuseau mitotique selon les besoins de la division cellulaire (Wang *et al.*, 2013b). Enfin, et comme mentionné plus haut, la perte de Lis1 entraîne des perturbations du déroulement de la mitose.

Les animaux doubles transgéniques pour *Lis1* et *Dcx* furent utilisés pour évaluer les rôles communs de ces deux protéines (Pramparo *et al.*, 2010). Les mâles *Lis1 +/- Dcx -/Y* meurent après la naissance, et les femelles doubles hétérozygotes présentent des perturbations dans la formation des couches corticales et de l'hippocampe à l'âge adulte plus sévères que les mutants hétérozygotes seul. Les mâles *Lis1 +/- Dcx -/Y* montrent des altérations très sévères de l'hippocampe aux stades E13.5 et

P0, avec des fragmentations dans toutes les régions de la Corne d'Ammon, et de l'organisation corticale, avec une réduction très forte des neurones des couches superficielles (Cux1), et une sur-migration des neurones profonds (FoxP2) et intermédiaires (FoxP1) (**Figure 47A**). La migration des neurones en tranches organotypiques est perturbée chez les KOs *Dcx*  $-/Y$ , ils migrent de manière beaucoup plus erratique, alors que les neurones non mutés pour *Dcx* migrent dans une seule direction. La fonction des progéniteurs est également perturbée dans ce modèle. La perte de *Dcx* n'a pas d'effet sur l'orientation du fuseau mitotique des cellules NEs, seul la déplétion de *Lis1* entraîne une randomisation des angles mitotiques (comme vu précédemment dans Yingling et al., 2008), et le double transgénique n'induit pas un effet supplémentaire. En revanche, le mutant *Dcx*  $-/Y$  présente une perturbation de l'orientation des angles des RGs similaire au mutant *Lis1*  $+/-$ , et il y a une sommation des effets dans les doubles mutants (**Figure 47B, C**). Enfin, des phénotypes très similaires aux doubles mutants *Lis1 Nde1* peuvent être observés, et ces phénotypes sont soit uniquement présent chez ces mutants, ou sont plus sévères que pour le mutant *Lis1*  $+/-$  ou le mutant *Dcx*  $-/Y$  : les doubles mutants présentent une diminution du marquage Nestine, une fragmentation des fibres radiaires et une perte de polarité. Ceci est associé à une diminution de la prolifération et une augmentation de la sortie du cycle cellulaire. Ceci suggère que le



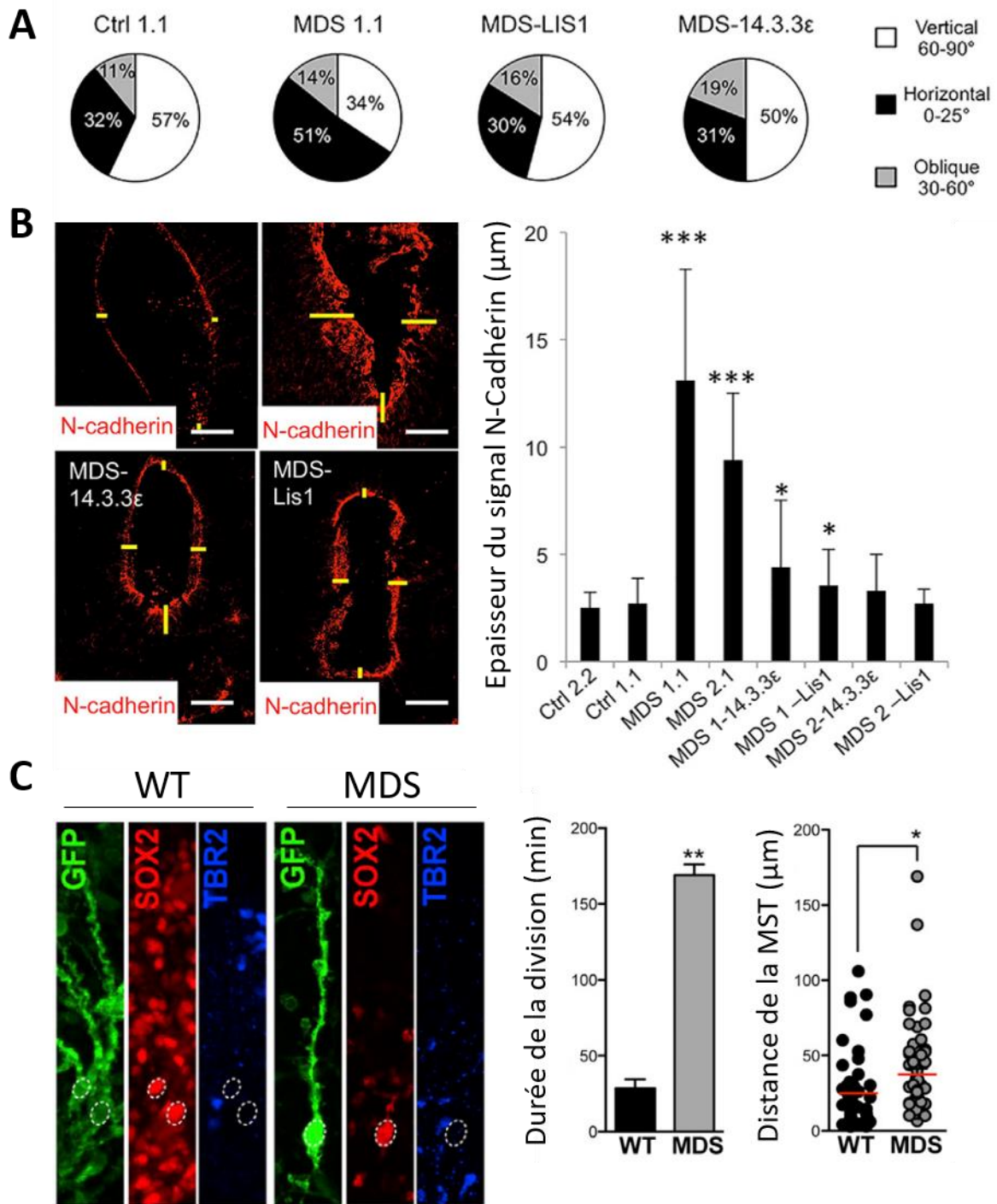
**Figure 47 : La perte de *Lis1* avec *Dcx* induit une désorganisation sévère du cortex et perturbe l'orientation du fuseau mitotique chez les NEs et les aRGs.** A) Des marquages d'immunofluorescence pour Cux1 (couches superficielles) et FoxP2 (couches intermédiaires) montrent une désorganisation des couches chez les animaux doubles transgéniques. B,C) La mesure de l'orientation du fuseau mitotique des NEs et des aRGs montre une augmentation de la variabilité et de la proportion des divisions obliques chez les animaux mutants, avec un effet additifs chez les aRGs (Pramparo et al., 2010).

complexe *Lis1-Dcx* est également nécessaire pour maintenir un pool de progéniteurs apicaux fonctionnels.

*iv) Modèles d'étude humains : organoïdes cérébraux ?*

Pour conclure cette section, j'aborderai deux études relativement récentes tirant parti de l'utilisation de organoïdes. Comme mentionné dans la section 2) de l'introduction, les organoïdes permettent d'étudier les pathologies en ayant accès au génome des patients. Dans ce chapitre, je présenterai donc 2 études ayant générées des organoïdes à partir de patients MDS. Bien évidemment, de nombreux gènes sont impliqués dans la pathologie MDS comme je l'ai précisé plus tôt. Cela étant dit, certaines conclusions peuvent être tirées, notamment en considérant le fait que le gène *LIS1* semble avoir un rôle prépondérant dans la pathogenèse du syndrome MDS.

L'étude de Bershteyn et al., 2017 présente des organoïdes générés à partir de 3 patients, et l'étude de Iefremova et al., 2017 en présente 2. Les fibroblastes de ces patients ont été reprogrammés et les cellules souches induites en organoïdes cérébraux pour étudier l'effet du MDS sur le développement cortical à 2.5-3 semaines *in vitro*. Tout d'abord, les organoïdes MDS sont plus petits que les organoïdes sains. Ce phénotype est restauré lorsque *LIS1* ou *YWHAE* sont réintroduits dans les cellules via infection virale, suggérant l'importance de ces 2 gènes dans le syndrome (Iefremova et al., 2017). Cette diminution de la taille des organoïdes est expliquée dans les 2 études par une augmentation de la sortie du cycle cellulaire, avec déplétion du pool des progéniteurs apicaux et une augmentation de la population des cellules *TBR2+* et des cellules *CTIP2+* (marqueur de couches corticales profondes), suggérant un engagement des organoïdes vers une neurogenèse précoce. Ceci est associé à une augmentation significative d'angles de divisions obliques (**Figure 48A**). De plus, la 'VZ' est désorganisée, représentée par une altération de la surface ventriculaire-like et un changement de morphologie du signal N-Cadhérine, qui n'est plus condensé en une « ligne » à la surface 'ventriculaire', mais étendu en une bande large, suggérant une perturbation des jonctions adhérentes (**Figure 48B**). L'orientation du fuseau mitotique et les aberrations de la VZ sont corrigées par la réexpression de *LIS1* et *YWHAE* (Iefremova et al., 2017). Compte tenu de l'implication des jonctions adhérentes dans la signalisation Wnt, les auteurs ont évalué les effets de la mutation sur la  $\beta$ -Caténine. La protéine est moins phosphorylée, indiquant une perturbation de la signalisation médiée par ces protéines d'adhérence, ce qui pourrait expliquer la diminution de prolifération et la neurogenèse induite. L'inhibition de *GSK3 $\beta$*  (et donc l'activation de  $\beta$ -Caténine) permet de secourir les phénotypes (diminution de la taille, angle de mitoses) (Iefremova et al., 2017).



**Figure 48 : Des organoïdes générés à partir de patients MDS montrent une altération de l'orientation du fuseau mitotique, de l'organisation de la surface ventriculaire et des propriétés des divisions des bRGs.** A) Les organoïdes mutants présentent une augmentation de la proportion de divisions oblique, phénotype restauré par la réexpression de LIS1. B) Images d'immunofluorescence pour N-Cadhérine chez des organoïdes mutant ou sain. La VZ est altérée chez les mutants, avec une désorganisation de la N-Cadhérine. Ce phénotype est aussi secouru par la réexpression de LIS1. C) Expérience de vidéomicroscopie dans des organoïdes sains et MDS pour étudier le comportement des bRGs. Chez les mutants, la durée de la division est plus longue, et la distance parcourue lors de la MST est également plus longue (*adaptée de Bershteyn et al., 2017; Iefremova et al., 2017*).

Enfin, un résultat particulièrement intéressant dans le contexte de cette thèse de doctorat vient de l'étude des bRGs dans les organoïdes MDS (Bershteyn et al., 2017). Tout d'abord, des bRGs peuvent



être observés dans ces organoïdes mutants, ce qui suggère que la perte de *LIS1* et des autres gènes impliqués ne bloque pas la production de cette population de cellules humaines. Cependant, ces bRGs mutants présentent des mitoses significativement plus longues, et une altération de la MST (processus introduit dans la section « *Caractéristiques des bRGs* »), posant l'hypothèse du rôle de *LIS1* dans les fonctions prolifératives des bRGs (*Figure 48C*).

v) *LIS1, gène clé du développement cortical – rôle dans les bRGs ?*

Grâce à ce panel d'études, nous avons une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires de *LIS1* lors du développement cortical. Comme suggéré lors des premières études de pathologies comme les LIS, SBH, et PMG, *LIS1* joue bien un rôle prépondérant dans la migration des neurones. Des mutations de *LIS1* entraînent une désorganisation des couches corticales, causée par des anomalies de la migration et de la morphologie des neurones. Cependant un élément particulièrement pertinent dans le contexte de mes travaux de recherche est le rôle que *LIS1* joue lors des processus prolifératifs des progéniteurs neuronaux. En effet, il semblerait que *LIS1* soit absolument nécessaire pour le déroulement correct de la mitose. De plus, le destin cellulaire semble également affecté dans les mutants : une déplétion de *LIS1* semble promouvoir une neurogenèse précoce au détriment du pool de progéniteurs. Ceci passerait par des altérations de l'orientation du fuseau mitotique causée par la perte d'un complexe *LIS1-NDE1-NDEL1-dynactine-dynéine* fonctionnel. Enfin, cette étude montrant la présence de bRGs dans des organoïdes MDS montre que *LIS1* pourrait également jouer un rôle dans cette population-là. Cependant, la notion de promotion de la neurogenèse au détriment du pool de progéniteurs est en conflit avec une absence d'effet d'une perte de *LIS1* sur la production de bRGs. Cet article à l'heure de la rédaction de cette thèse de doctorat recense les seuls résultats connus sur l'effet d'une mutation d'un gène impliqué dans une MCD sur la population des cellules bRGs ou bRGs-like, soulignant le manque de connaissances dans ce domaine. Comme mentionné dans la préface, l'objectif de mon doctorat est d'étudier les effets d'une perte de *Lis1* sur la production, l'amplification et la fonction des cellules bRGs-like.

## B. Résultats

Article : *Lis1* progenitor mechanisms contribute to cortical malformation

Le développement cortical dépend de différents types de progéniteurs qui produiront les neurones. Parmi ces progéniteurs, une population, appelée bRGs, est considérée comme étant cruciale pour le développement du cortex chez les espèces gyrencéphaliques, et serait potentiellement impliquée dans la formation des circonvolutions à la surface du cortex cérébral. Ces cellules sont rares chez la souris, espèce lissencéphalique. Les MCDs sont des pathologies rares associées à des crises d'épilepsie et des déficits intellectuels. *LIS1*, gène codant pour un régulateur de la dynéine, est muté dans la LIS. Les rôles de LIS1 dans la migration cellulaire sont relativement bien décrits dans la littérature, mais ses rôles dans les progéniteurs, et en particuliers les bRGs restent mal connus.

Nous nous sommes donc proposés d'étudier le rôle de LIS1 dans la production et la fonction des bRGs en utilisant une souris portant un gène *Lis1* floxé, croisées avec des souris *Emx1-Cre*, pour induire une déplétion de *Lis1* dans les progéniteurs neuraux à partir de E9.5. De nombreux gènes ont été montrés comme capables d'induire la production de cellules bRG-like chez la souris. Nous avons donc exprimé *TBC1D3*, gène codant pour une RABGAP, dans le cortex de souris mutantes pour *Lis1* par électroporation *in utero* à E14.5, et sacrifié les animaux à E16.5.

Après avoir confirmé que l'expression de *TBC1D3* dans les progéniteurs murins WT permet bien de produire des cellules Pax6+ basales ayant les caractéristiques morphologiques des bRG-like cells, et une augmentation des mitoses basales, j'ai donc cherché à électroporer des animaux mutants pour *Lis1*. Une déplétion complète de *Lis1* entraîne des perturbations sévères du développement, avec des cerveaux acorticaux. L'étude de la production de cellules bRG-like dans cette condition est donc impossible, puisque le cortex est sévèrement impacté. Nous avons décidé d'étudier l'état hétérozygote, plus proche des mutations humaines.

J'ai pu montrer que dans des animaux déprimés pour *Lis1*, l'expression de *TBC1D3* n'induit pas la présence de cellules bRG-likes, contrairement aux animaux WT. Je n'ai pas observé d'effet sur les IPs, une autre population de progéniteurs. Ceci suggère que la déplétion de *Lis1* perturbe les mécanismes de production des cellules bRG-like dans notre modèle. Pour mieux comprendre comment ces mécanismes sont perturbés, j'ai d'abord étudié l'expression de N-Cadhérine, protéine impliquée dans les jonctions adhérentes. J'ai montré que la déplétion de *Lis1* pourrait induire une diminution de N-Cadhérine, ce qui pourrait expliquer l'incapacité de *TBC1D3* à induire la production des bRGs. J'ai ensuite évalué les mitoses des progéniteurs. J'ai montré que la déplétion de *Lis1* augmente la proportion de mitoses abventriculaires, résultat cohérent avec la littérature, tout comme l'expression de *TBC1D3*, et je n'ai pas observé d'effet additif quand *TBC1D3* est exprimé dans les animaux mutants. Après avoir analysé

l'orientation du fuseau mitotique dans les aRGs, j'ai pu montrer que la déplétion de *Lis1* induit des angles plus variables et plus de divisions obliques et verticales, que *TBC1D3* soit exprimé ou non. Ces éléments semblent suggérer que la déplétion de *Lis1* perturbe l'adhésion cellulaire des aRGs et les angles de divisions, ce qui pourrait perturber les mécanismes mis en place par *TBC1D3*, et empêcher la production des bRGs.

Ces résultats présentent donc l'effet d'une déplétion hétérozygote de *Lis1* sur la production de cellules bRG-like chez la souris. Ceci pourrait suggérer que chez les patients portant des mutations de *LIS1*, les bRGs pourraient être impactés, ce qui pourrait être un des éléments de la pathogenèse de la LIS.

# **Lis1 mutation prevents basal radial glia-like cell production in the mouse**

Maxime Penisson<sup>1,2,3</sup>, Shinji Hirotsune<sup>4</sup>, Fiona Francis\*<sup>1,2,3,#</sup>, Richard Belvindrah\*<sup>1,2,3</sup>

1. INSERM U 1270, Paris, France
2. Sorbonne University, UMR-S 1270, F-75005 Paris, France
3. Institut du Fer à Moulin, Paris, France.
4. Osaka University, Osaka Japan

\*These authors contributed equally.

#Corresponding author: Fiona Francis, Institut du Fer à Moulin, 17 rue du Fer à Moulin, 75005 Paris France. Tel: +33145876145 Email: [fiona.francis@inserm.fr](mailto:fiona.francis@inserm.fr)

## Abstract

Human cortical malformations are associated with progenitor proliferation and neuronal migration abnormalities. Progenitor cells include apical radial glia, intermediate progenitors and basal (or outer) radial glia (bRGs or oRGs). bRGs are few in number in lissencephalic species (e.g. the mouse) but abundant in gyrencephalic brains. The *LIS1* gene coding for a dynein regulator, is mutated in human lissencephaly, associated also in some cases with microcephaly. LIS1 was shown to be important during cell division and neuronal migration. Here, we generated bRG-like cells in the mouse embryonic brain, investigating the role of Lis1 in their formation. This was achieved by *in utero* electroporation of a hominoid-specific gene *TBC1D3* (coding for a RAB-GAP protein) at mouse embryonic day (E) 14.5. We first confirmed that *TBC1D3* overexpression in wild-type (WT) brain generates numerous Pax6<sup>+</sup> bRG-like cells that are basally localized. Second, using the same approach, we assessed the formation of these cells in heterozygote *Lis1* mutant brains. Our novel results show that *Lis1* depletion in the forebrain from E9.5 prevented subsequent *TBC1D3*-induced bRG-like cell amplification. Indeed, we observe disruption of the VZ in the mutant. Similar to bRG-like cell production, earlier *Lis1* depletion changed mitotic spindle orientations at the ventricular surface and increased the proportion of abventricular mitoses. Progenitor outcome could not be further altered by *TBC1D3*. We conclude that perturbation of *Lis1*/LIS1 dosage is likely to be detrimental for appropriate progenitor number and position, contributing to lissencephaly pathogenesis.

## 1) Introduction

The development of the cerebral cortex relies on different types of progenitor cell situated in a neuroepithelium adjacent to the cerebral ventricles. These cells produce neurons which *in fine* will form networks that underlie brain functions (Taverna et al., 2014). Early neuroepithelial cells give rise to apical radial glia cells (aRGs) which are localized in the ventricular zone (VZ) and possess a short apical process descending to the ventricle and a long basal process extending to the pial surface (Götz and Huttner, 2005). These progenitor cells proliferate producing either immature glutamatergic neurons which will migrate along aRG basal fibers in the intermediate zone (IZ) to reach their final position in the cortical plate (CP), or other subpopulations of progenitors: e.g. intermediate progenitors (IPs) and basal radial glial cells (bRGs). IPs are multipolar cells that are localized mainly in the subventricular zone (SVZ) and can produce deep and upper layer neurons (Agirman et al., 2017; Hevner, 2019). bRGs are rare in the rodent, but abundant in gyrencephalic species where they are localized in an outer SVZ (oSVZ). In these species, they have been shown to play a major role during cortical development (Fietz et al., 2010; Hansen et al., 2010; Penisson et al., 2019; Pollen et al., 2015; Reillo et al., 2011). They are highly proliferative cells and can produce neurons and IPs, but unlike rodent IPs, they have the ability to self-renew extensively, therefore constituting a renewed pool of progenitors for cortical development (Betizeau et al., 2013; Hansen et al., 2010; LaMonica et al., 2012). Basal RGs present different morphologies, classically they were described with only a basal process, but they can also have only an apical process or both (Betizeau et al., 2013). It is important to assess how perturbation of bRG function may contribute to the apparition of the cortical disorders.

Malformations of cortical development (MCDs) are rare pathologies characterized by intellectual disability and/or epilepsy. They are associated with abnormalities in cortical structure and/or the number of neurons (Desikan and Barkovich, 2016). Linked to genetic mutations or environmental factors (Romero et al., 2018), they have been associated with defects in cell proliferation and neuronal migration, and include micro- or macrocephaly (reduction or enlargement of cerebral volume respectively), lissencephaly (absence of or abnormal folds) or heterotopias (presence of grey matter within the white matter) (Barkovich et al., 2012; Capuano et al., 2017; Subramanian et al., 2020).

*LISI*, coding for a regulator of dynein activity, was the first gene to be linked with a neuron migration disorder: the Miller-Dieker syndrome (MDS) (Dobyns et al., 1993; Reiner and Sapir, 2013, Cianfrocco et al., 2015). MDS is characterized by lissencephaly and facial abnormalities and is caused by a contiguous deletion of genes on the short arm of chromosome 17. While several genes are deleted in MDS, *LISI* appears to be one of the main actors of this pathology, as heterozygous intragenic deletions and point mutations also lead to lissencephaly, with varying degrees of severity, including microcephaly (Lo Nigro et al., 1997; Yingling et al., 2003).

In the naturally lissencephalic mouse, *Lis1* haploinsufficiency leads to mild neocortical and hippocampal disorganization, contrasting with the extremely severe human disorder. Only further depletion of *Lis1* to approximately 35 % of normal, induced a severe neocortical phenotype (Gambello et al., 2003; Hirotsune et al., 1998). Reduced *Lis1* dosage was shown to affect neuronal migration (Tsai et al., 2005), as well as mitotic spindle orientation in neuroepithelial cells and aRGs (Yingling et al., 2008). This leads to a depletion of the progenitor pool, by increased cell cycle exit of aRGs transiently favorising neurogenesis (Iefremova et al., 2017; Pramparo et al., 2010). Human MDS organoids were produced (Bershteyn et al., 2017; Iefremova et al., 2017) revealing, as well as other defects, including bRGs with longer mitoses and altered mitotic somal translocation (Bershteyn et al., 2017). However, the specific role of LIS1 in bRG generation still remains poorly understood, as well as more generally the involvement of bRGs in the pathogenesis of lissencephaly. There is indeed a strong need to revisit MCD pathogenesis, considering the more recently identified bRGs, questioning how perturbation of their function might contribute to these disorders.

Various genes and mechanisms have been described during the past decade as regulating bRG production and amplification (Penisson et al., 2019). Several models exist to study these cells in different organisms. Certain reports have described an artificial enrichment of bRG-like cells in the mouse brain (Florio et al., 2015; Heng et al., 2017; Ju et al., 2016; Liu et al., 2017a; Lui et al., 2014; Stahl et al., 2013; Tavano et al., 2018; Wong et al., 2015), sometimes even leading to the formation of folds on the surface of the brain. Hence, with the aim of studying the role of *Lis1* in the genesis and function of bRGs, we set out to combine the study of a floxed mouse line for *Lis1* (Hirotsune et al., 1998) with an amplification of bRG-like cells. We selected to use *TBC1D3*, a hominoid-specific RAB-GAP, known to favorize the generation of bRG-like cells upon expression in the mouse brain (Ju et al., 2016).

In this study, we confirmed that *TBC1D3* expression in the mouse via *in utero* electroporation (IUE) at E14.5 promotes the generation of bRG-like cells 2 days later. We found that an early heterozygote depletion of *Lis1* at E9.5 using the *Emx1-Cre* mouse line (Gorski et al., 2002) prevents the *TBC1D3*-dependent bRG-like cell amplification which occurs in control animals. Indeed, baseline modifications already appear to exist in *Lis1* mutant developing brains and no further additive effects are generated by *TBC1D3* expression. It is likely that early *Lis1* depletion by 50%, while not inducing heavily deleterious effects, generates sufficient cellular modifications to prevent *TBC1D3* from generating bRG-like cells. Thus, *Lis1* is necessary for murine bRG-like cell formation associated with expression of a hominoid-specific gene contributing to bRG generation in humans.

## 2) [Results](#)

### a) *TBC1D3* promotes the generation of bRG-like cells in the mouse

The bRG population is naturally scarce in the developing mouse brain, we therefore expressed *TBC1D3* to amplify this population (Ju et al., 2016). To test this tool under our experimental conditions, WT mice were first electroporated at E14.5 with pCS2-cMyc-*TBC1D3* (Ju et al, 2016) together with a pCAG-IRES-tdTomato plasmid to identify electroporated cells, compared to pCAG-IRES-tdTomato alone (Figure 1A-B'). Mice were sacrificed two days later. *TBC1D3* expression led to the presence of tdTomato-positive (tdTomato+) basally-positioned cells with cell bodies localized in the SVZ and IZ (Figure 1B'). These possessed either a basal process or both an apical and basal process, as described previously for bRG cells (Betizeau et al., 2013). Immunohistochemistry showed that many basal cells with bRG-like morphology were Pax6+ (Figure 1B'). Quantifications showed a significant increase of the proportion of Pax6+ cells among electroporated cells when *TBC1D3* is expressed compared to control. This includes when considering the entire cortical wall (Total, 10.9%  $\pm$  1.9 for control versus (vs.) 24.5%  $\pm$  0.1 for *TBC1D3*,  $p < 0.01$ ), as well as when dividing the cortical wall into the VZ (36.9%  $\pm$  3.5 for control vs. 49.9%  $\pm$  7.7 for *TBC1D3*,  $p < 0.01$ ), SVZ (5.5%  $\pm$  0.9 for control vs. 15.1%  $\pm$  4.5 for *TBC1D3*,  $p < 0.05$ ) and IZ (1.9%  $\pm$  0.5 for control vs. 11.8%  $\pm$  2.6 for *TBC1D3*,  $p < 0.05$ ) (Figure 1C). This suggests that *TBC1D3* expression increases numbers of Pax6+ RG which leave the VZ and move towards more basal regions.

The effect of *TBC1D3* expression on mitoses was assessed by performing phospho-Histone 3 (PH3) immunostaining (Figure 1D, D'). *TBC1D3* expression led to increased numbers of PH3+ mitotic cells compared to the control plasmid. This was significant when considering the proportion of mitotic cells amongst fluorescent cells across whole cortical wall (4.5%  $\pm$  0.2 for control vs. 10.8%  $\pm$  1.1 for *TBC1D3*,  $p < 0.01$ ), as well as specifically when assessing the VZ (12.6%  $\pm$  0.5 for control vs. 20.8%  $\pm$  3.4 for *TBC1D3*,  $p < 0.001$ ) (Figure 1E) and tendencies were also observed in the SVZ (2.38%  $\pm$  0.81 for control vs. 6.13%  $\pm$  3.16 for *TBC1D3*) and IZ (0.81%  $\pm$  0.52 for control vs. 2.50%  $\pm$  2.4 for *TBC1D3*). aRG mitoses generally take place at the ventricular surface in the control condition (Figure 1D), related to interkinetic nuclear migration (Kulikova et al., 2011; Taverna et al., 2014). When *TBC1D3* was expressed, the location of mitoses displayed a notable basal shift. Indeed, the proportion of adventricular mitoses increased (Total: 43.0%  $\pm$  11.0 for control vs. 69.1%  $\pm$  1.5 for *TBC1D3*,  $p = 0.052$ , data not shown), with a decreased proportion of divisions at the ventricular surface. Considering only adventricular mitoses in the VZ (Figure 1F), there were 25.6%  $\pm$  11.2 for control vs. 57.5%  $\pm$  8.2 for *TBC1D3*,  $p < 0.01$ ) (Figure 1F). The latter suggests that basal mitoses were more likely to occur in the presence of *TBC1D3*. Overall, these results are consistent with the original study (Ju et al, 2016) suggesting that *TBC1D3* expression in mouse brain progenitors promotes the generation of bRG-like cells.

## b) Forebrain-specific *Lis1* knockout severely perturbs cortical development



After validating the production of TBC1D3-induced bRG-like cells, *Lis1* mutants were generated. Various Cre lines have been used in the past to induce *Lis1*<sup>fl/fl</sup> recombination, showing defects depending on the timing of *Lis1* depletion, targeted cell types and the dosage of the *Lis1* remaining (Gambello et al., 2003; Hirotsune et al., 1998; Yingling et al., 2008). We set out to deplete *Lis1* in a forebrain-specific manner at an early stage, before the onset of neurogenesis, to ensure depletion of this gene in all neural progenitors. We used a new *Lis1*<sup>fl/fl</sup> stock from which the neo-cassette had been removed (referred to here as *Lis1*<sup>fl/fl</sup>). Indeed, the presence of the neo-cassette was previously shown to alter *Lis1* gene expression (Gambello et al., 2003; Hirotsune et al., 1998), generating *de facto* an hypomorphic allele even in the absence of the Cre recombinase. To deplete *Lis1* in neo-removed *Lis1*<sup>fl/fl</sup> mice, an Emx1-IRES-Cre knockin mouse was used (referred to here as Emx1-Cre) to induce recombination in neural progenitors starting at E9.5 (Gorski et al., 2002). To verify the expression pattern of the Cre recombinase, Emx1-Cre animals were crossed with the Rosa26-EGFP<sup>RCE/RCE</sup> line (Sousa et al., 2009). Brains of the embryos showed GFP expression restricted to the cortex, as well as in fiber tracts including the corpus callosum and the anterior commissure (data not shown).

After having confirmed the recombination pattern in the Emx1-Cre mouse line, *Lis1*<sup>fl/fl</sup> animals were crossed with Emx1-Cre animals, to obtain *Lis1*<sup>fl/+</sup> Emx1-Cre<sup>+WT</sup> mutant mice. These were then crossed with *Lis1*<sup>fl/fl</sup> mice to obtain WT (*Lis1*<sup>fl/+</sup> or *Lis1*<sup>fl/fl</sup>; Emx1-Cre<sup>WT/WT</sup>), heterozygote (HET, *Lis1*<sup>fl/+</sup>; Emx1-Cre<sup>+WT</sup>) and knockout (KO, *Lis1*<sup>fl/fl</sup>; Emx1-Cre<sup>+WT</sup>) animals in the same litter. Postnatal day 0 (P0) brains of HET pups did not show any macroscopic cortical differences when compared to control, consistent with previous studies (Gambello et al., 2003; Hirotsune et al., 1998). However, brains of KO animals were largely devoid of a cortex (Figure 2A-B). This phenotype was easily visible at E14.5 (data not shown), and KO animals died between P3 and P7. This result further confirmed that reducing the dosage of *Lis1* by half does not have obvious major deleterious effects in mouse cortical development (and HETs survive normally), whereas further decrease has severe consequences (Gambello et al., 2003; Hirotsune et al., 1998).

Considering that the cortex is almost totally absent in KO animals, making a fine assessment of *Lis1* function in progenitors less appropriate, we continued our experiments comparing only WT and HET animals. To that end, *Lis1*<sup>fl/fl</sup> mice were crossed with Emx1-Cre<sup>+WT</sup> animals to obtain WT (Cre negative) or HET embryos in the same litter. To evaluate whether *Lis1* depletion by 50% had an impact on cortical organization, even though no major defects were observed macroscopically, Tbr1 immunostaining was performed. No significant differences were observed between WT and HET mice when assessing the number of Tbr1+ deep layer neurons (Figure 2 C, D). This together with the cortical thickness measurements suggests that in the HET state, cortical neuron production and migration occur relatively normally.

Performing the same crosses and generating pregnant females, embryos were then electroporated at E14.5 with pCS2-cMyc-TBC1D3 or control (pCS2-cMyc) plasmid together with the pCAG-IRES-tdTOMATO reporter plasmid, and mice were sacrificed 2 days later. Activated caspase 3 (aCas3) immunostaining was first performed to assess cell death. No significant differences were observed (Figure 2E, F).

Overall, these results with early forebrain inactivation of *Lis1* showed that full KO at E9.5 leads to severe cortical developmental defects, while depletion of *Lis1* by 50% has no obvious effect on cortical layering organization and a non-significant impact on cell death.

### c) *Lis1* depletion prevents bRG-like cell amplification upon TBC1D3 expression

We next investigated whether, in the presence of TBC1D3, *Lis1* depletion would alter or prevent the generation of bRG-like cells. To evaluate the effect of TBC1D3 (or the control plasmid) expression on RGs in the *Lis1* mutant cortex, Pax6 and Ki67 co-immunostaining was performed (Figure 3B-E'). Pax6+ tdTomato+ cells were assessed across the cortical wall and in the different zones (Figure 3F). Under these conditions, no significant differences in the percentages of Pax6+ cells within the tdTomato population were observed in the VZ and SVZ regions. The overall percentage of Pax6+ cells amongst the tdTomato+ cells across the cortical wall also did not show significant differences, although there was a tendency for increase in the TBC1D3 WT condition. In the IZ, no differences were noted between WT and HET brains electroporated with the control plasmid, however a significant increase in the proportion of Pax6+ tdTomato+ cells was observed when TBC1D3 is expressed in WT brains ( $9.0\% \pm 3.0$  for Control WT vs.  $33.2\% \pm 9.4$  for TBC1D3 WT,  $p < 0.05$ ). However, when TBC1D3 is expressed in HET brains, numbers of Pax6+ cells and levels are similar in the IZ to that of the HET condition electroporated with the control plasmid ( $7.8 \pm 6.5$  for Control HET vs.  $13.3\% \pm 3.0$  for TBC1D3 HET, not significant). This suggests that *Lis1* depletion largely prevents bRG-like cell amplification in the presence of TBC1D3.

The effect of *Lis1* depletion on cycling RG was then assessed by quantifying the proportion of cells co-labeled with Pax6 and Ki67, a marker of proliferation (Figure 3G, H). Overall proportions of Ki67+ cells did not differ significantly between the genotypes and conditions (Figure 3G). However, when considering Pax6+ Ki67+ tdTomato+ triple labeled cells (Figure 3H), similar results to those described in Figure 3F were obtained: in the IZ no difference was found between WT and HET conditions with the control plasmid, however TBC1D3 expression in WT animals resulted in an increased proportion of Pax6+ Ki67+ cells ( $4.2\% \pm 1.5$  for Control WT vs.  $16.7\% \pm 4.1$  for TBC1D3 WT,  $p < 0.05$ ). This increase was not observed with *Lis1* depletion ( $4.7\% \pm 1.2$  for TBC1D3 HET  $p < 0.05$ ), with the proportion of cells equivalent to Control HET animals ( $3.7\% \pm 3.2$ ). This suggests that TBC1D3 expression in WT

induces an increased production of cycling bRG-like Pax6<sup>+</sup> cells in the IZ, and importantly, Lis1 depletion prevents this phenomenon from occurring.

To assess whether Lis1 dosage also influences the ability of Pax6<sup>+</sup> RGs to cycle, we measured the proportion of cycling RG (Pax6<sup>+</sup> Ki67<sup>+</sup> tdTomato<sup>+</sup>) among electroporated RG (Pax6<sup>+</sup> tdTomato<sup>+</sup>) (Figure 3I). No significant differences were observed, suggesting proliferation of RGs was not affected. Overall, these combined results suggest that TBC1D3 expression is no longer able to promote the generation of bRG-like cells and cycling bRG-like cells in the IZ when Lis1 has previously been depleted by 50%.

#### d) Lis1 depletion with TBC1D3 expression does not alter Tbr2<sup>+</sup> cell numbers

We then investigated whether the population of Tbr2<sup>+</sup> IPs was also affected in Emx1-Cre Lis1 mutants. Tbr2 and Ki67 co-immunostainings were performed (Figure 4A-D') and cells were quantified. There were notably no significant differences when considering either the total or the regional numbers of electroporated Tbr2<sup>+</sup> IPs (Figure 4E), Tbr2<sup>+</sup> Ki67<sup>+</sup> cycling IPs (Figure 4F) or the ability of Tbr2<sup>+</sup> IPs to cycle (Figure 4G). These results suggest that only RG progenitors are affected by Lis1 depletion when TBC1D3 is expressed.

#### e) N-Cadherin expression is perturbed in Lis1 deficient mice but not upon TBC1D3 expression

To assess how Lis1 depletion may inhibit the generation of bRG-like cells, we first investigated whether VZ organization and cell interactions were affected. Indeed, expression of TBC1D3 in the mouse was previously shown to decrease the expression of N-Cadherin, and this alteration may explain how bRG-like cells are generated potentially by delamination in this model (Ju et al., 2016). To test if *Lis1* haploinsufficiency impairs this mechanism, N-Cadherin staining was performed followed by immunofluorescence intensity quantification at the ventricular surface. No obvious effect of TBC1D3 expression on N-Cadherin was observed in WT animals, contrary to the original study. However, when Lis1 was depleted, both with control and TBC1D3 plasmids, decreased expression of N-Cadherin was observed (Figure 5A).

Performing quantifications across electroporated areas (Figure 5B), in control WT animals, a peak of fluorescence intensity was obvious close to the ventricular surface where N-Cadherin expression is the strongest (Figure 5C). Two-way Anova for repeated measures showed a significant interaction for fluorescence intensity between the conditions and distance from the ventricle ( $p = 0.0083$ ). No further significant differences were observed between the conditions, possibly due to data variability. However,

Control HET and TBC1D3 HET conditions show a consistent tendency for decrease in fluorescence intensity as compared to their WT equivalents, with less obvious peaks observed.

To assess more precisely the effect of Lis1 depletion and TBC1D3 expression on N-Cadherin expression at the ventricular surface, we performed measurements outside of cell junctions (“*non-junctions*”, Figure D) and at cells junctions (“*junctions*”, Figure E). Overall, results were similar to those shown above, i.e. Control HET and TBC1D3 HET animals showed lower intensity of fluorescence. At the *non-junction*, interaction between conditions and distance from the ventricle was significant ( $p = 0.0062$ ) and significant differences were observed between TBC1D3 WT and TBC1D3 HET (\*) in regions close to the ventricular surface. At *junctions*, interaction was not significant ( $p=0.07$ ), but fluorescence showed a tendency for decreased intensity in HET animals as compared to their WT equivalents. Overall, these results suggest that Lis1 depletion alters N-Cadherin expression, potentially leading to perturbed functions of VZ progenitors.

#### f) Both Lis1 depletion and TBC1D3 expression alter ventricular mitoses and spindle orientations

We then investigated whether the Emx1-Cre *Lis1* mutation altered other aspects of VZ progenitor cell function, helping to prevent TBC1D3 expression from inducing the production of bRG-like cells. To evaluate whether mitosis was affected, PH3 immunostaining was performed and the proportion of PH3+ mitotic cells quantified (Figure 6A). No significant differences were observed in the overall and regional proportions of mitotic electroporated cells between the different conditions and genotypes (Figure 6B). However, when considering the distribution of mitoses in the VZ, we observed that Lis1 HET depletion (after electroporation with the control plasmid) promoted significantly more basal abventricular mitoses compared to WT ( $27.6\% \pm 9.1$  for Control WT vs.  $64.6\% \pm 6.6$  for Control HET,  $p<0.05$ , Figure 6C), consistent with previous *Lis1* mutation studies (Yingling et al., 2008). TBC1D3 expression in WT animals also promoted an increased proportion of basal abventricular mitoses ( $27.6\% \pm 9.1$  for Control WT vs.  $62.8\% \pm 5.9$  for TBC1D3 WT,  $p<0.05$ ), consistent with the original study (Ju et al., 2016). Interestingly, when TBC1D3 was expressed in HET animals, the proportion of abventricular mitoses was similar to levels of HET mice electroporated with the control plasmid, or WT with the TBC1D3 plasmid ( $60.0\% \pm 9.9$  for TBC1D3 HET vs.  $64.6\% \pm 6.6$  for Control HET). Thus, both conditions (Lis1 HET control and WT TBC1D3) lead to increased proportions of abventricular mitoses individually, and expression of TBC1D3 combined with Lis1 depletion does not show potentiation of the effect. Since Lis1 HET aRG mitoses are already perturbed when TBC1D3 is introduced, this may help to explain why bRG-like cells are not properly generated in the mutant model.

We next decided to assess mitotic spindle orientations in *Lis1* mutants in the presence or absence of TBC1D3. The angles of division of fluorescent dividing aRGs, in contact with the ventricular surface and engaged in anaphase, were measured (Figure 6D,E, F). Angle distributions for WT and HET with control plasmids were akin to what was shown previously (Yingling et al 2008). When *Lis1* is depleted by 50%, a lower angle mean was observed, with an apparently wider variability (Control WT: mean = 68.1°, standard deviation = 18.36; Control HET: mean = 54.0°, standard deviation = 29.16, Levene test: p=0.068). TBC1D3 expression in WT did not appear to greatly alter mitotic spindle angles compared to the control plasmid, however when TBC1D3 was expressed in *Lis1* mutant brains, we observed the same tendency as with the control plasmid, *Lis1* depletion induced a lower angle mean and a wider variance (Figure 5D, TBC1D3 WT: mean = 61.4°, standard deviation = 17.17; TBC1D3 HET: mean = 52.4°, standard deviation = 31.36, Levene test: p=0.10).

The naturally low numbers of electroporated cells performing mitosis at the moment of the sacrifice and fixation of the embryos prevented further meaningful statistical analyses related to the variability of the angles. Hence, to provide further insight into the data, angles were clustered in three groups (61°-90° for horizontal divisions, 31°-60° for oblique divisions and 1°-30° for vertical divisions). *Lis1* depletion showed more variable angle values, notably increased values were observed between 1°-30° (0 % in WTs versus 30 % in HETs), apparently at the expense of 31-60° angles. Expression of TBC1D3 in WT increased oblique divisions (31-60°, 50 % with TBC1D3 versus 37.5 % with the Control plasmid). TBC1D3 expression in *Lis1* HET brains appeared to randomize angles (with values observed of 30 %, 30 % and 40% for 1°-30°, 31°-60° and 61°-90° respectively, Figure 5E).

Thus, early alteration of mitotic spindle angles in *Lis1* HET animals could prevent proper segregation of cell fate determinants at the time of TBC1D3-induced divisions, which might explain how *Lis1* prevents bRG-like cell enrichment in the presence of TBC1D3.

### 3) [Discussion](#)

Basal RGs were identified relatively recently and shown to be important for the expansion of the neocortex in gyrencephalic species such as primates (Betizeau et al., 2013; Fietz et al., 2010; Hansen et al., 2010) and the ferret (Fietz et al., 2010; Reillo et al., 2011). However, few studies to-date associate defects in these cells with cortical malformations, most probably since these cells are few in the rodent, often used to model these neurodevelopmental disorders. In order to overcome these limitations, we used genetic tools to amplify these cells in the mouse, assessing their production in *Lis1* mouse mutants. Using a newly developed *Lis1* allele, we show that forebrain-specific conditional KO leads to a severe cortical defect and death in early postnatal stages. Taking advantage of viable heterozygote mice (mimicking the LIS1 dosage reduction in human patients), we tested the production of bRGs in *Lis1* mutant conditions. We show that bRG-like cells do not form correctly when TBC1D3 is expressed in

*Lis1* HET mutants. We demonstrate that *Lis1* mutants show severely perturbed spindle orientations and reduced N-Cadherin expression from early cortical development which appears to preclude the production of bRG-like cells. We did not observe significant N-Cadherin impairments in *TBC1D3* WT animals, differing from a previous study in which they showed reduced expression at in the VZ, and reduced expression of N-Cadherin mRNA (Ju et al., 2016). This difference could be due to genetic background, since Ju and colleagues used C57Bl6 mice, while in our study, *LIS1*<sup>fl/+</sup> *Emx1-Cre*<sup>+WT</sup> animals had a hybrid FVB/C57Bl6 background.

Different Cre-expressing lines have been used previously to deplete *Lis1* (Yingling et al., 2008). Use of Pax2-Cre with Cre expression starting E8 (Rowitch et al., 1999), expected to impact neuroepithelial cells, leads to a severe impairment of neuroepithelium function in KO animals, with midbrain and hindbrain degeneration and highly increased apoptosis in forebrain cells. Similar to *Emx1-Cre* KOs studied here, pups did not survive after birth. Using GFAP-Cre mice with Cre expression starting at E12.5 and expected to impact aRGs (Brenner and Messing, 1996) there is a slight decrease of the cortical thickness in KOs, affecting both deep and superficial neurons, and an almost absent hippocampus. With the *Emx1-Cre* mouse line, we depleted *Lis1* at an intermediary timepoint (E9.5), at the beginning of the transition from neuroepithelial cells to aRGs in the forebrain (Gorski et al., 2002). We observed an almost complete degeneration of the cortical wall in KOs, akin to the Pax2-Cre phenotype and much stronger than that of GFAP-Cre. This suggests that *Lis1* is critical for the proper transition from neuroepithelial cells to aRGs, the start of neurogenesis and the correct acquisition of cell fate.

*LIS1* heterozygote mutations in human lead to a spectrum of disorders with varying grades of severity, ranging from pachygyria with a rostral-caudal gradient to complete agyria, subcortical band heterotopia and/or microcephaly (Leventer et al., 2001; Lo Nigro et al., 1997; McInnes et al., 2007; Romero et al., 2018). Thus, haploinsufficient (or heterozygous) mutations have severe consequences in human (Di Donato et al., 2017), while depletion by 50% in mice shows only few defects of cortical development (Gambello et al., 2003; Hirotsune et al., 1998; Yingling et al., 2008). In *Lis1* HET animals in our study, no significant changes were observed in the production or cycling capabilities of RGs or IPs. Neuron production and cortical layering also appeared grossly unaffected, consistent with previous studies (Gambello et al., 2003; Pramparo et al., 2010). Thus *Lis1* HET mutation in the mouse from E9.5 only leads to comparatively mild defects, suggesting either the activation of compensatory factors (Pawlisz et al., 2008; Pramparo et al., 2010), or that in human, cortical development involves mechanisms not present in the mouse. Indeed, mice are naturally lissencephalic, while the human cortex is gyrencephalic and much more complex (Borrell, 2019).

*TBC1D3* is a hominoid specific gene, present in one copy in the chimpanzee and 8 in human (Hodzic et al., 2006). By *TBC1D3* overexpression in the mouse, it is possible to “humanize” the mouse cortex, enriching it in primate-like cells, and therefore potentially sensitizing the mouse cortex to mutations that

have deleterious effects in humans (Ju et al., 2016). Interestingly, when *TBC1D3* is overexpressed, HET and WT mice display differences, notably in numbers of bRG-like cells. This might reveal how bRGs could contribute to the human phenotype. Interestingly, it has already been shown that bRGs have perturbed mitosis in human MDS organoids (Bershteyn et al., 2017), exhibiting a contiguous deletion of 17p13 including *LIS1*. Our experiments in the *Lis1* mutant mouse differ since bRG production in the VZ was tested due to this single gene mutation. It is important to continue testing the role of *Lis1/LIS1* affecting the production and amplification of this cell type.

We hence focused on bRG-like cell production at mid-corticogenesis in *Lis1* HET mouse mutants. bRG producing mechanisms have been associated with either alterations of mitosis spindle orientation leading to more oblique and vertical divisions (Kalebic et al., 2018; Liu et al., 2017a; Wang et al., 2016a; Wong et al., 2015), and/or to detachment from the apical surface via decreased cell adhesion (Ju et al., 2016; Martínez-Martínez et al., 2016; Narayanan et al., 2018; Tavano et al., 2018; Taverna et al., 2014). Many of the genes that were described to increase bRG-like cell generation induce more oblique divisions (Penisson et al., 2019), and mitotic spindle orientation is a well-described mechanism that may contribute to the fine tuning of aRG daughter cell fate (LaMonica et al., 2013; Taverna et al., 2014). *Lis1* could contribute to this phenomenon by regulating dynein-dynactin complex activity (Coquelle et al., 2002; Htet et al., 2020; Wang et al., 2013a), as well as actomyosin-mediated cell membrane contractility, influencing cleavage plane positioning (Moon et al., 2020). However, the mechanisms by which *TBC1D3* promotes the expansion of the bRG-like cell pool in the mouse remain poorly understood. *TBC1D3* expression was shown previously to reduce the expression of N-Cadherin at the ventricular surface, with concomitant decreased expression of *Trnp1* and activation of the MAPK pathway (Ju et al., 2016; Stahl et al., 2013). However, the exact mechanisms initiated by these modifications remain unclear (Penisson et al., 2019) and notably we did not observe reduced N-Cadherin in our experimental conditions. It is also unclear how the N-Cadherin defects already present in *Lis1* mutant cells influence these processes to prevent the generation of bRG-like cells.

N-Cadherin and adherens junctions in general are known to maintain proper organization of the neuroepithelium (Stocker and Chenn, 2015). In organoids derived from MDS patient cells, N-Cadherin expression was also altered in the VZ and this phenotype was rescued with *LIS1* re-expression (Iefremova et al., 2017). This suggests a further role for *Lis1*, confirmed by our results, in the maintenance of apical junctions and the overall structure of the ventricular surface, which may be critical for bRG production.

Both *Lis1* depletion and *TBC1D3* expression led to an increased proportion of abventricular mitoses. These might explain progenitor detachment, in fitting with the increased numbers of bRG-like cells when *TBC1D3* is expressed. However, this phenomenon is not sufficient to explain the cellular identity of abventricularly dividing cells in *Lis1* mutants. During interkinetic nuclear migration (Kulikova et al.,

2011; Tavano et al., 2018), mitoses take place at the ventricular surface. Dynein is required for apical migration towards the ventricle (Tsai et al., 2010) and this process may be perturbed in *Emx1-Cre Lis1* mutants, leading to ectopically dividing ‘aRGs’. If apical migration is slower, or severely inhibited, this would increase the number of mitoses away from the ventricular surface. Such an ectopic position of the nucleus might be expected to impair *TBC1D3*-inducing mechanisms to generate bRG-like cells, since in our model, *TBC1D3* expression was induced in aRGs, after deletion of *Lis1*. Thus, we do not exclude that ectopic Pax6+ mitoses contribute to impairing bRG-like production, however, further defects were also observed at the ventricular surface itself in *Lis1* mutants.

The effect of *Lis1*'s depletion on mitotic spindle orientation has been well characterized both in mice and organoids. When *Lis1* expression is decreased in early apical progenitors (neuroepithelial or aRGs), performing mainly horizontal divisions (with vertical cleavage planes), they start to engage in oblique and vertical divisions (Yingling et al., 2008; Pramparo et al., 2010; Iefremova et al., 2017). Furthermore, *LIS1* expression in MDS organoids rescued the mitotic spindle angle phenotype (Iefremova et al., 2017), showing the importance of this gene for this phenotype. In our study, when comparing Control WT to Control HET, and *TBC1D3* WT to *TBC1D3* HET, we observed an angle dispersion increase, associated with *Lis1* mutation, as well as a small increase in the proportion of oblique divisions in presence of *TBC1D3*. Importantly though, the latter was quite mild compared to the *Lis1* phenotype and furthermore, the same angle of division could lead to different outcomes, i.e. oblique divisions in *Lis1* mutants may not engage daughter cells in the same fate as *TBC1D3* expression. It is possible that under *Lis1* mutant conditions, *TBC1D3* may not be able to induce a proper segregation of cell fate determinants and / or the maintenance of the basal process, required for the epithelial fate (Moon et al., 2020). Regulation of mitotic spindle orientation and mitosis progression is managed in part by a *Lis1*-Ndel1-dynein complex (Moon et al., 2014). Similar to the stabilization of microtubules, re-expression of *Lis1* or overexpression of *Ndel* or dynein led to rescue of spindle misorientation in *Lis1* mutant MEFs (Moon et al., 2014). We hence predict that an early rescue of spindle orientation in *Lis1* mutant aRGs, or a different timing of *Lis1* mutation, might enable *TBC1D3* to induce bRG-like cell production.

Our work combined with the previous MDS organoid study (Bershteyn et al., 2017) begin to decipher bRG mechanisms in *Lis1/MDS* mutant conditions. In our mouse mutant work, only *TBC1D3* is experimentally manipulated without the possibility of multiple entries into the bRG pathway. Alternatively, human cells in developing organoids are likely to express a larger battery of genes and signaling pathways involved in the generation of bRGs (Penisson et al., 2019). However, as the state of bRGs in human pathologies remains understudied, using a single gene e.g. *TBC1D3*, in mouse mutants can be useful for assessing specific pathways and helping us to further understand bRG mechanisms. bRGs have been suggested to be critical for the correct development of the cortex in gyrencephalic species, due to their number and proliferative properties. However, whether their number, distribution or function are perturbed in pathologies in which cortical folding is altered, i.e. in the human



lissencephaly brain, instead of organoids or mouse models, still remains unknown. Investigating human-like bRG cells induced in mouse models, produced with tools that can even lead to the generation of mouse cortical folds, can open new windows to study and revisit MCDs.

#### 4) [Methods](#)

##### a) [Animals](#)

Research was carried out conforming to national and international directives (directive CE 2010/63 / EU, French national APAFIS n° 8121) with protocols followed and approved by the local ethical committee (Charles Darwin, Paris, France). Mice were housed with a light/dark cycle of 12 h (lights on at 07:00).

Swiss wild-type (WT) mice (Janvier Labs, France) were used for *in utero* electroporation to confirm the TBC1D3 effect on bRG-like cell production (Ju et al., 2016). For the study of Lis1 depletion, Lis1 floxed allele mice (Hirotsume et al., 1998) maintained on the FVB background from which the neo selection cassette had been removed (obtained from Osaka University) were crossed with C57Bl6J Emx1-Cre knockin animals (Gorski et al., 2002). The Rosa26-EGFP<sup>RCE/RCE</sup> mouse line was used as reporter (Sousa et al., 2009). All mice were housed in the IFM institute animal facility or at the CDTA, Orléans, France.

Genotyping of all transgenic mouse lines was performed via PCR using these oligonucleotides:

Lis1	Lis1_LoxP5: CCT CTA CCA CTA AAG CTT GTT
	Lis1_LoxP3: TGA ATG CAT CAG AAC CAT GC
Emx1-Cre	Cre_forward: GGA CAT GTT CAG GGA TCG CCA GGC G
	Cre_reverse: GCA TAA CCA GTG AAA CAG CAT TGC TG
Rosa26-EGFP	Rosa_1: CCC AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT C
	Rosa_2: GAA GGA GCG GGA GAA ATC GAT ATG
	Cag3: CCA GGC GGG CCA TTT ACC GTA AG

##### b) [Plasmid preparation](#)

Plasmids were amplified from NEB 5α bacterial cultures transformed with pCS2-cMyc-TBC1D3 (gratefully received from Zhen-Ge Luo's team), pCS2-cMYC-Control (generated from the TBC1D3 construct) or pCAG-IRES-TdTomato plasmids (kindly provided by C. Lebrand, Lausanne), all of which carried the ampicillin resistance gene. These were cultured overnight (O/N) on petri dishes containing culture medium and ampicillin (50 mg/L). Clones were then amplified and cultured in 200 mL LB medium + ampicillin (50 mg/L) O/N. Plasmid DNAs were then extracted using the NucleoBond™ Xtra midi EF kit (Fisher Scientific), following the recommended protocol. After extraction, plasmid

preparations were resuspended in endonuclease-free H<sub>2</sub>O at approximately 5 µg/µL, concentrations verified with spectrophotometry (NanoDrop 1000 spectrophotometer, Thermo Scientific) and stored at -20°C.

### c) Electroporation in utero

E14.5 pregnant females were anaesthetized with 4 % isoflurane (Baxter) and a Minerve Dräger Vapor 2000 apparatus, and maintained on a heating pad at 37°C at 2-3% isoflurane depending on animal weight and respiratory rhythm. The abdomen of the animals was sectioned and uterine horns were extracted and kept hydrated with NaCl 0.9% (Braun) + penicillin streptomycin (P/S, 10 mg/mL). A plasmid solution (DNA concentration of 1 µg/µl + Fast-Green 1% (F-7258, Sigma)) was then injected in the lateral ventricles of the embryos with glass micropipettes. Micropipettes were generated from glass capillaries (GC150TF-10, Harvard Apparatus) that were pulled using a Narishige PC-100 pipette puller. Electrodes (CUY650P3, NepaGene) were placed on the sides of the head of embryos in such a way as to propagate entry of the plasmid in the pallium. Electroporation was performed with 5 pulses of 35 V, each with a duration of 50 ms, and with 950 ms intervals using a CUY21 (NepaGene) electroporator. The uterus was then replaced carefully inside the mother's abdomen, the inside of the abdomen was washed with NaCl 0.9% + P/S solution and the wound was closed with stitches using Vycril thread (VICRYL JV390, ETHICON) for the muscle wall, and, Ethilon thread (ETHILON F3206, ETHICON) for the skin. Mice were injected subcutaneously with Flunixin (4 mg/kg) and put back in their cage on a heating pad at 37 °C to recuperate with monitoring.

### d) Brain slicing, histology, immunofluorescence and confocal acquisition

Females that underwent *in utero* electroporation were sacrificed 48 hours later, and brains of embryos were collected and fixed in 4 % paraformaldehyde overnight at 4 °C. Brains were then rinsed and conserved in 1X PBS (diluted from PBS 10X, ET330 Euromedex) + 0.1 % azide (S200-2, Sigma-Aldrich). Prior to Vibratome sectioning, brains were embedded in an 8 % sucrose (200-301-B, Euromedex), 6 % agarose (LE-8200-B, Euromedex) PBS solution. Serial 50 µm thick coronal sections were performed with a VT1000S vibratome (Leica). For immunofluorescence labelling, 2 to 3 slices per brain were used for every experiment. Saturation and permeabilization was performed for 1 hour with a 10 % normal goat serum (NGS) (16210072, Gibco) and Triton X-100 (T9284, Sigma) solution in 1X PBS, then slices were incubated with primary antibodies O/N (or for 72 hours for Ki67) diluted in permeabilization and saturation buffer at 4 °C under agitation. Primary antibodies include Pax6 (Biolegend, BLE901301, 1:300), PH3 (Millipore, 06-570, 1:400), Tbr2 (AB23345, Abcam, 1:300), Tbr1 (grateful gift from Robert Hevner, 1:1000), aCas3 (559565, BD Pharmigen, 1:250), Ki67 (BD Biosciences, 556003, 1:300), N-Cadherin (BD Biosciences, 610920, 1:500). Ki67 antibody required antigen retrieval: prior to permeabilization and saturation, slices were incubated in 10 mM sodium

citrate, 0.05 % Tween pH 6.0 at 95 °C for 20 minutes, then left to cool down at room temperature before rinsing 3 times with 1X PBS. After incubation with primary antibodies, slices were rinsed 3 times with permeabilisation and saturation buffer. Secondary antibodies were then incubated at 1:800 dilution for 2 hours at room temperature under agitation, the list include donkey-anti-rabbit Alexa 488 (ThermoFisher, A21206), donkey-anti-mouse Alexa 488 (ThermoFisher, A21201), donkey-anti-rabbit Alexa 647 (ThermoFisher A31573). Slices were then rinsed with Hoechst (33258, Sigma) 1:10000 for 10 minutes diluted in 1X PBS, and then rinsed twice with 1X PBS. Slices were mounted on Superfrost Plus microscopic slides (Thermo Scientific) with Fluoromount-G (Invitrogen). Confocal acquisitions were performed with an SP-5 Leica microscope (x40), stacks of 30-40  $\mu\text{m}$  were performed.

#### e) Histology

For studies in mouse pups (P0), animals were rapidly decapitated, and brains were removed and postfixed in 4% paraformaldehyde overnight at 4°C and then stored in PBS. Then, dissected brains were embedded in 6% agarose and 8% sucrose. 50- $\mu\text{m}$  coronal sections were prepared using a vibratome (VT1000S; Leica), Nissl staining was performed on sections mounted on Superfrost slides (Thermo Fisher). The sections were analyzed with a brightfield microscope (Provis; Olympus) using a charge-coupled device (CCD) camera (CoolSNAP CF; Photometrics) and 4 $\times$  (NA = 0.13) objective.

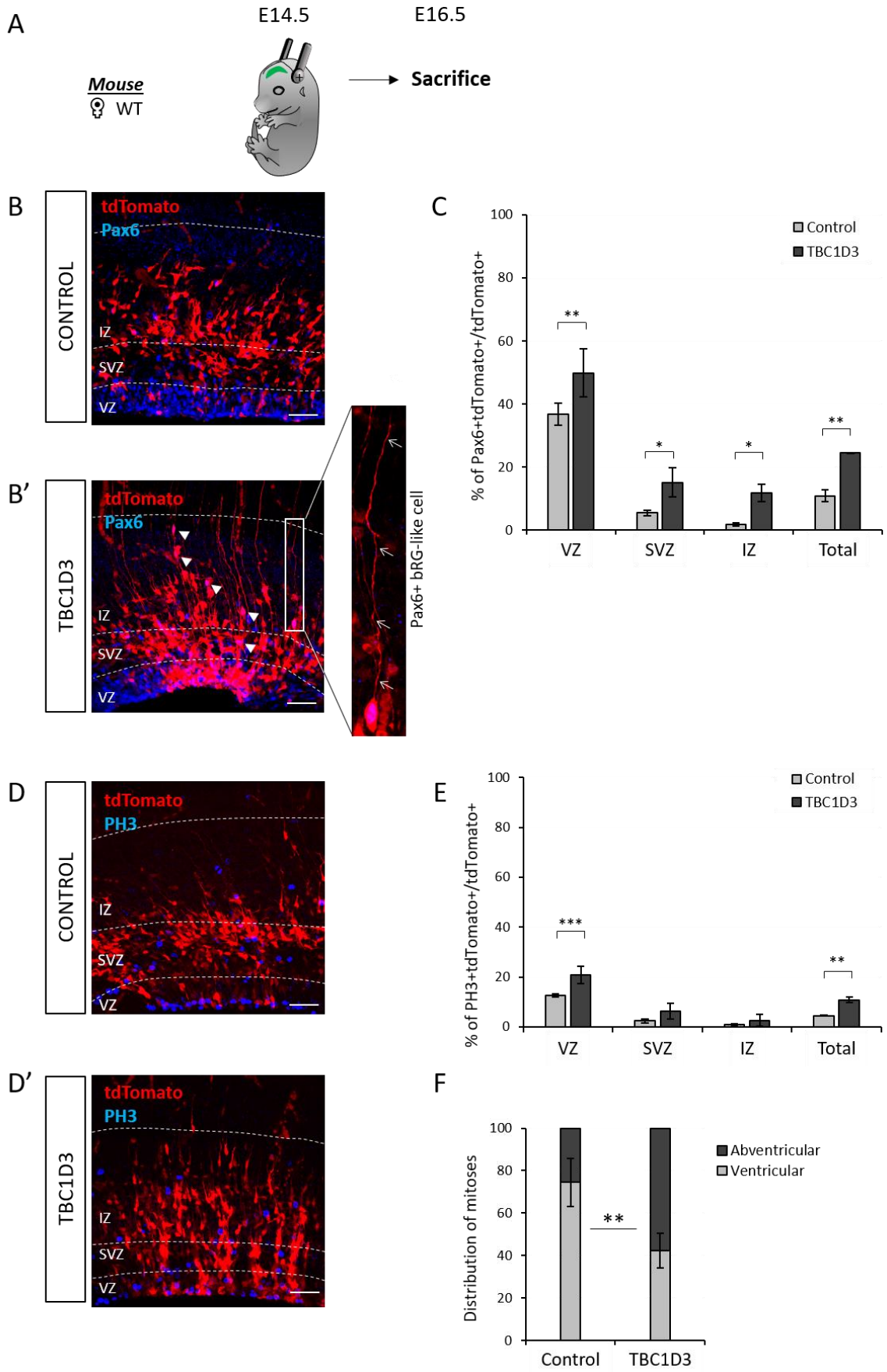
#### f) Analysis

Quantification for Tomato, Pax6, Sox2, Tbr1, Tbr2, Ki67, aCas3 and PH3, as well as mitotic spindle angles was performed using Icy Bioimage software. Regions of interest (VZ, SVZ, IZ, CP) were defined in actual, adjacent or similar level sections using Hoechst, Pax6, Sox2 and/or Tbr2 staining. VZ was defined using Pax6 staining, the IZ was characterized as a region of lower cell density using Hoechst, and the SVZ was defined either by Tbr2 staining or as the region lying in between predefined VZ and IZ. Cells positively stained for tdTomato and other nuclear markers, or aCas3 clusters, were counted with the “Manual Counting” plug-in according to their localization. Results are shown as a percentage of tdTomato cells, to account for variabilities in efficiency of *in utero* electroporation. Quantification for N-Cadherin fluorescence intensity was performed using Fiji software. Ten 20  $\mu\text{m}$  lines were drawn perpendicular to and across the ventricular surface such that the middle of each line (10<sup>th</sup>  $\mu\text{m}$ ) was at the transition between the ventricle and the ventricular surface, 5 lines were drawn at the junction between 2 cells, and 5 not at the junction (i.e. in the middle of cells). Multi plotting for pixel intensity was performed with ROI manager for each line. Values for measurements within the ventricles were discarded because ImageJ generated artefactual random values between 1 and 10. Values were also simplified for statistical analysis, one value of fluorescence per  $\mu\text{m}$  was kept out of the 163 values for 20  $\mu\text{m}$  that ImageJ generated. The means of the 5 lines for the junctions, 5 lines for the non-junctions

and 10 in total per image were then calculated. Cortical thickness was measured using Fiji software. 3 lines per hemisphere was drawn, and mean was calculated. Statistical analysis was performed using R and the Rcmdr graphical interface, and Prism software (GraphPad). Normality of residuals and homoscedasticity was checked with Shapiro and Levene tests respectively prior to performing any parametrical test (*t*-tests, one-way and two-way ANOVAs).

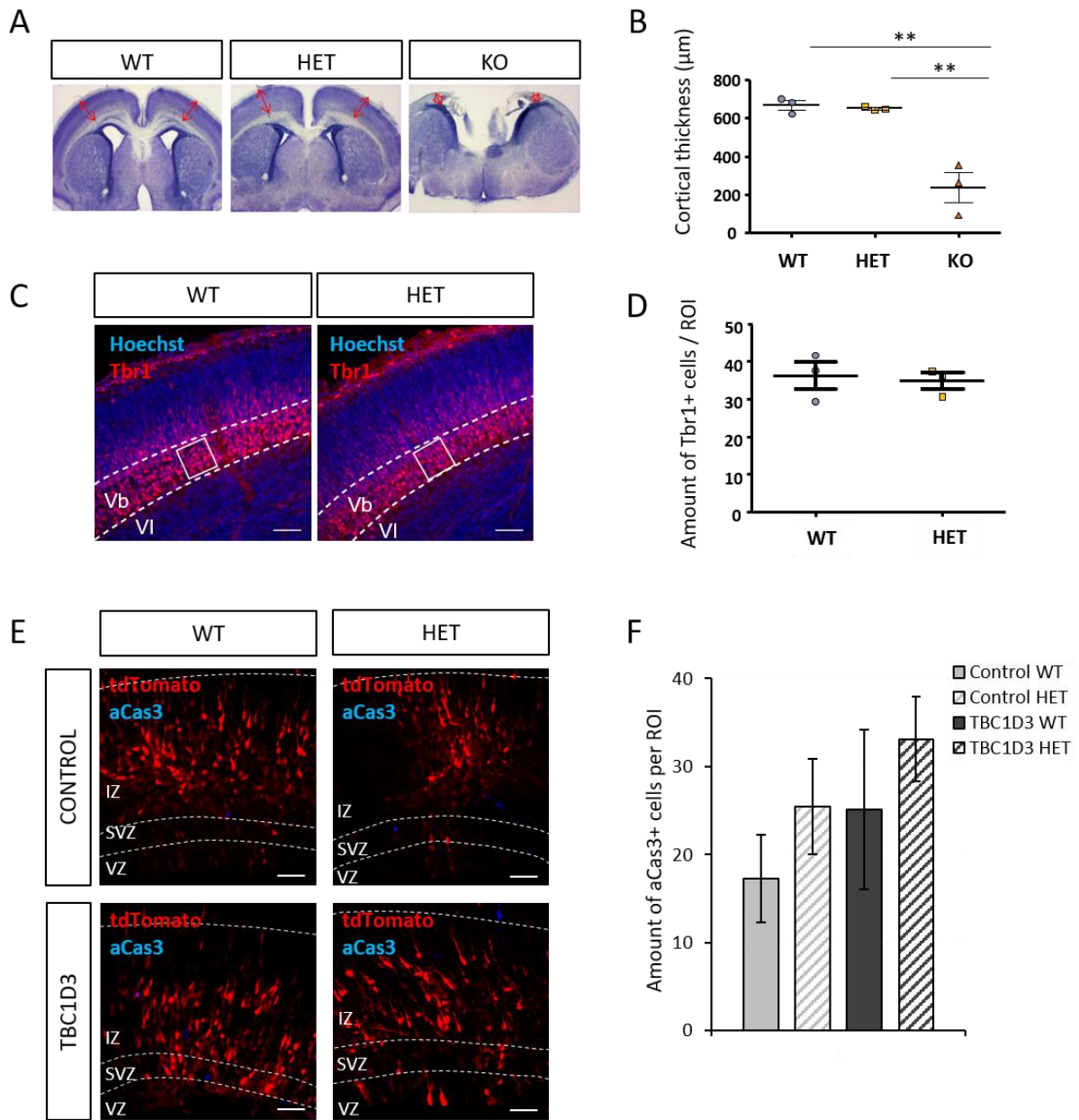
## 5) Figures

FIGURE 1



**Figure 1: TBC1D3 expression leads to the amplification of Pax6+ cells and the generation of bRG-like cells.** **A)** Schematic view of the protocol used for experiments in Figure 1: WT embryos (Swiss genetic background) were electroporated at E14.5 and sacrificed at E16.5. **B,B')** Pax6 immunohistochemistry (blue) of E16.5 electroporated mouse brains. Control (tdTomato, B) and TBC1D3 (tdTomato + TBC1D3, B') (arrowheads point to Pax6+ bRG-like cells in different regions of the cortical wall). Enlargement shows a Pax6+ bRG-like cell with typical morphology and showing a long basal process (arrows). **C)** Proportion of Pax6+ tdTomato+ / tdTomato+ cells in each cortical region and in the whole cortex ('Total') per ROI in control (grey bars) or TBC1D3 (black bars) electroporated brains (3 x 50 µm slices per brain, 3 animals per condition, 2-way ANOVA with Bonferoni *post hoc*, \* : p<0,05, \*\* : p<0,01). **D,D')** PH3 immunohistochemistry (blue) of E16.5 electroporated mouse brains. Control (tdTomato, D) and TBC1D3 (tdTomato + TBC1D3, D'). **E)** Proportion of PH3+ tdTomato+ / tdTomato+ in each cortical region and in the whole cortex ('Total') per ROI in Control or TBC1D3 electroporated brains (3 x 50 µm slices per brain, 3 animals per condition, 2-way ANOVA with Bonferoni *post hoc*, \*\* : p<0,01, \*\*\* : p<0.001). Note the overall increase of mitoses in TBC1D3 electroporated brains. **F)** Distribution of ventricular mitoses versus abventricular mitoses (3 x 50 µm slices per brain, 3 animals per condition, *t*-test, \*\* : p<0.01). Note the fact that the majority of mitoses take place at the ventricular surface in the control condition while TBC1D3 brains display a shift towards more abventricular mitoses. Scale bars (B,B',D,D') = 50 µm.

FIGURE 2



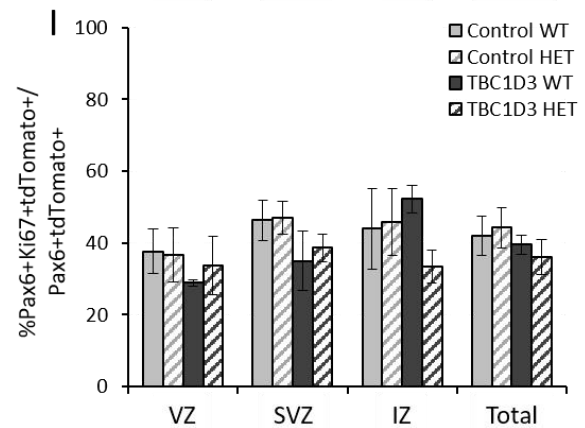
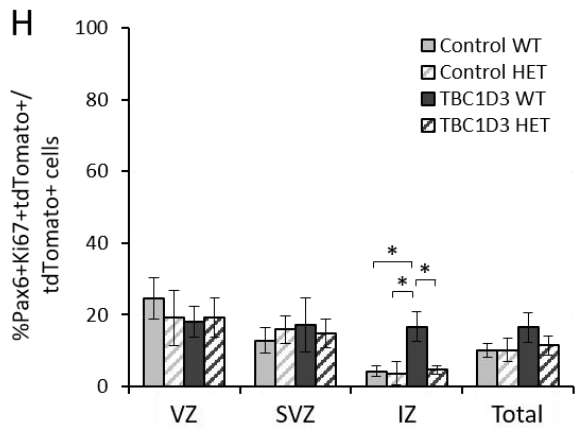
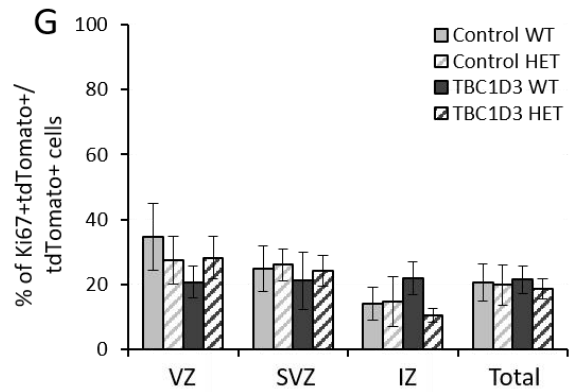
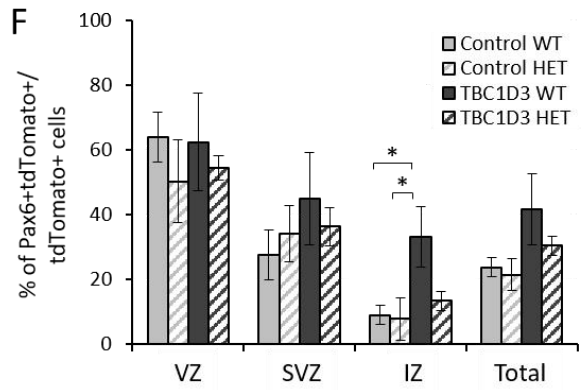
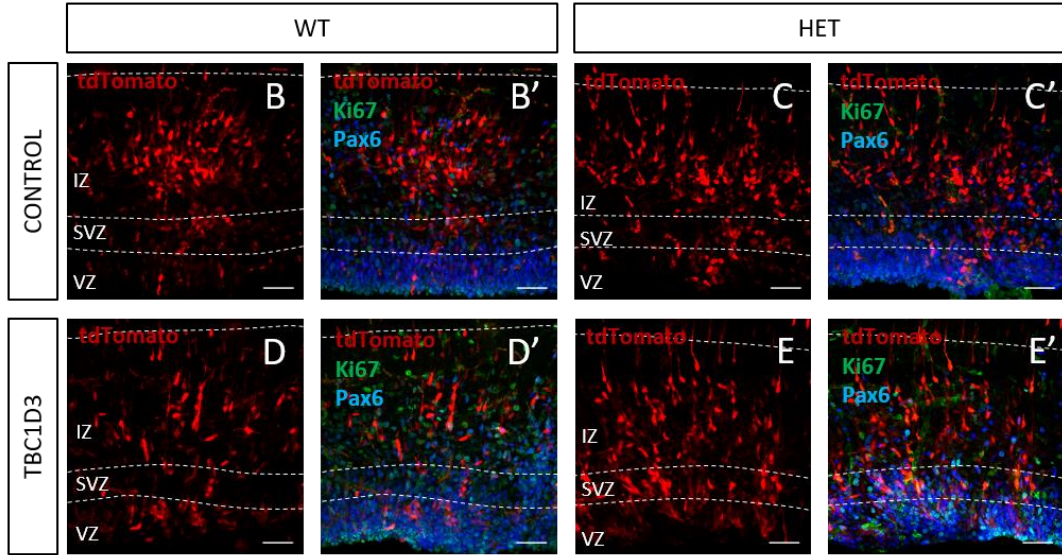
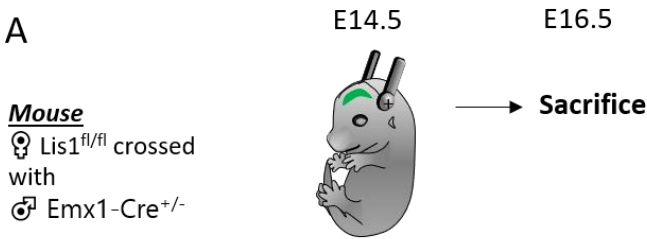
**Figure 2: Lis1 inactivation in forebrain neural progenitors severely impairs neocortical development in the KO, while heterozygotes show no major effects. A)** Nissl staining of Lis1 WT, HET and KO P0 brain slices. HET brains show no macroscopic differences compared to WT animals. The cortex and medial areas in KO brains appear severely affected (absence of cortex and corpus callosum). **B)** Quantification of cortical thickness (indicated by red arrows in A, 3 animals per condition, one-way ANOVA, \*\* :  $p < 0.01$ ) showing no differences between WT and HET mice, and a large reduction in KO mice. **C)** Tbr1 immunohistochemistry (red) at E16.5 in WT and HET mouse brains to label deep-layer neurons. Nuclei counterstained with Hoechst dye. White squares display typical ROIs used for quantification of cell number. **D)** Quantification of the number of Tbr1 cells per ROI (3 x 50 µm slices per brain, 3 animals per condition, *t*-Test). No significant difference was observed between



the genotypes. **E**) Activated Caspase 3 immunohistochemistry (aCas3, blue) in E16.5 WT and HET mice after IUE at E14.5 with tdTomato + pCS2-cMyc-Control (Control) and tdTomato + pCS2-cMyc-TBC1D3 (TBC1D3) electroporated brains. **F**) Quantification of aCas3 clusters per ROI in Control WT and HET, and TBC1D3 WT and HET animals. No significant differences were observed, but there were tendencies for an increase when *Lis1* is depleted and for when TBC1D3 is expressed. Scale bars (C,G) = 50  $\mu$ m.

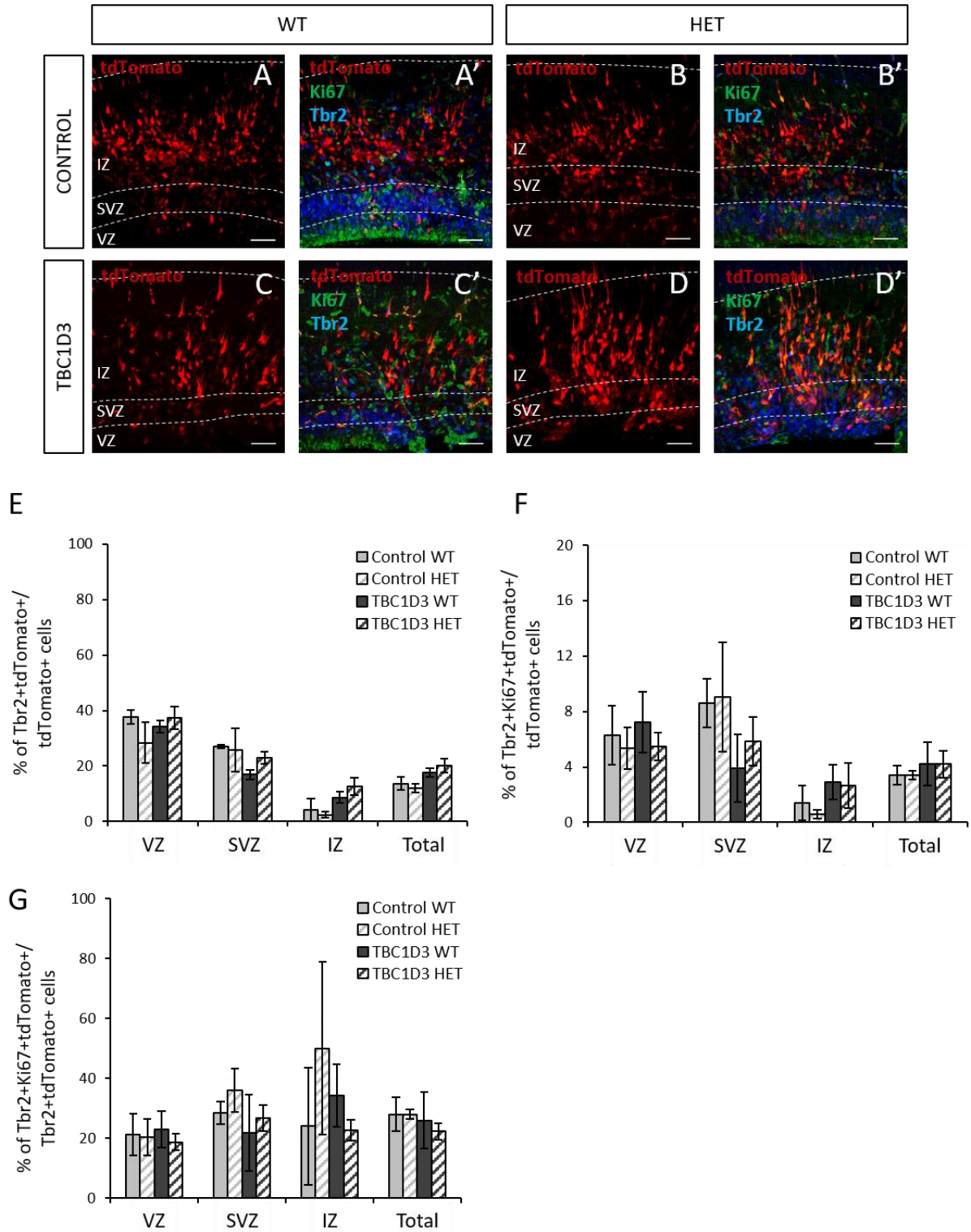
FIGURE 3

A



**Figure 3: *Lis1* depletion does not allow the generation of cycling bRG-like cells in the IZ in the presence of TBC1D3.** **A)** Schematic view of the protocol used: embryos from *Lis1<sup>fl/fl</sup>* females crossed with *Emx1-Cre<sup>+/-</sup>* males were electroporated at E14.5 and sacrificed at E16.5. **B - E')** Pax6 (blue) and Ki67 (green) immunohistochemistry in E16.5 WT (B, B', D, D') and HET (C, C', E, E') mouse brains after electroporation of pCS2-cMyc-Control + tdTomato (Control, B, B', C, C') and pCS2-cMyc-TBC1D3 + tdTomato (TBC1D3, D, D', E, E') plasmids. tdTomato alone and the merge of tdTomato, Pax6 and Ki67 staining are shown for each condition. **F, G, H, I)** Proportion of Pax6+ tdTomato+ / tdTomato+ (F), Ki67+ tdTomato+ / tdTomato+ (G), Pax6+ Ki67+ tdTomato+ / tdTomato+ (H) and Pax6+ Ki67+ tdTomato / Pax6+ tdTomato+ (I) cells in WT and HET brains electroporated with control or TBC1D3 plasmids. Results are presented as percentages across the cortical wall ('Total') or within each cortical region (3 x 50  $\mu$ m slices per brain, n=4 animals per condition, 2 Way ANOVA with Tukey *post hoc*, \*: p<0,05). Note TBC1D3 significantly increases Pax6+ and Pax6+Ki67+ proportions in the IZ, and this increase is prevented by *Lis1* depletion. Scale bars (B-E') = 50  $\mu$ m.

FIGURE 4

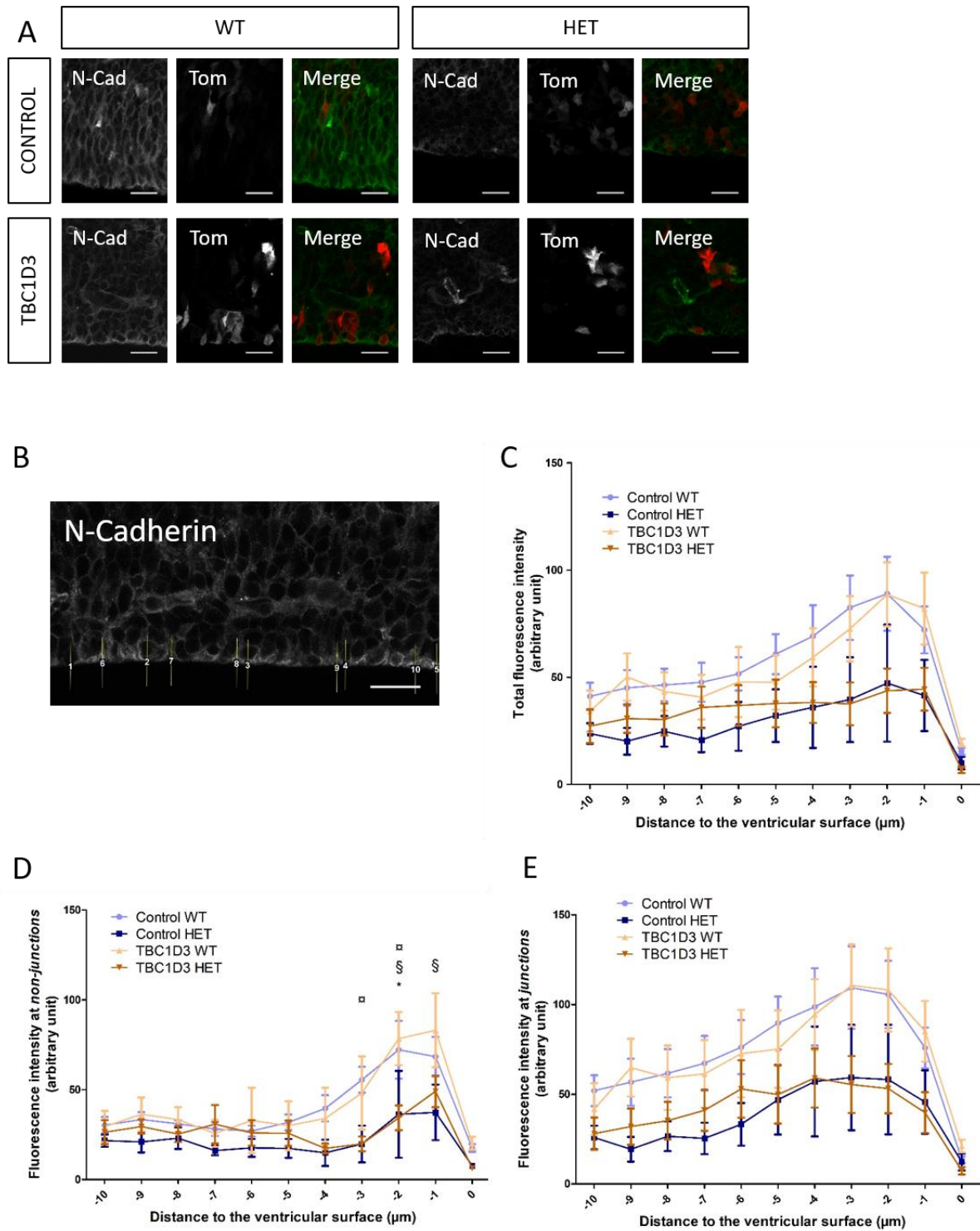


**Figure 4: Lis1 depletion has no effect on intermediate progenitors upon TBC1D3 overexpression.**

A) A - D') Tbr2 (blue) and Ki67 (green) immunohistochemistry in E16.5 WT (A, A', C, C') and HET (B, B', D, D') mouse brains after electroporation at E14.5 of pCS2-cMyc-Control + tdTomato (Control, A, A', B, B') and pCS2-cMyc-TBC1D3 + tdTomato (TBC1D3, C, C', D, D') plasmids. tdTomato alone

and the merge of tdTomato, Ki67 and Ki67 staining are shown. **E, F, G**) Proportion of Tbr2+ tdTomato / tdTomato+ (E), Tbr2+ Ki67+ tdTomato+ / tdTomato+ (F), Tbr2+ Ki67+ tdTomato+ / Tbr2+ tdTomato+ (G) in WT and HET brains electroporated with control or TBC1D3 plasmids. Results are represented as percentages across the cortical wall ('Total') or within each cortical region (3 x 50 µm slices per brain, n=5-8 animals per condition for Tbr2+ tdTomato+ / tdTomato analysis, n= 3 animals per condition for other analyses, 2 Way ANOVA with Tukey *post hoc*). Scale bars (A-D') = 50 µm.

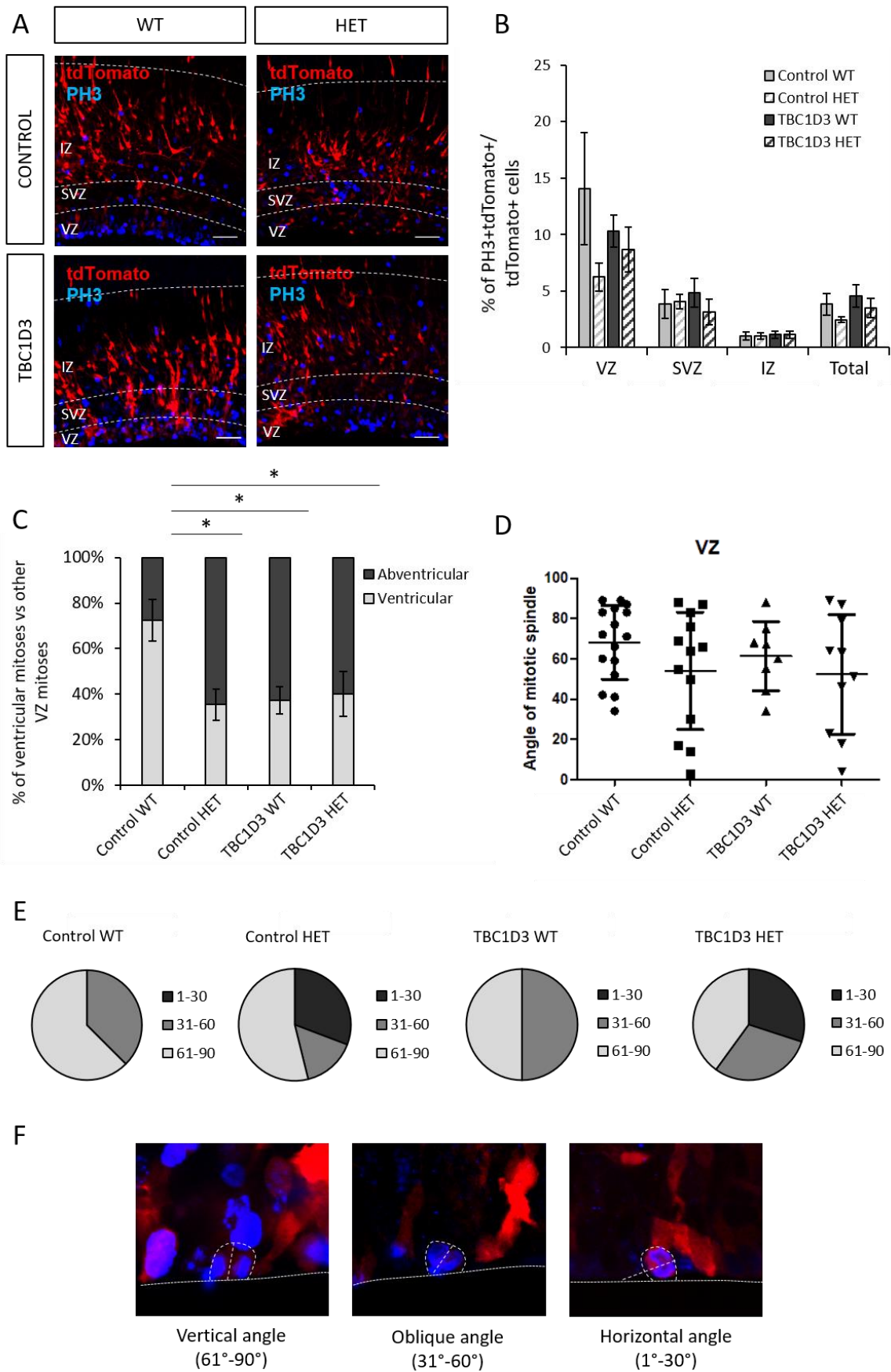
FIGURE 5



**Figure 5: Lis1 depletion perturbs N-Cadherin expression at the ventricular surface.** A) N-Cadherin immunohistochemistry in E16.5 WT and HET mouse brains after electroporation at E14.5 with pCS2-cMyc-Control + tdTomato (Control) and pCS2-cMyc-TBC1D3 + tdTomato (TBC1D3) plasmids. Figure

shows N-Cadherin (N-Cad), tdTomato (Tom), and merge panels for each condition. **B**) Example of N-Cadherin immunohistochemistry and quantification on an electroporated brain slice. Image shows 10 lines drawn with ImageJ that were used for quantification: fluorescence is quantified at every pixel along those lines. Among these lines, 5 were drawn in the “middle” of cells, at “*non-junction*” sites (lines 1-5), and 5 other were drawn in between cells, at “*junction*” sites (lines 6-10). **C, D, E**) Quantification of N-Cadherin total (C), “*non-junction*” (D) and “*junction*” (E) fluorescence intensity (arbitrary unit) at the ventricular surface every  $\mu\text{m}$  along a 10  $\mu\text{m}$  line perpendicular to the ventricular surface. The extremity of the ventricular surface is marked as 0 on the X axis. (3 x 50  $\mu\text{m}$  slices per brain, 3-4 animals per condition, 2-way ANOVA for repeated measures with Bonferoni *post hoc*, \* :  $p < 0,05$  between TBC1D3 WT and TBC1D3 HET, § :  $p < 0,05$  between Control HET and TBC1D3 WT, ¶ :  $p < 0,05$  between Control WT and TBC1D3 HET). Scale bars (A) = 20  $\mu\text{m}$ .

FIGURE 6



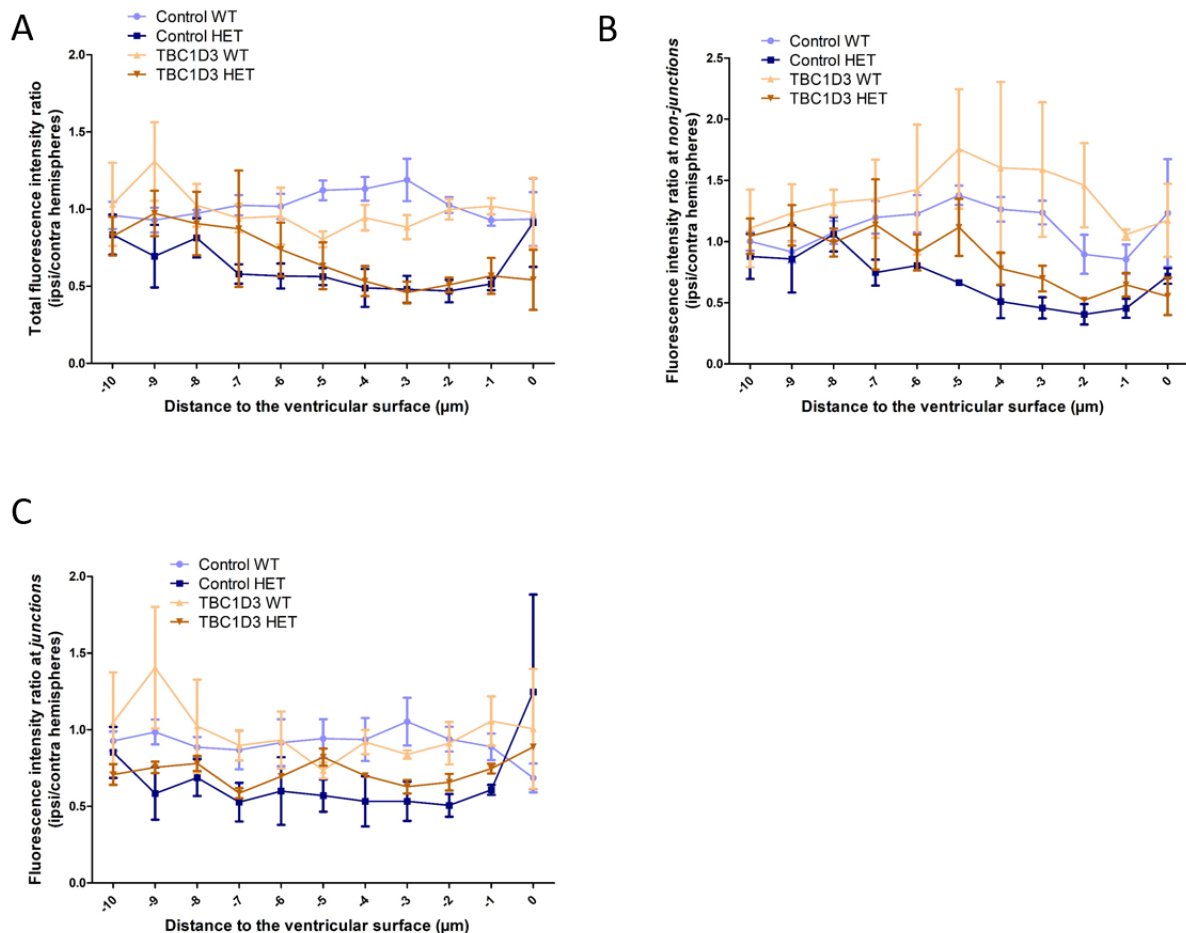


**Figure 6: Both *Lis1* and *TBC1D3* increase abventricular mitoses but only *Lis1* perturbs mitotic spindle orientations.** **A)** PH3 immunohistochemistry (blue) in E16.5 WT and HET mouse brains after electroporation at E14.5 with pCS2-cMyc-Control + tdTomato (Control) and pCS2-cMyc-TBC1D3 + tdTomato (TBC1D3) plasmids. **B)** Proportion of PH3+ tdTomato+ / tdTomato+ in each cortical region and in the whole cortex ('Total') per ROI in WT or HET mice electroporated with Control or TBC1D3 plasmids (3 x 50  $\mu$ m slices per brain, 7 animals per condition, 2-way ANOVA with Bonferoni *post hoc*). **C)** Distribution of ventricular mitoses versus abventricular mitoses (3 x 50  $\mu$ m slices per brain, 7 animals per condition, 2-way ANOVA with Bonferoni *post hoc*, \* :  $p > 0,05$ ). Note that the majority of mitoses take place at the ventricular surface in the control WT condition, while control HET, TBC1D3 WT and TBC1D3 HET brains display a significant shift towards abventricular mitoses. **D)** Distribution of mitotic spindle angles in electroporated cells dividing at the ventricular surface. Note wider variability for *Lis1* HET conditions with resulting lower angle mean. **E)** Mitotic spindle angles (categorized in vertical (90°-61°), oblique (60°-31°) and horizontal (30°-1°)) in electroporated cells dividing at the ventricular surface. Note that *Lis1* HET depletion dysregulates mitotic spindle angles by generating horizontal angles at the expense of vertical and oblique both in control and TBC1D3 conditions. For D,E 8-16 cells in 3 brain slices of n=6-8 animals per condition. **F)** Example of aRG mitoses for which the mitotic spindle angles were measured. Scale bar (A) = 50  $\mu$ m.

## 6) Résultats supplémentaires

Pour mieux apprécier l'effet de la déplétion de Lis1 sur l'expression de N-Cadhérine, j'ai quantifié un ratio de la fluorescence de N-Cadhérine mesuré dans l'hémisphère électroporé (ipsi) sur la fluorescence de N-Cadhérine mesuré dans l'hémisphère controlatéral, de manière totale (A), dans les zones de *non-jonctions* (B) et de *jonctions* (C). Dans ces mesures, un ratio de 1 indique donc qu'il n'y a pas de variation de l'intensité induite par l'électroporation.

Aucun des résultats ne présente de différences significatives entre les conditions, sans doute due à la variabilité des données. Malgré cela, nous voyons la même tendance que sur les résultats bruts présentés dans le manuscrit de l'article, les animaux mutants présentent un ratio inférieur aux animaux WT, qu'il s'agisse du vecteur contrôle ou TBC1D3. Ceci suggère donc que la déplétion de Lis1 induit une diminution de l'expression de N-Cadhérine au site d'électroporation. Ceci suggère donc que les animaux Control HET présentent un effet de l'électroporation sur l'expression de N-Cadhérine avec le vecteur contrôle. Ceci pourrait suggérer que les animaux Lis1 sont plus sensibles à la technique d'électroporation, et que le courant électrique pourrait perturber les protéines des jonctions adhérentes.



**Figure de résultats supplémentaires 1 : Quantification du ratio de fluorescence N-Cadhérine entre les hémisphères électroporés et controlatéraux.** Les graphes présentent les ratios calculés à partir des données de fluorescence mesurées le long de 10 lignes tracées de 20  $\mu\text{m}$  perpendiculairement à la surface ventriculaire, tous les  $\mu\text{m}$ . Seules les mesures réalisées dans le tissu sont indiquées (le micromètre 0 représentant la surface ventriculaire). Les graphes présentent les ratios pour les mesures totales (A), aux zones de *non-jonctions* (B) et de *jonctions* (C).

## C. Discussion

### 1) Conséquences de l'expression de *TBC1D3* dans un contexte mutant pour *Lis1*

Durant mes travaux de recherche lors de mon doctorat, j'ai tout d'abord pu confirmer que l'expression de *TBC1D3* permet d'induire la production de cellules bRG-like dans le cortex de souris. Ces cellules expriment Pax6, peuvent se diviser, et possèdent un processus basal uniquement, ou un processus basal et un apical, très similaire à la morphologie des bRGs chez le primate (Betizeau et al., 2013). Ensuite, j'ai pu donc démontrer l'effet d'une haploinsuffisance de *Lis1* sur la production de cellules bRG-like induites par *TBC1D3* chez la souris. En effet, l'expression de *TBC1D3* chez des souris hétérozygotes n'induit plus la production de ces cellules *a contrario* des animaux WT. Pour la première fois, mes résultats indiquent donc un potentiel effet d'une perte de *Lis1* sur un des mécanismes moléculaires associés à la production des bRGs. Cependant, ce mécanisme moléculaire entre *Lis1* et *TBC1D3* est inconnu, j'explorerai ce concept plus bas. Ce résultat pourrait avoir des implications cruciales dans notre compréhension de la pathogénèse des LIS, et du rôle que les bRGs ont dans cette pathologie.

J'ai apporté quelques éléments supplémentaires sur la compréhension des effets de l'expression de *TBC1D3* dans le cortex murin. Pour rappel, l'étude d'origine (Ju et al., 2016) présentait une augmentation des cellules Pax6+ sans précision des zones ou de « binning », et de la proportion de mitoses à la surface ventriculaire *versus* hors de la VZ sans mentionner une quantification des mitoses. D'abord, j'ai pu confirmer que l'expression de ce gène hominoïde augmente la proportion de cellules Pax6+, et augmente la proportion des mitoses abventriculaires. J'ai également montré un potentiel effet de l'expression de *TBC1D3* sur les orientations du fuseau mitotique : ce gène augmenterait la quantité de mitoses obliques, résultat original.

#### a) Impact du fond génétique sur les effets observés

Cependant, contrairement à l'étude d'origine (Ju et al., 2016), je n'ai pas observé de diminution significative de l'expression de N-Cadhérine à la surface ventriculaire dans les animaux WT électroporés avec *TBC1D3*. Il est possible que ce résultat soit expliqué par l'arrière-fond génétique utilisé. En effet, l'étude de Ju et al., 2016 utilise des animaux C57B16 alors que les animaux *Lis1*<sup>fl/fl</sup> ont un fond génétique FVB (et les animaux issus des croisements avec la lignée Emx1-Cre ont un fond génétique hybride FVB/C57B16). Le fond génétique des animaux pourrait également avoir un rôle dans la différence d'effet observée au sein de mes propres résultats. En effet, en testant initialement le

plasmide TBC1D3 (résultats présentés dans la Figure 1) dans des souris de l'arrière fond génétique *Swiss*, j'ai vu une augmentation significative de la proportion de cellules Pax6+tdTomato+ dans toutes les zones du cortex, et également une augmentation de la proportion de cellules PH3+tdTomato+ dans la VZ, aussi bien qu'en analysant le cortex en entier. Les résultats ont été différents dans les animaux FVB/C57Bl6 WT (Figure 3, uniquement une augmentation de la proportion de cellules Pax6+tdTomato+ dans l'IZ et Figure 6, pas d'augmentation du taux de cellules PH3+tdTomato+). Néanmoins, un résultat commun présent dans les animaux *Swiss* et FVB/C57Bl6 est l'augmentation des mitoses abventriculaires, résultat également présent dans les animaux C57Bl6 de l'étude originale (Ju et al., 2016). Ceci suggère donc une potentielle variabilité des facteurs promouvant la production de cellules bRG-like en fonction du fond génétique des animaux.

#### b) Mécanismes cellulaires pouvant expliquer l'absence de cellules bRG-like chez les animaux TBC1D3 HET

Lorsque *Lis1* est déplétée, l'expression de TBC1D3 ne permet plus d'induire la production de cellules bRG-like. Des altérations de nombreux mécanismes cellulaires associés à la production de ces cellules pourraient expliquer ce phénomène. Lors de mon travail de recherche de doctorat, j'ai étudié l'implication de deux de ces mécanismes possibles : l'expression de N-Cadhérine, et l'orientation du fuseau mitotique.

##### i) *Altération des jonctions adhérentes et de l'expression de N-Cadhérine*

J'ai pu montrer que la déplétion de *Lis1* entraîne une diminution de l'expression de N-Cadhérine à la surface ventriculaire, quel que soit le plasmide électroporé (résultats égaux entre les animaux Control HET et TBC1D3 HET). Ces résultats pourraient donc suggérer que la perte de *Lis1* désorganise ou fragilise les jonctions adhérentes en entraînant une perte de N-Cadhérine. Chez les organoïdes MDS, une altération du marquage N-Cadhérine a également été observée (Iefremova et al., 2017), même si les modalités étaient différentes : dans cette étude, la mutation MDS entraîne un marquage plus diffus, alors que dans les souris *Lis1* HET, la perte de *Lis1* entraîne apparemment une perte de N-Cadhérine. Ces différences peuvent s'expliquer par l'utilisation de modèles différents, et de mutations différentes. Toujours est-il que l'adhésion cellulaire entre les aRGs est perturbée quand *Lis1* (entre autres) est muté. Les jonctions adhérentes sont cruciales pour maintenir la polarité des aRGs (Stocker and Chenn, 2015), et cette polarité est cruciale pour le maintien du cil primaire, du centrosome et de la morphologie des aRGs. Une des possibles hypothèses serait donc que la perte de cette polarité pourrait participer à l'absence de production des cellules bRGs-like après expression de TBC1D3.

Cependant, ce résultat est à mettre en opposition aux résultats originaux de l'expression de TBC1D3 dans le cortex murin (Ju et al., 2016). Comment expliquer le lien entre la perte d'expression de N-Cadhérine et l'absence de cellules bRG-like quand TBC1D3 peut induire également une déplétion de N-Cadhérine pour produire ces mêmes cellules ? Le sauvetage de l'expression de N-Cadhérine dans des souris électroporées avec TBC1D3 permet de restaurer les mitoses au niveau de la surface ventriculaire, diminuant les mitoses basales (Ju et al., 2016). Ces résultats suggèrent l'hypothèse que la perte de jonctions adhérentes par perte de N-Cadhérine permet aux cellules bRG-like de délaminer et de rejoindre le cortex basal pour proliférer et produire des neurones. Pour réconcilier ces résultats aux miens, nous pourrions imaginer que les cellules apicales peuvent également délaminer dans le contexte mutant à la suite de la diminution d'expression de N-Cadhérine à la surface ventriculaire, mais ces cellules ne deviennent visiblement pas des cellules bRG-like puisqu'il n'y a pas d'augmentation de cellules Pax6+ dans l'IZ. Compte tenu de l'absence d'augmentation des cellules Tbr2, il est donc possible que ces cellules deviennent des neurones, ou dépérissent par apoptose. Cette deuxième hypothèse serait en adéquation avec la tendance observée de l'augmentation de cellules aCas3 que j'ai mesurée. Il faudrait de plus réaliser des marquages immunohistochimiques pour les neurones : des marquages Tuj1 nous permettraient de compter les cellules neuronales précoces dans les régions apicales, et des marquages de couches comme TBR1 (couches profondes), FOXP1 (couches intermédiaires), CUX1 (couches superficielles) ou NeuN (tous les neurones) pour permettrait d'apprécier le nombre et l'organisation des neurones dans la CP. Nous devons sans doute changer les paramètres de l'expérience : après 48h, très peu de cellules électroporées rejoignent la CP, attendre 24h de plus sera très certainement nécessaire, aussi bien que l'analyse de stades postnataux. Enfin, il semblerait que la déplétion de Lis1 semble induire un biais lors de l'électroporation *in utero*. En effet, comme mentionné dans les résultats supplémentaires, le ratio de fluorescence ipsilatéral/controlatéral est inférieur à 1 dans les animaux Control HET, ce qui suggère que l'intensité de fluorescence de N-Cadhérine dans ces animaux est inférieure dans l'hémisphère électroporé que dans l'hémisphère non-électroporé. Deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. Soit le vecteur contrôle induit une déplétion de N-Cadhérine, à la suite de dommages ou mutations subits lors des préparations, soit la déplétion de Lis1 sensibilise le cortex aux impulsions électriques de l'électroporation. Pour contourner ce problème technique, nous pourrions utiliser la lignée *Nestine-TBC1D3* générée par Ju et collègues, et la croiser avec des animaux *Lis1<sup>fl/fl</sup> Emx1-Cre<sup>+/WT</sup>* pour obtenir des animaux triple transgéniques qui expriment TBC1D3 dans tout le cortex sous le contrôle du promoteur du gène *Nestine* (expression dès E11.5). De cette manière, nous pourrions exprimer TBC1D3 dans le cortex d'animaux mutant pour *Lis1* sans passer par l'électroporation. Nous pourrions ainsi confirmer si la déplétion de Lis1 perturbe bien l'expression de N-Cadhérine, et en quoi l'expression de TBC1D3 change ce paradigme.

ii) *Anomalies de l'orientation du fuseau mitotique*

Lorsque TBC1D3 est exprimé chez les animaux WT, j'ai observé une tendance à une augmentation des divisions obliques. Ce résultat pourrait être cohérent avec l'effet de manipulation d'autres gènes pro-bRGs tels que TMEM14B, Pax6, Shh, Cdh1 et Lgn/Gspm2 qui augmentent la proportion de divisions obliques (Kalebic et al., 2018; Liu et al., 2017a; Martínez-Martínez et al., 2016; Shitamukai et al., 2011; Wang et al., 2016a; Wong et al., 2015), mécanisme associé à la production de ces cellules (LaMonica et al., 2013). Enfin, j'ai également montré que la déplétion de Lis1 perturbe l'orientation du fuseau mitotique (avec le plasmide contrôle), ce qui est cohérent avec la bibliographie (Bershteyn et al., 2017; Iefremova et al., 2017; Moon et al., 2014; Pramparo et al., 2010; Yingling et al., 2008). Nous voyons donc plus d'angles obliques et verticales, et une variabilité augmentée de ces angles chez les animaux mutants pour Lis1. Ces effets observés sont cohérents avec la littérature (**Figure 44B** et **Figure 47C**). En effet, on voit des angles moyens avec des valeurs d'angles inférieures et des intervalles de confiance sensiblement plus grands pour les animaux HET que pour les animaux WT. On peut relever le fait que pour ces deux études citées et mes propres résultats, les intervalles de confiance sont très largement chevauchants, ce qui normalement suggérerait des résultats pas significativement différents. Une des explications possibles à l'existence de résultats significatifs dans ces articles publiés, malgré des variabilités visiblement grandes serait par un nombre de réplicats, ici le nombre de cellules en division mesurées, extrêmement conséquent, ce qui peut entraîner une ANOVA significative. Dans mes expériences, je suis limité par le facteur électroporation : le nombre de cellules fluorescentes en anaphase au moment de la fixation du cerveau est extrêmement faible. Pour contourner ce problème technique, nous pourrions utiliser des animaux doubles transgéniques *Lis1<sup>fl/fl</sup> Nestine-TBC1D3*. De cette manière, toutes les aRGs exprimeront TBC1D3 et pourront être analysés dans les animaux WT ou HET. Bien entendu, une expression plus précoce de TBC1D3 et globale aura potentiellement des effets différents par rapport à l'électroporation *in utero*. J'explorerai les considérations associées à cette expérience un peu plus tard dans la discussion.

Cette augmentation des mitoses obliques et de la variabilité des angles est également présente dans les animaux TBC1D3 HET. Comme je l'ai présenté lors de l'introduction, l'orientation du fuseau mitotique pourrait jouer un rôle prépondérant dans l'acquisition du destin cellulaire adéquat. De plus, LIS1 régule la localisation d'autres protéines particulièrement importantes pour le bon déroulement de la mitose, telles que la dynéine, l'Anilline, l'anneau contractile d'actine, et les microtubules astraux et kinétochoriens (Moon et al., 2014, 2020; Pawlisz et al., 2008; Wang et al., 2013b). Une haploinsuffisance de *Lis1* chez la souris induit donc des perturbations de cette orientation en altérant la machinerie moléculaire de la division cellulaire. Ces phénomènes pourraient donc participer à la perturbation de l'induction du destin cellulaire des cellules bRG-like par TBC1D3.

Un élément dans ces résultats est perturbant. Lorsque *Lis1* est muté, due à la grande variabilité des angles de divisions, nous observons obligatoirement plus de divisions obliques et verticales que dans les conditions sauvages. Nous avons dit plus haut et dans l'introduction que les divisions obliques étaient parfois corrélées à l'apparition de bRGs (LaMonica et al., 2012; Penisson et al., 2019). Cependant, comme nous avons pu le décrire, ces mitoses obliques peuvent être aussi associées à d'autres destins cellulaires (Uzquiano et al., 2018), comme les destins d'IPs, de neurones, ou alors associées à la production de progéniteurs apicaux ectopiques, comme dans le mutant *Eml1* (Kielar et al., 2014) ou dans la perte de fonction de *Lgn/Gsp2* (Konno et al., 2008). Ces progéniteurs ectopiques sont Pax6+, donc nous pouvons nous demander s'il s'agit de cellules bRG-like, ou alors d'aRGs pathologiques ayant délaminés hors de la VZ, et ayant une fonction altérée. Je reviendrai sur cette notion lorsque je développerai les notions de bRGs et pathologies. Enfin, la corrélation entre l'orientation du fuseau mitotique et l'acquisition d'un destin cellulaire commence à être discutée. En effet, l'inactivation de *Rgs3* (*Regulator Of G Protein Signaling 3*) ou de *Kif20a* (isoforme de la kinésine) chez la souris induit une neurogenèse précoce, sans pour autant modifier l'orientation du fuseau mitotique. Ces données suggèrent que la relation entre l'orientation du fuseau mitotique et la différenciation cellulaire des cellules filles est bien plus complexe qu'une association simpliste « oblique = IP/bRG/neurone ». De plus, la randomisation des angles semble induire une désorganisation de toutes les populations cellulaires du cortex en développement, comme le suggère les résultats de perte de fonction de *Lgn/Gsp2* : on retrouve dans les souris mutantes une délocalisation basale des cellules Pax6+, des cellules *Tbr2*+ et des cellules PH3+ (Konno et al., 2008). Ces effets de la randomisation observés dans ces modèles de souris mutantes dépendent des gènes impliqués. En effet, comme nous pouvons le voir dans mes résultats, et les autres études qui proposent des analyses de l'orientation du fuseau mitotique, les conditions mutantes pour *Lis1* présentent une variabilité largement augmentée par comparaison à la situation WT, comme si l'angle de la division était aléatoire. Pourtant, une augmentation de la production de RGs ectopiques, qu'il s'agisse d'aRGs ectopiques ou de bRGs/cellules bRG-like, n'a jamais été recensée à la suite d'une déplétion de 50% de *Lis1*.

Cela révèle donc une dichotomie entre une division oblique dans un contexte « sain » (si tant est que l'expression de gènes tels que *TBC1D3* est saine), et une division oblique dans un contexte d'acquisition d'angle mitotique perturbée. Les effets drastiques de la perte de *Lis1* sur toute la machinerie mitotique, impliquant potentiellement ses partenaires tels que la dynéine (di Pietro et al., 2016), pourraient expliquer cette différence. De plus, comme dit plus haut, l'angle de division seul n'est pas suffisant pour engager les cellules filles dans un destin cellulaire spécifique. Le destin cellulaire acquis par défaut à la suite à une mitose anormale pourrait être le destin neuronal au détriment du pool de progéniteurs, ce qui serait cohérent avec la littérature (Bershteyn et al., 2017; Iefremova et al., 2017; Pawlisz et al., 2008; Pramparo et al., 2010). *TBC1D3* aurait besoin, pour induire le destin cellulaire d'un bRG, d'une machinerie cellulaire fonctionnelle, ce qui n'est pas le cas dans les souris *Lis1* HET. La



réduction de l'expression de *Lis1* semble en effet perturber bien d'autres processus cellulaires que simplement l'orientation du fuseau. Des expériences pour analyser les populations neuronales dans nos conditions pourraient nous permettre d'en savoir plus.

Un élément qui semble crucial dans la compréhension de ces effets observés est de savoir s'ils sont une conséquence directe ou indirecte de la réduction du dosage de *Lis1*. Autrement dit, est-ce que la diminution d'expression de *Lis1* induit directement des perturbations de l'expression et/ou de l'adressage de la N-Cadhérine et de l'orientation du fuseau mitotique, ou ces effets sont-ils indirects, et associés à d'autres mécanismes qui sont perturbés par *Lis1*, tels que la fonction de la dynéine et la polymérisation et dépolymérisation des microtubules astraux et kinétochoriens lors de la mitose ? Et quelle sont les modalités de ces perturbations quand *TBC1D3* est exprimé ? Compte tenu des liens fonctionnels très étroits que *LIS1* tisse avec ses partenaires et l'importance de la présence de ces derniers pour la régulation de la dynéine, il semble difficile de dissocier ces partenaires de la fonction de *LIS1*. Cela étant dit, pour évaluer ces effets, nous pourrions tout d'abord évaluer l'expression de N-Cadhérine par RT-qPCR et Western Blot sur des lysats de cerveaux de souris Control WT et HET, ou sur des cultures primaires de progéniteurs et neurones. Si l'expression de cette protéine est réduite, cette deuxième expérience nous permettrait facilement de transfecter ces cellules par un plasmide pCAG-*LIS1* avec ou sans le plasmide *TBC1D3* et d'évaluer si ces conditions restaurent l'expression de N-Cadhérine. Nous pourrions aussi réexprimer la N-Cadhérine et évaluer si cela permet de restaurer l'orientation du fuseau mitotique dans les animaux *TBC1D3* HET. Enfin, nous pourrions également réaliser des expériences de vidéomicroscopie pour étudier la localisation et la fonction de la dynéine en croisant une lignée de souris knock-in dynéine-GFP avec les souris floxées pour *Lis1*. (Twelvetrees et al., 2016). Évaluer la localisation de la dynéine lorsque *TBC1D3* est exprimé et lorsque *Lis1* est déplété nous permettra de mieux comprendre les mécanismes subcellulaires qui sous-tendent la prévention de l'induction des cellules bRG-like lorsque le dosage de *Lis1* est réduit, et d'établir si une perturbation de la dynéine contribue au phénotype.

### *iii) Confirmation du rôle de *Lis1* dans la prévention de la production de cellules bRG-like*

- Sauvetage du phénotype induit par la déplétion de *Lis1* ?

Une des premières expériences à réaliser à la suite de ce travail de recherche serait d'essayer de restaurer la production de cellules bRG-like chez les animaux HET électroporés avec le vecteur *TBC1D3*. En effet, l'objectif serait de démontrer qu'il s'agit bien de l'haploinsuffisance de *Lis1* qui directement empêche l'expression de *TBC1D3* d'induire la production de cellules bRG-like. En réexprimant *Lis1* dans les souris HET, l'expression de *TBC1D3* pourrait-elle promouvoir la genèse de bRGs ? Pour réaliser ceci, je pourrais co-électroporer les vecteurs contrôle ou *TBC1D3* avec un pCAG-

LIS1 dans les souris HET. En effet, des expériences de sauvetage de phénotype par réexpression de LIS1 dans des organoïdes MDS montrent une amélioration de l'organisation de la VZ, de l'orientation du fuseau mitotique des aRGs et de la production des cellules TBR2+ qui était augmentée chez le mutant (Iefremova et al., 2017). J'évaluerai donc si l'expression de LIS1 chez les animaux hétérozygotes permet de restaurer l'effet sur les cellules bRGs-like, potentiellement sur les neurones (si l'expérience de mesure des neurones montre des effets sur ces cellules en fonction de TBC1D3 et de la mutation), sur l'expression de N-Cadhérine et l'orientation du fuseau mitotique.

Cette expérience pourrait se révéler plus complexe qu'il n'y paraît, car nous avons vu que *Lis1* est extrêmement sensible à son dosage pour maintenir sa fonction physiologique. Nous pourrions difficilement contrôler la quantité de *Lis1* exprimée par un plasmide et nous pourrions arriver à un surdosage de *Lis1*, qui entraînerait des perturbations de la fonction des progéniteurs (Bi et al., 2009). Cependant, nous pourrions tirer avantage des protéines partenaire de *Lis1*. Certains articles montrent un sauvetage, ou une absence de sauvetage de certains phénotypes liés à la déplétion de *Lis1* en surexprimant ses partenaires dynéine, *Nde1* (Moon et al., 2014) ou *Ndel1* (Shu et al., 2004). Nous pourrions essayer de sauver le phénotype de diminution de la production de cellules bRG-like en co-électroporant TBC1D3 et un plasmide pCAG-NDE1/NDEL1/dynéine dans des souris *Lis1* HET et tester si TBC1D3 est capable d'induire la production de cellules bRG-like dans ces conditions. Nous pourrions également tenter de restaurer le phénotype N-Cadhérine en co-électroporant le vecteur TBC1D3 avec un vecteur pCAG-N-Cadherine ou un vecteur pCAG-*PLEKHA7*, exprimant une protéine des jonctions adhérentes, comme nous l'avons vu dans la section 2c) de l'introduction (Tavano et al., 2018), pour compenser les anomalies des jonctions adhérentes induites pas la déplétion de *Lis1*. Cependant, l'étude originale TBC1D3 a montré que le sauvetage de N-Cadhérine prévient la production de BPs, et potentiellement de cellules bRG-like (Ju et al., 2016), et il s'agit du même phénomène pour *PLEKHA7* (Tavano et al., 2018), suggérant comme je l'ai mentionné plus tôt que les résultats de cette expérience pourraient dépendre du dosage fin de ces protéines aussi bien que le fond génétique des animaux utilisés. Toujours est-il que les molécules utilisées qui pourraient restaurer l'effet de la mutation de *Lis1* sur la production de cellules bRG-like dépendante de TBC1D3 permettront de décortiquer le phénotype observé et les mécanismes moléculaires impliqués.

- Effet de la temporalité des évènements

Nous pouvons questionner la temporalité de la déplétion de *Lis1* et de l'expression de TBC1D3, aussi bien que les autres molécules réexprimés dans le but de restaurer le phénotype. Dans nos expériences, *Lis1* est inactivé à 50 %, avant l'induction de l'expression de TBC1D3 par électroporation *in utero*. En induisant l'expression de la Cre sous le contrôle du promoteur d'*Emx1*, la recombinaison a lieu dans les NEs. Nous avons vu que la fonction de *Lis1* dans les NEs est absolument nécessaire, mais

moins pour les aRGs (Yingling et al., 2008). Que se passerait-il si la déplétion de *Lis1* coïncidait avec l'expression de TBC1D3 ?

Pour répondre à cette question, j'ai d'abord réalisé des co-électroporations de TBC1D3 avec un vecteur pCAG-CRE-IRES-GFP dans des animaux *Lis1<sup>fl/fl</sup>* pour synchroniser les événements. L'avantage de cette technique est qu'elle nous permet d'étudier une déplétion focale de *Lis1*, à opposer à la déplétion globale induite par le transgène *Emx1-Cre*. Malheureusement j'ai rencontré des problèmes techniques avec cette approche et aucun signal GFP n'a pu être détecté. Nous ne savions pas si le plasmide n'était pas fonctionnel, ou si la présence de la GFP après l'IRES induisait une expression trop faible. Pour résoudre ce problème, j'ai mis en place des croisements entre des animaux *Lis1<sup>fl/fl</sup>* et des animaux de la lignée *Rosa26-EGFP<sup>RCE/RCE</sup>* afin d'obtenir des animaux double transgéniques. L'avantage de cette dernière lignée rapportrice est qu'il y a une expression de la GFP lorsque la Cre est présente (Sousa et al., 2009). Un fois ces animaux obtenus, j'ai réalisé des co-électroporations avec le vecteur TBC1D3 ou contrôle combiné à un vecteur pCAG-CRE. Le signal fluorescent était compatible avec une analyse en immunofluorescence. L'autre avantage de ce croisement était la possibilité d'étudier en plus de l'état HET que j'ai déjà étudié avec le croisement avec les animaux *Emx1-Cre*, un contexte homozygote KO, puisque seules les cellules recevant le vecteur Cre auraient été mutantes. Aucune différence significative entre vecteur WT, HET et KO, quel que soit le plasmide utilisé, ne fut observée. Il faut mentionner néanmoins qu'il y avait une très forte variabilité dans les résultats ne facilitant pas l'interprétation des analyses.

Plusieurs arguments peuvent être fournis afin d'expliquer cette absence de différence significative entre les conditions. D'une part, la co-électroporation du vecteur Cre avec les vecteurs contrôles ou TBC1D3 a pu induire des perturbations dans les aRGs, produisant la variabilité dans les résultats que j'ai observée. D'autre part, compte tenu de la demi-vie de la protéine (Caspi et al., 2003; Gerlitz et al., 2005), deux jours entre l'introduction de Cre et le sacrifice de l'animal ne sont peut-être pas suffisants pour observer des différences. Pour résoudre ce deuxième point, nous pourrions répéter cette expérience et sacrifier les animaux plus tard (E17.5 ou E18.5) pour laisser suffisamment de temps pour la perte de la protéine, vérifiant que la concentration de *Lis1* diminue.

Une autre expérience qui permettrait de résoudre la question de la temporalité serait d'utiliser une autre lignée Cre. Pour étudier l'effet d'une déplétion plus tardive de *Lis1* par rapport à E9.5, il faut se placer après la transition des NEs en aRGs en croisant les souris *Lis1<sup>fl/fl</sup>* avec des souris *Gfp-Cre* par exemple. Effectuant l'électroporation de TBC1D3 dans ce contexte pourrait révéler de nouveaux rôles de *Lis1* dans la production des bRGs. Enfin, nous pourrions également tenter d'évaluer l'effet d'une déplétion de *Lis1* après que les cellules bRG-like aient été induites, aient migré et aient commencé à proliférer. Les résultats organoïdes MDS suggèrent que la perte de *LIS1* (et d'autres gènes associés au syndrome MDS) perturbe la durée de mitose et la MST (Bershteyn et al., 2017). Pour étudier si une

déplétion de *Lis1* impacte la fonction de cellules bRG-like induite par TBC1D3, nous pourrions co-électroporer des animaux *Lis1<sup>fl/+</sup>* et *Lis1<sup>fl/fl</sup>* pour étudier un contexte avec TBC1D3 et un vecteur pCAG-ERT2-Cre-ERT2, codant pour une Cre dont l'expression serait inductible par injection intrapéritonéale de tamoxifène. Nous pourrions réaliser l'électroporation à E13.5 et des injections de tamoxifène à E14.5 et E15.5, et sacrifier les animaux 2 ou 3 jours après l'injection pour laisser suffisamment de temps pour que la réduction de *Lis1* ait lieu, compte tenu de la demi-vie relativement longue de la protéine. Nous pourrions tout d'abord vérifier si les cellules bRG-like sont toujours présentes, et en quel nombre, sachant qu'il est aussi possible que ces cellules dégèrent à la suite de la déplétion de *Lis1*. Enfin, si ces cellules sont présentes, nous pourrions réaliser des expériences de vidéo-microscopie pour suivre le cycle cellulaire de cellules bRG-like WT et mutantes, et évaluer si la durée de la mitose, la distance parcourue durant la MST, et d'autres processus cellulaires, sont perturbés lorsque *Lis1* est inactivé par cette manière.

Pour conclure ce volet sur la temporalité des modifications génétiques, nous pourrions également sacrifier les animaux *Emx1-Cre Lis1* mutant électroporés par TBC1D3 plus tard. En effet, TBC1D3, en promouvant la production de cellules bRG-like, peut induire la formation de pseudo-circonvolutions à la surface du cerveau murin (Ju et al., 2016). Compte tenu du fait que chez les HET, nous ne voyons pas d'augmentation de cellules bRG-like, on s'attend à ce qu'il n'y ait aucun replis. On pourrait réaliser des électroporations à E14.5 comme je l'ai déjà fait et laisser les animaux se développer jusqu'à P3 ou P7, stades auxquels les auteurs de l'étude d'origine sur TBC1D3 ont vu les pseudo-circonvolutions pour confirmer cette hypothèse. Nous pourrions également évaluer l'effet d'une expression précoce et globale de TBC1D3 en utilisant les animaux *Nestine-TBC1D3 ; Lis1<sup>fl/fl</sup> ; Emx1-Cre<sup>+/-</sup>*. D'une part, nous pourrions évaluer si la déplétion de *Lis1* a les mêmes effets si TBC1D3 est exprimé plus tôt. Pourrait-il y avoir des compensations grâce à ce changement de temporalité d'expression ? D'autre part, il sera potentiellement plus aisé d'observer des effets sur la pseudo-gyrification du cortex murin dans ce modèle, compte tenu de l'expression étendue de TBC1D3 dans l'intégralité des aRGs. Les deux expériences seront intéressantes à effectuer en parallèle, considérant les résultats obtenus dans l'étude originale (Ju et al., 2016). L'électroporation de TBC1D3 est associée à la formation de replis profonds uniques, sans doute due au caractère focal de l'expression dans la zone électroporée (Figure 5A de Ju et al, 2016). Les animaux *Nestine-Cre* quant à eux présentent des « bourgeonnements » plus que des replis, et ce sur toute la surface du néocortex (cohérent avec une expression globale de TBC1D3, Figure 5B-G de Ju et al, 2016). Nous pourrions donc tester l'effet de la déplétion de *Lis1* dans ces deux modalités. Si l'apparition des circonvolutions est empêchée dans les animaux HET, nous aurions une corrélation très intéressante : la production de bRGs induit des circonvolutions à la surface du cerveau murin, et l'absence de ces cellules causée par la déplétion de *Lis1* est associée à un cortex lissencéphalique (ou hétérotopique ?). Cette expérience pourrait, pour la première fois, montrer un lien entre *Lis1*, les cellules bRG-like et la formation des circonvolutions. Il n'est pas exclu que des cellules bRG-like soient

présentent dans les animaux *Lis1<sup>fl/fl</sup> - Nestine-TBC1D3*, une expression de TBC1D3 dans tous les aRGs à E11 est un contexte différent d'une expression très focale à la suite de l'électroporation *in utero*. Si ces cellules sont présentes dans les animaux mutants pour *Lis1*, leur proportion est-elle la même que dans les animaux WT ? Leur morphologie et fonction est-elle impactée ? S'agit-il donc de cellules bRG-like, ou de progéniteurs apicaux ectopiques anormaux ? La taille des cerveaux entre ces conditions sont-elles différentes ? D'autres études montrent des anomalies de cellules Pax6+ (détachement de la surface ventriculaire, ou mauvais positionnement) donnant des microcéphalies ou des hétérotopies chez la souris (Bizzotto & Francis, 2015). Il sera donc intéressant de voir chez les souris *Lis1* HET – *Nestine-TBC1D3* si ces phénotypes surviennent qui nous aidera mieux comprendre les anomalies de cette population cellulaire.

- Effet du niveau d'expression de *Lis1*

Nous avons caractérisé un nouveau modèle de souris *Lis1* mutant *Neo-Removed*, c'est-à-dire que l'allèle floxé pour *Lis1* ne présente pas de perturbation de l'expression du gène en l'absence de l'expression de la Cre (Hirotsume et al., 1998; Gambello et al., 2003). Pour rappel, le modèle hypomorphique (*Lis1* *-/neo*, dosage d'environ 35 %) présentait des effets très sévères sur l'organisation néocorticale et hippocampique, avec une augmentation de la mort cellulaire et des perturbations de la migration neuronale, alors que les animaux HET ne présentent pas de défauts néocorticaux macroscopiques évidents. Cet allèle *Neo-Removed* est donc « plus propre » et mime l'état hétérozygote des patients. Nous pourrions néanmoins tester l'électroporation de TBC1D3 dans des animaux hypomorphes et évaluer l'effet de ce niveau d'expression de *Lis1* sur la production de cellules bRG-like. Compte tenu du fait qu'un état hétérozygote, qui induit une déplétion de 50%, suffit apparemment à prévenir la génération de cellules bRG-like par l'expression de TBC1D3, il est fort probable que nous n'observions pas ces cellules chez le mutant hypomorphe.

Des mutations de *LIS1* sont associées à des lissencéphalies, mais également à des microlissencéphalies dans certains cas. Les microcéphalies sont généralement associées à des perturbations des fonctions des progéniteurs, ce qui est cohérent avec les effets de la perte de *Lis1* sur les progéniteurs que j'ai mentionné au fil de cette thèse de doctorat. Cependant, *LIS1* est également lié à des microcéphalies lorsque son dosage est augmenté, une augmentation du dosage de *Lis1* induit également des perturbations des fonctions des progéniteurs en altérant les microtubules du fuseau mitotique (Bi et al., 2009; Moon et al., 2014). On peut se demander quel est l'effet d'une augmentation de dosage de *Lis1* sur les bRGs chez les patients atteints de duplication de *LIS1*. Pour répondre à cette question, nous pourrions réaliser une co-électroporation de TBC1D3 avec un pCAG-*LIS1* dans des souris WT. Nous pouvons nous attendre à la fois à un phénotype similaire à la déplétion de *Lis1*, c'est-à-dire que l'augmentation du dosage de *Lis1* empêcherait la production de cellules bRG-like induite par TBC1D3, ou alors à une augmentation de la production de ces cellules. En effet, dans le cas d'ASPM,

une production précoce de bRGs déplete le pool des progéniteurs apicaux, ce qui induit à terme un nombre de neurones inférieur chez le furet (Johnson et al., 2018). Cette expérience nous permettrait d'évaluer si la population des bRGs est potentiellement impliquée dans les microcéphalies associées à des duplications de *LIS1*.

Enfin, un dernier élément est à soulever. Comme j'ai pu le décrire, une perte hétérozygote de *Lis1* chez la souris n'est pas associée à un phénotype sévère qui diffère de la situation chez l'homme. Uniquement lorsque le dosage de *Lis1* chez la souris est déprimé au-delà de 50% voit-on une désorganisation sévère du néocortex et de l'hippocampe (Gambello et al., 2003; Hirotsune et al., 1998; Yingling et al., 2008). Mes résultats expérimentaux utilisant *Emx1-Cre* sont cohérents avec ces données : une perte de 50% de *Lis1* à partir d'E9.5 n'induit pas un phénotype délétère macroscopique évident. Il apparaît que seule une déplétion prononcée de 65% ou plus est associée à une perturbation très sévère du développement cortical murin. Cependant, mes résultats montrent qu'à 50 %, un effet significatif est malgré visible lorsque l'on considère les cellules bRG-like. *TBC1D3* est un gène hominoïde, en l'exprimant chez la souris, nous humanisons donc virtuellement de cerveau murin. L'expression de *TBC1D3* pourrait donc sensibiliser le développement cortical de la souris à la déplétion de *Lis1*. Ceci pourrait donc indiquer comment des mutations de *LIS1* chez l'humain pourraient perturber la production des bRGs. Il reste à explorer d'éventuelles variations d'expression de *LIS1* en présence de différentes mutations, qui impacteront les bRGs de différents niveaux, contribueront à expliquer le gradient de sévérité des phénotypes.

## 2) Quels sont les mécanismes moléculaires de *Lis1* dans la production des bRGs ?

### a) Interaction fonctionnelle entre *TBC1D3* et *LIS1* ?

La déplétion de *Lis1* perturbe donc les mécanismes qu'une expression de *TBC1D3* induit en vue de produire des cellules bRG-like. En effet, *TBC1D3* aurait besoin d'un environnement cellulaire fonctionnel pour induire la prise de décision des cellules filles des aRGs pour devenir des bRGs. Pour mieux comprendre en quoi la perte de *Lis1* perturbe la génération des cellules bRG-like, il faut comprendre comment l'expression de *TBC1D3* induit leur production. Cependant, très peu d'informations sur le ou les mécanismes employés par *TBC1D3* sont disponibles. Nous avons parlé plus tôt des potentiels effets de l'expression de *TBC1D3* sur l'orientation du fuseau mitotique (mes résultats) et sur l'expression de N-Cadhérine (Ju et al., 2016). Quels autres mécanismes cellulaires pourraient être perturbés dans une condition mutante pour *Lis1* ? Une piste pourrait être la compétition entre *LIS1* et la protéine *RAB6A* dans la régulation de l'activité de la dynéine. *RAB6A* est une petite GTPase impliquée

dans la régulation du transport vésiculaire associé à la dynéine (Bergbrede et al., 2009). En effet, des données *in vitro* indiquent que LIS1 maintient au pôle + des microtubules la dynéine dans un état « quiescent » (Yamada et al., 2013). La perte de l'interaction entre Lis1 et la dynéine par compétition avec la protéine RAB6A permet d'engager la processivité de la dynéine. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la régulation de la dynéine par Lis1 est bien plus complexe qu'une simple dichotomie entre dynéine active versus inactive en fonction de l'interaction avec Lis1, à cause des autres partenaires de la dynéine présent. TBC1D3 est une RABGAP, mais son activité de GTPase Activating Protein est discutée (Frittoli et al., 2008). TBC1D3 interagit pourtant avec RAB4, RAB5 et RAB11 (Pei et al., 2002). Lorsque TBC1D3 est exprimé chez la souris, avec quelles protéines interagit-elle ? Ces complexes protéiques sont-ils affectés par l'haploinsuffisance de *Lis1* ? TBC1D3 pourrait jouer un rôle dans la compétition entre Lis1 et Rab6a dans la régulation de la dynéine lors l'induction de la production des cellules bRG-like, et l'haploinsuffisance de *Lis1* dans les souris mutantes pourrait perturber cet équilibre. Des expériences de biochimie pourraient répondre à ces questions : nous pourrions réaliser des cultures primaires de progéniteurs WT et *Lis1* HET, les transfecter avec TBC1D3, et réaliser une co-immunoprécipitation de Lis1 et essayer de détecter TBC1D3, Rab6a et la dynéine, ou une co-immunoprécipitation de TBC1D3, et étudier son interactome par spectrométrie de masse.

TBC1D3 stimule également la voie des MAPK. Comme vu précédemment dans la section 2c) de l'introduction, cette voie est largement impliquée dans les processus de prolifération et différenciation du développement cortical, notamment dans l'apparition des bRGs (Penisson et al., 2019). LIS1, via son interaction avec NDE1, régule également la dynamique de l'activité de la voie MAPK durant le développement cortical (Lanctot et al., 2013). La perte de Lis1 pourrait perturber l'activation de la voie MAPK après l'expression de TBC1D3 dans les souris mutantes. Tout d'abord, nous pourrions évaluer l'activation de la voie des MAPK après expression de TBC1D3 dans des cultures de cellules mutantes pour Lis1. Puis, nous pourrions essayer de stimuler la voie des MAPK pour essayer de sauver le phénotype d'absence de cellules bRG-like en présence de TBC1D3. Nous pourrions co-électroporer les souris HET avec le vecteur TBC1D3 et un vecteur exprimant une forme constitutivement active de ERK par exemple.

Enfin, TBC1D3 interagit avec la tubuline, et cette interaction régule la localisation subcellulaire de TBC1D3 entre le noyau et le cytoplasme (He et al., 2014). En effet, TBC1D3 interagit avec les hétérodimères d' $\alpha$  et  $\beta$ -tubuline, et cette interaction régule l'ubiquitinylation de l'EGFR médiée par TBC1D3. La voie de l'EGFR est également impliquée dans de nombreux processus de prolifération et différenciation (Yarden and Shilo, 2007). Il est donc également possible que TBC1D3 induise la production de cellules bRG-like par cette voie. Et compte tenu de l'importance de LIS1 dans les fonctions liées aux microtubules (Caspi et al., 2000; Yingling et al., 2008), il est donc possible que ce rôle de TBC1D3 soit perturbé dans les cellules mutantes. De nombreux gènes ont été décrits comme

jouant un rôle dans la production des bRGs (Penisson et al., 2019), et il demeure crucial de tester d'autres outils moléculaires pour leur capacité à induire ces cellules dans des conditions mutantes pour *Lis1*.

#### b) Interaction fonctionnelle entre *LIS1* et les autres gènes pro-bRG

Il est nécessaire de prendre du recul sur *TBC1D3*. En effet comme mentionné précédemment, de nombreux autres gènes ont été démontrés comme capable de produire des cellules bRG-like chez la souris ou le furet (Penisson et al., 2019). Bien que des expériences d'interférence à l'ARN de *TBC1D3* dans des tranches embryonnaires humaines entraînent une diminution de la quantité de cellules *SOX2+* basales (Ju et al., 2016), ce gène n'est pas le seul présent dans le génome humain. Ce constat pourrait également expliquer pourquoi des organoïdes MDS montrent la présence de bRGs, alors que mes résultats chez la souris indiquent que l'haploinsuffisance de *Lis1* suffit à bloquer *TBC1D3* dans son action pro-bRG. Dans les organoïdes, toute la batterie moléculaire permettant la genèse des bRGs est présente, à l'exception des gènes délétés dans le syndrome MDS, si tant est qu'ils soient impliqués dans ce processus. Il y a potentiellement des mécanismes compensatoires à l'œuvre dans ce modèle humain. Cela étant dit, compte tenu des rôles présentés de *LIS1* dans les fonctions cellulaires dépendantes du cytosquelette d'actine et de tubuline (section 4), et des voies de signalisations impliquées dans la génération de bRGs (**Figure 14**), les mutations de *LIS1* chez des patients atteints de LIS pourraient-elle perturber ces voies de signalisation ? Si un autre gène était exprimé (ou réprimé) à la place de *TBC1D3*, verrait-on les même effets chez les animaux HET ? *TBC1D3* induit la répression de *Trnp1* (Ju et al., 2016), et la répression de ce gène a été également, indépendamment de *TBC1D3*, associée à la production de bRGs chez la souris (Stahl et al., 2013). Nous pourrions essayer d'électroporer un vecteur shRNA-*Trnp1* et voir les effets sur la production des bRGs chez des souris mutantes pour *Lis1*. J'ai déjà tenté cette expérience au début de mon doctorat, cependant, mes résultats n'ont pas été reproductibles, et cette expérience n'a pas donné de suite. Plus de mise au point serait sans doute nécessaire, et persévérer pourrait apporter plus d'information sur les mécanismes de production des cellules bRG-like après expression de *TBC1D3* et perturbés par la déplétion de *Lis1*.

L'expression ou la perte d'expression ou de fonction de nombreux autres gènes promeuvent la production de cellules bRG-like chez la souris (Penisson et al., 2019). Les mécanismes cellulaires et moléculaires de certains d'entre eux sont relativement bien établis. Pour certains gènes, tels que *TMEM14B* (Liu et al., 2017a), *Pax6* (Wong et al., 2015) ou *Shh* (Wang et al., 2016a), on observe une régulation de l'orientation du fuseau mitotique pour produire plus de divisions oblique. Pour d'autres gènes, tels que *Insm1* (Tavano et al., 2018), *Cdh1* (Martínez-Martínez et al., 2016), *Lzts1* (Kawaue et al., 2019) ou *TBC1D3* (Ju et al., 2016), on observe une altération des protéines d'adhésion cellulaire au niveau des aRGs. Enfin, pour un dernier groupe de gènes, tels que *PDGFRβ* (Lui et al., 2014), *Shh* (Wang et al., 2016a), les gènes de la voie des MAPK (Heng et al., 2017), l'amplification des cellules



bRG-like dépend de l'activation de voies de signalisation canoniques impliquées dans la prolifération et la différenciation. Nous pourrions évaluer si la déplétion de *Lis1* a également un effet sur la promotion de la production des cellules bRG-like induite par ces gènes, en exprimant ou réprimant ces gènes respectivement chez les animaux mutant pour *Lis1*. Analyser l'effet de l'expression de ces gènes permettra de mieux appréhender et d'affiner notre compréhension de l'interaction fonctionnelle de *Lis1* avec la production de bRGs. Certains gènes restent obscurs quant aux mécanismes qu'ils sollicitent pour générer les cellules bRG-like, tels que *ARHGAP11B* (Florio et al., 2015; Kalebic et al., 2018) ou *Aspm* (Johnson et al., 2018).

Enfin, une population endogène de cellules bRGs résidente chez la souris est présente dans une oSVZ dans le cortex médial de la souris à E18.5 (Vaid et al., 2018). Ces cellules sont *Hopx*<sup>+</sup>, ont une signature transcriptionnelle proche des bRGs humains, et la perte de l'expression de *Hopx* par stratégie CRISPR/Cas9 permet de dépléter cette population. La fonction du gène *Hopx* reste mal connue. Nous pourrions donc essayer d'étudier cette population sans avoir besoin d'augmenter des cellules bRG-like 'non-physiologiques'. En effet, réaliser des expériences d'immunohistochimie anti-*Hopx* ou anti-pVim sur des animaux *Lis1* HET pourrait nous permettre d'évaluer l'effet de la déplétion de *Lis1* sur cette population. La fonction de ces cellules dans le cortex médian reste peu comprise, notamment en considérant que ces cellules apparaissent vers la fin du développement embryonnaire. Vers les derniers moments du développement cortical, les progéniteurs neuraux vont commencer à produire des cellules gliales en plus des neurones, il est possible qu'une vague de gliogenèse ait lieu dans le cortex médial à ce moment-là, impliquant les cellules *Hopx*<sup>+</sup>.

Pour conclure ce sous-chapitre, la notion de « cellule bRG-like » peut être discutée. En effet, pourquoi ne pas appeler ces cellules simplement des bRGs ? Malgré la similarité de morphologie, de localisation et d'expression de certains marqueurs entre les cellules que j'ai observé et les bRGs humains, aucune analyse de séquençage du transcriptome en cellule unique (single-cell RNAseq) chez les cellules bRG-like n'a été effectuée après l'expression de *TBC1D3* chez la souris. Ces expériences manquent également de ma connaissance pour toutes les autres études explorant l'amplification de cellules bRG-like chez la souris. Les bRGs ont une signature distincte des aRGs, bien qu'extrêmement similaire (Johnson et al., 2015; Pollen et al., 2015). L'appellation de bRG-like a donc servi de « prête-nom », en attendant l'établissement définitif de l'identité de ces cellules. Il serait donc crucial d'effectuer ces expériences pour continuer à décrire ces cellules bRG-like, et évaluer si ces cellules présentent des profils d'expressions différents des bRGs murins présents naturellement. De plus, continuer à établir la fonction cellulaire des cellules bRG-like, ainsi qu'établir une cartographie de lignage cellulaire par analyse de cellules-filles via vidéomicroscopie et immunohistochimie, sera à terme nécessaire pour parfaire notre compréhension de cette population de cellules RG générée artificiellement. Ces expériences pourraient également nous permettre d'évaluer l'effet de la déplétion de *Lis1*, ou d'autres mutations, sur l'expression génique des aRGs et bRG/cellules bRG-like. En effet,

nous pourrions évaluer les profils d'expression (cellules uniques) des aRGs WT et mutants, ce qui nous permettrait de mieux comprendre le contexte moléculaire dans lequel nous essayons d'exprimer TBC1D3. De plus, étudier la signature transcriptionnelle de progéniteurs apicaux ectopiques, dans les mutants *Lgn/Gsmp2* (Konno et al., 2008) ou les mutants *Eml1* (Kielar et al., 2014), nous permettrait d'établir l'identité de ces cellules Pax6<sup>+</sup> basale avec plus de précision, et confirmer si ces cellules ont une signature d'aRGs, de bRGs, ou autre.

### c) Importance des partenaires de LIS1 dans la production des bRGs

Lors de l'introduction, nous avons vu que l'interaction de LIS1 avec ses partenaires est cruciale pour le développement du cortex, notamment l'interaction de LIS1 avec la dynéine (Moon et al., 2014; Toves, 2009), la dynactine (Faulkner et al., 2000; Siller and Doe, 2008), NDE1 (Pawlisz et al., 2008), NDEL1 (Moon et al., 2014; Sasaki et al., 2005) et DCX (Pramparo et al., 2010). En effet, la perte de LIS1 perturbe la fonction LIS1-dynéine-dynactine-NDE1-NDEL1-BICD2-DCX. De plus, des mutations des gènes codant pour ces protéines se retrouvent chez des patients atteints de malformations corticales. Quelle est l'implication de ces protéines partenaires de Lis1 dans le phénotype que l'on a observé ? Est-ce que muter/dépléter ces protéines préviennent également la production de cellules bRG-like ? Explorer l'importance de l'interactome de LIS1 dans la production des bRGs semble donc crucial pour mieux appréhender les mécanismes mis en jeu par l'expression de TBC1D3, et pourquoi ils sont perturbés dans le contexte mutant. Pour répondre à ces questions, nous pourrions électroporer TBC1D3 dans des souris mutées pour ces gènes, ou alors obtenir et les croiser avec les souris *Nestine-TBC1D3*. Le laboratoire étudie déjà des souris mutantes pour *Dcx* (Khalaf-Nazzal et al., 2017), pour *Tuba1a* (Belvindrah et al., 2017) et pour *dynéine : Loa (Legs odd angle*, Schiavo et al., 2013) ; et un modèle knock-in de *Dync1h1* (Romero, Zaidi et al, manuscrit en préparation). Nous pourrions donc tirer avantage de cette expertise et utiliser ces souris afin d'exprimer *TBC1D3* et observer si un phénotype similaire à la déplétion de Lis1 apparaît. Compte tenu des rôles capitaux que Lis1 a dans la régulation de l'activité de la dynéine (Cianfrocco et al., 2015), il ne serait pas surprenant d'observer une absence de cellules bRGs-like dans ce modèle. Si la condition mutante pour *Dcx* ou pour *Tuba1a* bloque l'induction de cellules bRG-like par TBC1D3, cela pourrait vouloir dire que cette induction de bRGs est dépendante des microtubules fonctionnels (Reiner, 2013). Nous pourrions aussi tester les animaux mutant pour *Nde1* et *Ndel1*, compte tenu de l'importance cruciale de ces dans la fonction de Lis1 (Pawlisz et al., 2008; Sasaki et al., 2005). Vérifier si la perte de chacun de ces acteurs impacte la production de cellules bRG-like nous permettra de décortiquer les mécanismes moléculaires indispensables à la production de ces cellules par la voie TBC1D3. Ces études nous aideront à mieux comprendre les mécanismes de production de bRGs humains chez le patient sain et le patient portant des mutations dans ces gènes.

Pour conclure, nous pourrions également adresser la question du rôle de ‘la voie Lis1’ dans la production des bRGs dans un autre modèle animal qui possède naturellement des bRGs. Le furet est un animal gyrencéphalique possédant beaucoup de bRGs et une oSVZ (Fietz et al., 2010; Gertz et al., 2014; Reillo et al., 2011). Des études de la production des bRGs via l’expression des FGFRs et ASPM ont déjà été réalisées et les protocoles d’électroporation *in utero* sont mis en place pour cet animal (Johnson et al., 2018; Matsumoto et al., 2017). Quel serait l’effet d’une déplétion de Lis1 dans cette espèce ? Pour répondre à cette problématique, une première expérience serait de réaliser une électroporation *in utero* avec un shRNA pour *Lis1* à E33 (Martínez-Martínez et al., 2016). Une autre possibilité serait de développer d’une lignée transgénique pour *Lis1* (Li and Engelhardt, 2003; Yu et al., 2019). Dans le cas où *Lis1* serait muté chez le furet, qu’arriverait-il aux bRGs ? Bloquer la production de bRGs par interférence à l’ARN de *FGFR3* diminue la formation de circonvolutions à la surface des cerveaux (Matsumoto et al., 2017). Verrait-on une lissencéphalie chez ces furets mutés pour *Lis1* ? Et si on en voit une, dans quelle mesure la perte des bRGs potentielle par la déplétion de Lis1 jouerait un rôle dans l’établissement de cette malformation ? Enfin, si les bRGs sont toujours produits dans un contexte *Lis1* mutant, quels seraient les impacts sur leurs fonction (Bershteyn et al., 2017) ? Si l’on peut développer ces furets mutants pour *Lis1*, quels seraient les effets d’une électroporation de TBC1D3 chez les WTs et les mutants ? Si les bRGs sont réprimés par la perte de Lis1, compense-t-on la perte par TBC1D3 (ou par d’autres gènes utilisés chez la souris) ? Toutes ces questions intéressantes demeurent sans réponse mais seront peut-être aborder dans le futur.

### 3) bRGs et pathologies

Malgré tous mes résultats et toutes ces considérations, la question du rôle de LIS1 dans la production et la fonction des bRGs demeure encore. En effet, une question primordiale qui reste à répondre est le devenir des bRGs chez des patients humains atteints de MDS ou d’ILS *LIS1*. En effet, la notion de bRG est relativement récente dans le domaine des neurosciences. A la date de l’écriture de cette thèse, aucune donnée clinique concernant un lien entre une MCD quelle qu’elle soit avec un effet sur la production ou la fonction des bRGs dans du tissu humain n’a été publié. Mes résultats peuvent potentiellement tracer la voie de l’étude de cette population de progéniteurs neuraux, en proposant une méthode pour étudier l’effet d’une mutation sur ces cellules chez la souris. Cependant, ce modèle serait adapté si et seulement si les bRGs sont impactés par des mutations de *LIS1* chez l’homme. Une première donnée expérimentale vient répondre à ce problème. Comme mentionné plusieurs fois déjà, des organoïdes générés à partir de patients MDS présentent des bRGs (Bershteyn et al., 2017). Et même si ces bRGs présentent des altérations de leur fonctions, notamment celles associées à la division cellulaire, ils sont néanmoins présents. Cependant, les auteurs ne présentent pas des données quantitatives sur le nombre de ces cellules en comparant les organoïdes sains aux organoïdes mutants. Il aurait été particulièrement

intéressant de savoir dans l'organoïde mutant MDS, qui est plus petit que l'organoïde sain, le nombre et l'équilibre entre les différents types de progéniteurs. Comme mentionné quelques paragraphes plus haut, si les bRGs sont relativement moins nombreux, on pourrait expliquer le fait qu'il y en a toujours quelques-uns de présent par le fait que les organoïdes possèdent tous les gènes humains impliqués dans la production des bRGs.

Une particularité flagrante des patients ILS *LIS1* est la présence quasi-systématique d'un gradient postéro-antérieur de sévérité. On peut naturellement s'interroger sur les causes d'un tel gradient. De manière intéressante, l'épaisseur de l'oSVZ et la densité des bRGs au sein de cette couche n'est pas homogène partout dans le cortex en développement (Martínez-Cerdeño et al., 2012). En effet, la densité cellulaire dans l'oSVZ est supérieure au niveau du cortex occipital que dans le cortex somato-sensoriel. Le cortex du singe présente un gradient rostro-caudal de prolifération croissante (Lukaszewicz et al., 2006). De plus, l'aire corticale 17 (région occipitale) chez le singe a un oSVZ épais et est riche en neurones supra-granulaires. Nous pourrions émettre l'hypothèse que les bRGs sont distribués d'une manière hétérogène, et sont particulièrement présents dans les régions occipitales, notamment au niveau du cortex visuel. Il y aurait alors une corrélation très intéressante entre les gradients postero-anterieurs des ILS *LIS1*, et un éventuel gradient postero-anterieur de présence des bRGs dans le cortex en développement. Serait-il possible que la diminution de l'expression de *Lis1* affecte particulièrement les bRGs, et donc que les régions riches en ces cellules deviennent plus lissencéphaliques que le reste du cortex ? Qu'en est-il alors des mutations de *DCX*, pour lesquelles le gradient est antéro-postérieur ? Serait-il possible que les bRGs compensent le phénotype induit par les mutations de *DCX*, et que le phénotype soit plus sévère dans les régions pauvres en bRGs ? Jusqu'à présent, j'ai surtout mentionné le cas dans lequel les bRGs sont réprimés par les mutations de *Lis1* ou d'autres gènes. Cependant, on peut se demander si les bRGs peuvent participer à la pathogenèse d'autres MCDs. En effet, comme nous l'avons vu et mentionné plus haut, dans le cas d'une microcéphalie, les bRGs peuvent participer à l'établissement de la pathologie si leur production se fait au détriment des aRGs (Johnson et al., 2018). On peut aussi tout à fait imaginer qu'une surproduction de bRGs puisse participer à l'établissement d'une macrocéphalie, compte tenu de leurs capacités prolifératives (Zhang et al., 2020). Enfin, des mutations de *Eml1*, de *Arl13b* ou de *Marcks* induisent la présence de cellules Pax6+ délaminiées ectopiques (bRG-like ?), qui pourraient contribuer à l'apparition des SBH (Kielar et al., 2014). Mais il est clair que les vraies cellules bRG ont des caractéristiques et fonctions particulières, et que les cellules Pax6+ 'aberrantes' vraisemblablement ne ressemblent pas à ces cellules.

Pour conclure, un des avantages de mon projet de doctorat est qu'il s'installe dans un consortium de collaborateurs visant à étudier les progéniteurs neuronaux durant le développement cortical (projet ERA-NET Neuron STEM-MCD : [https://www.neuron-eranet.eu/\\_media/STEM-MCD.pdf](https://www.neuron-eranet.eu/_media/STEM-MCD.pdf)). La place de mon projet de doctorat dans cette collaboration était d'utiliser un modèle murin pour étudier le rôle de *Lis1* dans la production et la fonction des bRGs. Les autres groupes du consortium ont travaillé sur

d'autres modèles comme des organoïdes ou des cellules humaines. Une de ces collaborations est avec le Dr. Annie Laquerrière, anatomo-cytopathologiste qui a la possibilité d'étudier des cerveaux fœtaux de cas atteints de mutations de *LIS1*. Les bRGs sont-ils impactés chez ces patients ? Des marquages sur des coupes de cerveaux embryonnaires humains pour des marqueurs de bRGs (Pax6+, Sox2+) ont actuellement lieu. Si on observe une diminution du nombre de bRGs (stade fœtal permettant), alors les mutations de *LIS1* impactent bien la production et/ou la fonction des bRGs. Dans ce cas, mon modèle expérimental se sera montré prédictif, ce qui renforcera sa validité, et tracera la voie pour étudier de nombreux autres gènes impliqués dans la LIS, et dans les autres MCDs en général (Romero et al., 2018), et leurs rôles dans la production et la fonction des bRGs.

Une autre collaboration vient de l'équipe dans laquelle travaille le Dr. Nadia Bahi-Buisson qui analyse des mutations portées par des patients, en réalisant des cultures de fibroblastes. L'objectif est de mesurer l'expression de différentes formes de mutation de *LIS1* : le gène est-il exprimé et à quel niveau ? Si oui, les ARNm sont-ils traduits ? Ces mutations induisent-elles simplement une haploinsuffisance car les ARNm mutés et/ou protéines tronquées ou malformées sont dégradés, ou est-ce que ces formes mutantes portent une fonction aberrante (dominant-négatif par exemple). S'il s'avère que certaines mutations induisent l'expression d'une protéine stable, il serait intéressant d'exprimer ces formes mutées de *LIS1* dans nos modèles de souris (ou potentiellement dans le futur dans le furet) pour voir si elles impactent la production de bRGs induites par nos outils génétiques.

Cependant, si les mutations de *LIS1* induisent globalement une perte d'expression par dégradation des messagers ou de la protéine, comment expliquer le spectre de pathologies que les ILS *LIS1* présentent ? De même, comment expliquer que deux patients portant la même mutation présentent des phénotypes avec des sévérités différentes ? Ce dernier point soulève le fait que les MCDs causées par des mutations de *LIS1* restent encore très mal connues, et que les rôles de *LIS1* nous échappent encore. Serait-il possible que la signature génétique et les variations épigénétiques entre les patients soient la cause d'une telle « volatilité » de la sévérité des LIS ? Ce dernier point pourrait faire écho aux variations de résultats obtenus avec l'électroporation de *TBC1D3* en fonction du fond génétique des souris utilisées. Il s'agit d'un sujet passionnant à décortiquer dans le futur.

#### 4) Conclusion

Le rôle des bRGs dans la pathogenèse des MCDs reste donc très mal connu. Au cours de mon doctorat, j'ai mis au point un modèle permettant d'étudier l'effet d'une déplétion de *Lis1* dans les progéniteurs neuraux sur la production de cellules bRG-like chez une souris « humanisée ». De nombreuses expériences supplémentaires sont nécessaires pour continuer à caractériser les effets de cette déplétion et de mettre en avant les rôles de *Lis1* dans la production de ces cellules cruciales pour le

développement cortical. Il y a un manque crucial de données cliniques sur les bRGs dans des patients atteints de MCDs, aussi bien qu'un manque dans la compréhension globale des mécanismes permettant la production des bRGs. La revue que j'ai rédigée permet déjà de prendre un peu de recul sur toutes les études publiées à ce jour, mais plus de connaissances sur les mécanismes subcellulaires et les voies de signalisations impliquées sont nécessaires. De nombreux nouveaux gènes régulant la production des bRGs seront sans doute mis en avant dans les années à venir, et les mécanismes que ces gènes impliquent devront être étudiés dans le contexte des MCDs. Il est malheureusement difficile d'envisager des traitements curatifs pour la LIS, mais de nouvelles connaissances sur la pathogenèse de cette pathologie, pourraient contribuer à l'identification et la validation de gènes candidats pour ces pathologies, aidant ainsi la diagnostique. Mon travail de doctorat, aussi précurseur soit-il, permettra je l'espère de tracer la voie vers de nombreuses nouvelles études traitant des bRGs dans les processus cellulaires associés à LIS1, et de redécouvrir les MCDs avec le nouvel angle des bRGs.

## **D. Annexes**

## 1) Annexe 1 : Gènes et mécanismes impliqués dans la génération et l'amplification des cellules de glie radiaire basales

Penisson, M., Ladewig, J., Belvindrah, R., and Francis, F. (2019). Genes and Mechanisms Involved in the Generation and Amplification of Basal Radial Glial Cells. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 1–21. doi:10.3389/fncel.2019.00381.





# Genes and Mechanisms Involved in the Generation and Amplification of Basal Radial Glial Cells

Maxime Penisson<sup>1,2,3</sup>, Julia Ladewig<sup>4,5,6</sup>, Richard Belvindrah<sup>1,2,3\*</sup> and Fiona Francis<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Inserm, Institut du Fer à Moulin, Sorbonne Université, Paris, France, <sup>2</sup>Inserm UMR-S 1270, Paris, France, <sup>3</sup>Institut du Fer à Moulin, Paris, France, <sup>4</sup>Central Institute of Mental Health, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany, <sup>5</sup>Hector Institute for Translational Brain Research (gGmbH), Mannheim, Germany, <sup>6</sup>German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Carlos Cardoso,  
INSERM U901 Institut  
de Neurobiologie de la Méditerranée,  
France

### Reviewed by:

James Y. H. Li,  
University of Connecticut Health  
Center, United States  
Alejandro Lopez Tobon,  
Istituto Europeo di Oncologia s.r.l.,  
Italy  
Ginam Cho,  
Brigham and Women's Hospital,  
Harvard Medical School,  
United States

### \*Correspondence:

Richard Belvindrah  
richard.belvindrah@inserm.fr  
Fiona Francis  
fiona.francis@inserm.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Cellular Neurophysiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Cellular Neuroscience

Received: 11 April 2019

Accepted: 05 August 2019

Published: 20 August 2019

### Citation:

Penisson M, Ladewig J,  
Belvindrah R and Francis F (2019)  
Genes and Mechanisms Involved  
in the Generation and Amplification  
of Basal Radial Glial Cells.  
Front. Cell. Neurosci. 13:381.  
doi: 10.3389/fncel.2019.00381

The development of the cerebral cortex relies on different types of progenitor cell. Among them, the recently described basal radial glial cell (bRG) is suggested to be of critical importance for the development of the brain in gyrencephalic species. These cells are highly numerous in primate and ferret brains, compared to lissencephalic species such as the mouse in which they are few in number. Their somata are located in basal subventricular zones in gyrencephalic brains and they generally possess a basal process extending to the pial surface. They sometimes also have an apical process directed toward the ventricular surface, similar to apical radial glial cells (aRGs) from which they are derived, and whose somata are found more apically in the ventricular zone. bRGs share similarities with aRGs in terms of gene expression (*SOX2*, *PAX6*, and *NESTIN*), whilst also expressing a range of more specific genes (such as *HOPX*). In primate brains, bRGs can divide multiple times, self-renewing and/or generating intermediate progenitors and neurons. They display a highly specific cytokinesis behavior termed mitotic somal translocation. We focus here on recently identified molecular mechanisms associated with the generation and amplification of bRGs, including bRG-like cells in the rodent. These include signaling pathways such as the FGF-MAPK cascade, SHH, PTEN/AKT, PDGF pathways, and proteins such as INSM, GPSP2, ASPM, TRNP1, ARHGAP11B, PAX6, and HIF1 $\alpha$ . A number of these proteins were identified through transcriptome comparisons in human aRGs vs. bRGs, and validated by modifying their activities or expression levels in the mouse. This latter experiment often revealed enhanced bRG-like cell production, even in some cases generating folds (gyri) on the surface of the mouse cortex. We compare the features of the identified cells and methods used to characterize them in each model. These important data converge to indicate pathways essential for the production and expansion of bRGs, which may help us understand cortical development in health and disease.

**Keywords:** cortical development, neural progenitor cells, basal radial glia, cell division, spindle orientation, adhesion, signaling pathways

## INTRODUCTION

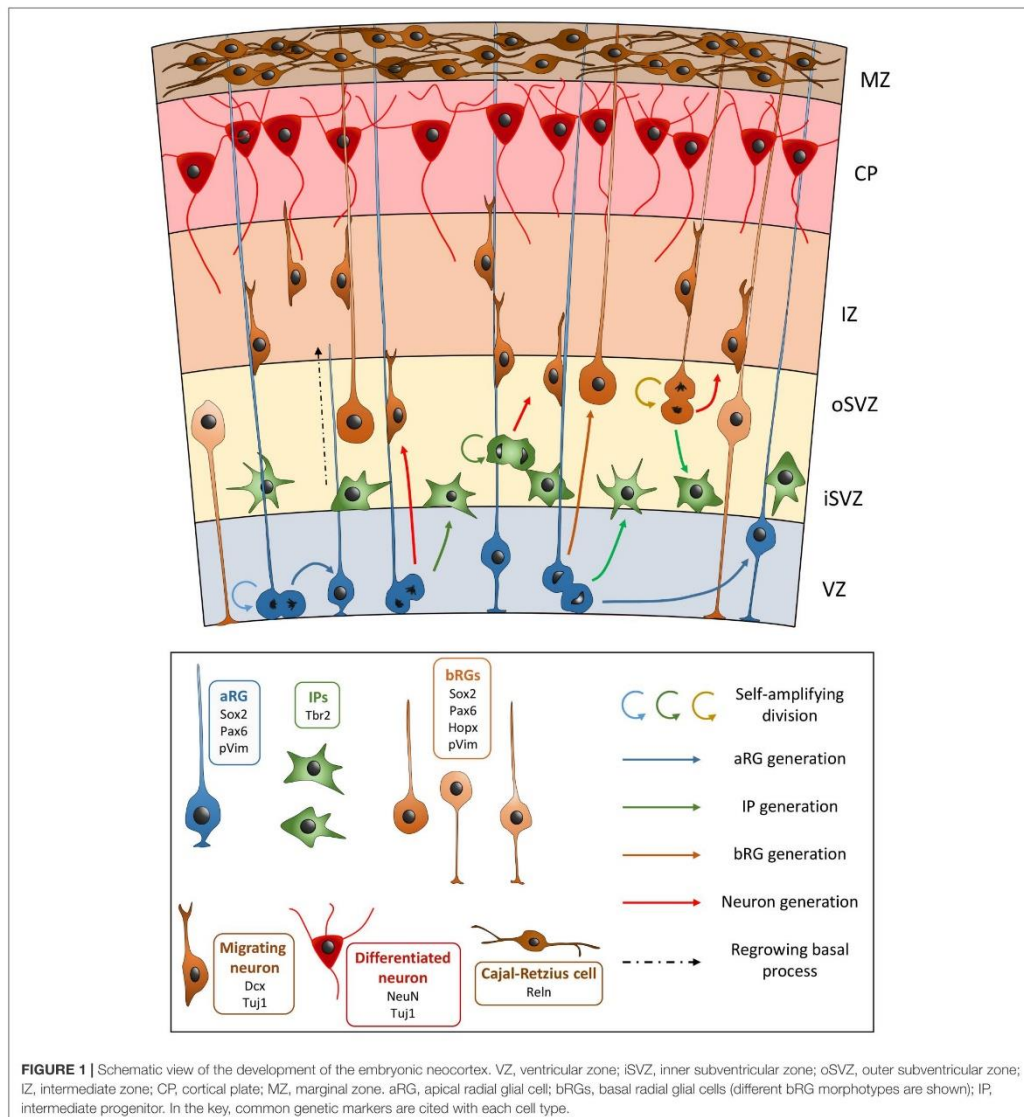
The cerebral cortex is the seat of complex brain functions and is a highly organized and compartmentalized structure. Its development relies on several progenitor types. These cells have specific morphologies, somal localizations, and division characteristics. They produce neurons that migrate to the cortex, their axons and dendrites forming neural circuits that underlie brain functions. Glial cells are also produced from cortical progenitors, providing support to neurons and playing a role in brain homeostasis. Cortical malformations are characterized by intellectual disability and/or epilepsy, and are associated with abnormalities in cortical structure and/or the number of neurons (Desikan and Barkovich, 2016; Romero et al., 2018). They are caused by various defects in cortical development such as during cell proliferation and migration, and englobe different phenotypes such as microcephaly (reduction of cerebral volume), lissencephaly (cortical layer disorganization and impact on folds), or heterotopias (presence of gray matter within the white matter). It is important to understand different aspects of cortical development and processes occurring during evolution, in order to predict pathogenic mechanisms which occur in human cortical pathology.

At early stages of neurodevelopment and before the start of neurogenesis at approximately gestational week (GW) 5–6 in humans (Zecevic, 2004; Howard et al., 2008; Meyer et al., 2018) and embryonic day (E) 10.5 in the mouse (Dennis et al., 2016), the neural tube is composed of neuroepithelial cells (NEs) which form a single layered pseudostratified epithelium (Götz and Huttner, 2005). They are the primary progenitor cell type as all neurons and glial cells (apart from microglia) will descend from NEs. These cells display a particular behavior during the cell cycle, called interkinetic nuclear migration, during which nuclei migrate apically toward the ventricular surface to perform mitosis and then basally toward the pial side of the neuroepithelium, where they enter S-phase. This phenomenon gives rise to nuclei localized at different levels along the apical-basal axis depending on the cell cycle phase, which gives the neural tube its pseudostratified appearance. NEs express markers such as Nestin (intermediate filament protein), Sox2 (transcription factor), and Notch.

Neuroepithelial cells first perform symmetrical divisions in order to amplify the number of progenitors (Huttner and Kosodo, 2005). Upon the start of neurogenesis, NEs begin to perform asymmetrical divisions to produce neurons and other progenitors, as well as to self-renew. This production leads to the thickening of the tissue and the cortical wall becomes divided into several regions: the ventricular zone (VZ), the subventricular zone (SVZ), the intermediate zone (IZ), the sub-plate, the cortical plate (CP), and the marginal zone (MZ) (Figure 1). The production of neurons is also concomitant with the appearance of another type of progenitor cell derived from NEs, apical radial glia cells (aRGs) (Götz and Huttner, 2005; Borrell and Götz, 2014). aRGs are highly polarized, their cell bodies are localized in the VZ and they possess two processes: an apical process extending to the ventricular surface, and a long basal process, connecting to the pial surface. Like NEs, aRGs perform interkinetic nuclear migration, with

nuclear movement restricted to the VZ: S phase occurs in the basal region of the VZ, while mitosis takes place at the ventricular surface. aRGs express markers such as Sox2, Pax6, Nestin, and Vimentin (Vim). In rodents, during early corticogenesis, most mitoses performed by aRGs are horizontal (i.e., cleavage planes perpendicular to the ventricular surface). These cells can self-renew through these symmetrical divisions, but they can also produce immature neurons, as well as basal progenitors (BPs). In the rodent, the most abundant BPs are termed intermediate progenitors (IPs), which express Tbr2. IPs are localized in the SVZ and in the rodent they generally divide once to produce two immature neurons (Borrell and Götz, 2014). In primate brains they are known to divide several times amplifying the pool of IPs, as well as generating neurons (Betizeau et al., 2013). It has been shown that aRGs can also produce another type of BP with characteristics of a radial glial cell, and these are termed outer or basal radial glial cells (bRGs) (Hansen et al., 2010; Borrell and Götz, 2014). These cells have been found to be enriched in the developing cortex of gyrencephalic species such as primates or the ferret, their somata are localized in the inner and outer SVZ (iSVZ and oSVZ, the latter a superficial sub-region representing the largest proliferative compartment in these species from mid-corticogenesis, see section "oSVZ Genesis, Cell Composition, and Function" for more information) (Hansen et al., 2010). The discovery of the neurogenic potentiality of bRGs is relatively recent (Hansen et al., 2010). bRGs were originally described as having a basal but often no apical process (Hansen et al., 2010), however, they can exist in different forms in primates (Betizeau et al., 2013). They are generated from aRGs after an asymmetrical oblique or vertical division (i.e., horizontal cleavage planes parallel to the ventricular surface). The daughter cell that is destined to become a bRG will receive the basal process, and the other cell can either become an immature neuron, an IP, or an aRG that remains attached to the ventricular surface and that will regrow its basal process (Shitamukai et al., 2011; LaMonica et al., 2013). Being highly neurogenic, bRGs are thought to be important for gyrencephalic brain development, especially associated with the apparition of cortical folds (gyri and sulci). These cells are few in number in lissencephalic species (such as rodents) (Wang et al., 2011; De Juan Romero and Borrell, 2015; Fernández et al., 2016; Borrell, 2018).

Cortical glutamatergic neurons are produced via direct or indirect neurogenesis, either from aRGs, or through IPs or bRGs, respectively (Malatesta et al., 2003). When they are born, they go through a multipolar phase, before adopting a bipolar morphology and migrating radially toward the CP, crossing the IZ. Here they settle in an inside-out fashion with early-born neurons destined for the deeper layers of the cortex, whilst later-generated neurons are destined for the more superficial layers (closer to the pia) (Sekine et al., 2014; Hatanaka et al., 2016). Cajal-Retzius cells reside in the MZ, and play important roles in the correct organization of the layers (Martínez-cerdeño and Noctor, 2014). Thus the layered structure of the cortex arises. Cortical neurons will send axons toward their targets and start connecting with neurons in other cortical and subcortical regions, forming the neural circuits underlying complex functions of the cortex.



### CHARACTERISTICS OF bRGs

#### Identification of bRGs in Different Models

The importance of bRGs in cortical development has been highlighted in recent years by an increasing body of evidence accumulated in different models. We summarize here essential bRG data, contributed by different complementary approaches.

While many insights concerning bRGs have been gained through the use of human tissue, acquiring and performing analyses on human fetal brain tissue can be a potent limiting factor. Other gyrencephalic species, such as primates which are close to humans phylogenetically, or ferrets, have also been used as alternatives. Ferret bRGs are similar to human bRGs, they are abundant, possess a basal process,

can proliferate and are Pax6+/Sox2+. The use of transgenic animals or performing electroporation in developing ferret brains (Kawasaki et al., 2012) can allow study of the involvement of certain genes potentially involved in bRG generation (described further in section “Molecular Mechanisms Associated With the Generation and Amplification of bRGs, Including bRG-Like Cells in the Rodent”).

Brains of a lissencephalic species, the mouse, have also been shown to have bRGs during cortical development (Wang et al., 2011). Using *in utero* injection at E12 to express GFP in progenitors, the team of Wang showed the presence of cells located in the upper part of the SVZ and possessing a basal process, but no apical process. Like human, cells expressed Pax6, Sox2, and phosphorylated Vimentin (pVim). However, these cells were few in number, as they only accounted for 5–10% of total between E12 and E18 (Wang et al., 2011). Furthermore, contrary to human and primate bRGs, none of the murine bRG-like cells were also found to express Tbr2. While being capable of self-amplifying divisions, as human cells, they were found to produce neurons but not IPs (Hansen et al., 2010; Wang et al., 2011). These results suggest that murine bRG-like cells are few in number and are functionally distinct from human bRGs. However, a recent study also showed that in the late developing mouse medial neocortex, abundant Hopx+ bRGs were present (Vaid et al., 2018). At E18, these cells could produce neurons and RNA sequencing showed that they resembled human bRGs transcriptionally. This population could hence serve as a good model to study bRGs. Furthermore, genetic manipulation to express or repress genes involved in bRG generation in human, has been performed in the mouse by various groups, and this can lead to an artificial bRG enrichment in the murine cortex (described further in sections “FGF-MAPK Pathway,” “Hif1 $\alpha$ ,” “SHH Signaling,” “Pax6,” “mSWI/SNF Subunits BAF170 and BAF155,” “INSM1,” “GPM2 and Notch-Delta,” and “Human and Primate Evolutionary Inventions”).

### Gene Expression Profile

Since the identification of bRGs, there have been increasing transcriptome studies focused on comparisons of rodent and human cortex, to characterize the expanded oSVZ and bRGs. For example, Fietz et al. (2012) used laser capture microdissection to separate proliferative zones and the CP in mouse (E14.5) and human (13–16 GW) fetal neocortex. Differentially expressed genes were identified between the zones, including species-specific differences, highlighting the importance of the extracellular matrix on the proliferative and self-renewing properties of progenitors. With improved technologies, higher resolution methods took advantage of cellular heterogeneity and different cell abundancies in individual human fetal brain sections, identifying modules of co-expressed genes from brain section transcription profiles (Lui et al., 2014). Searching for genes specifically expressed in human bRGs (vs. mouse), 18 candidate genes were identified (including *PDGFD*, *BMP7*, and *FAM107A*). PDGFD-PDGFR $\beta$  signaling was found to be important in human but not mouse cortex and involved in bRG production (see section “PDGFD Signaling”). Florio et al. (2015) also used fluorescent activated cell sorting (FACS) to

characterize the transcriptomes of different human fetal cortex cell populations (Florio et al., 2015) which they compared to equivalent cells from mouse embryonic neocortex. Apical plasma membrane markers helped distinguish aRGs from bRGs. Human bRGs showed a different gene expression profile compared to mouse bRGs, and some genes were identified that were not expressed in mouse (e.g., human-specific gene *ARHGAP11B*, see section “ARHGAP11B”).

Gene expression was also characterized in the ferret, for example by performing transcriptomic analysis of microdissected proliferative layers from regions of prospective gyri and sulci at P1 (equivalent to mouse E15, De Juan Romero and Borrell, 2015). As well as identifying differentially expressed genes in the oSVZ, they found that gene expression levels changed abruptly and repeatedly across the cortex, distinguishing multiple domains. Martinez-Martinez et al. followed this up by studying earlier ferret stages (see section “Gene Expression Profile” and “Human and Primate Evolutionary Inventions”), searching for differential gene expression in the VZ between three key stages: E30, E34, and P1 (Martinez-Martinez et al., 2016). This led to the identification of key genes (e.g., downregulated *Trnp1* and *Cdh1*) important for the initial production of bRGs. 54 genes changed their expression between E30 and E34, and 1822 between E34 and P1.

Johnson et al. (2015) used fluorescent sorting approaches to profile cell populations of interest from dissociated human cortical tissue using the expression of surface markers to differentiate the cells. They identified transcription factors downstream of Neurogenin 2, enriched in BPs as compared to aRGs. Microfluidic single cell RNA sequencing techniques were also applied to these cells to identify enriched non-apical BP genes, including in ferret. Similar approaches were also used by Pollen et al. (2014, 2015) without previous enrichment of the cell populations. 67 candidate marker genes were identified that strongly correlated with the human BP/bRG population (Pollen et al., 2014, 2015). Genes were highlighted related to extracellular matrix formation, migration and stemness, including *TNC* (Garcion et al., 2004), *PTPRZ1* (Baldauf et al., 2015), *FAM107A* (Kiwierska et al., 2017), *HOPX* (Yap et al., 2016), and *LIFR* (Wu et al., 2018). Importantly, LIFR/STAT3 signaling was found to be required for bRG cell cycle progression and selectively expressed by bRGs (Pollen et al., 2015). These cells were hence found to express genes important for self-renewal pathways and stemness, not detected in aRGs (which receive signals from the ventricles), and to have the capacity for extensive proliferation, as also suggested by the fact that many of the genes have roles in various types of cancer.

Thus, several studies have focused on analyzing the transcriptome of bRGs in the human brain in order to better understand their specificity and how, when and why they are enriched in gyrencephalic brains (Stahl et al., 2013; Johnson et al., 2015; Pollen et al., 2015; Thomsen et al., 2015; Liu et al., 2017). While sharing many similarities with aRGs in terms of gene expression, with both cell types expressing genes such as *PAX6*, *Nestin*, *PDGFD*, *SOX2*, and *VIM*, bRGs express specific genes, which along with other characteristics, makes them a distinguishable progenitor cell type compared to aRGs.

## Morphology

Basal radial glial cells were originally described in human brain tissue to have a basal process extending to the pial surface, but no apical process, using pVim and DiI staining, in two different studies (Fietz et al., 2010; Hansen et al., 2010). DiI staining later revealed that cycling oSVZ progenitors possessed basal processes, and in some instances, also apical processes even though these did not reach the ventricular surface (Betizeau et al., 2013). The basal process also displayed varicosities (small bulges highlighted by Vim) that appear during M-phase. Later, it was shown that bRGs were highly heterogeneous in the macaque developing cortex: bRGs with a basal process, but no apical process, or with both basal and apical processes, and bRGs with only an apical process were described (Betizeau et al., 2013).

## bRG Division: Mitotic Somal Translocation

Just before cytokinesis of bRGs, a rapid somal translocation occurs along the basal fiber toward the pial surface. This key step is crucial to position subsequent cell production of bRGs and IPs in the iSVZ/oSVZ and thus bypass potential overpopulation of progenitors in the VZ (Hansen et al., 2010). This cellular process named mitotic somal translocation is tightly regulated as for interkinetic nuclear migration of NEs and aRGs, and therefore could potentially fulfill similar functions (Hansen et al., 2010) to regulate the production of progenitors. This process may even be at the origin of the radial expansion of the oSVZ (Lui et al., 2011). It has been suggested that molecular pathway similarities exist between these two mechanisms (LaMonica et al., 2012). However, these cellular processes present in fact striking differences: to pull the nucleus toward the apical surface, interkinetic nuclear migration requires microtubule interacting components such as dynein and Lis1 (Gambello et al., 2003; Tsai and Gleeson, 2005; Taverna and Huttner, 2010), while mitotic somal translocation seems to depend on non-muscle myosin II and the Rho effector ROCK. Moreover, this somal translocation occurs independently from centrosome movement (Ostrem et al., 2014).

## GENERATION, AMPLIFICATION AND FUNCTION OF bRGs AND THEIR ROLE IN THE FORMATION OF FOLDS

### Cell Mechanisms Important for bRG Generation: Spindle Orientation and Cell Adhesion

Mitotic spindle orientation is highly regulated during aRG mitosis and well-characterized proteins involved in this process are GPM2 (LGN), Dynein, NuMA, Dlg1, and Afadin (reviewed in di Pietro et al., 2016). Spindle orientation, along with the highly polarized nature of RGs, allows the segregation of soluble factors to each daughter cell, giving rise to new aRGs, IPs, bRGs or immature neurons. Indeed, when an aRG divides, the cleavage orientation may predict the fate of the daughter cells: bRG generation is positively correlated with oblique or horizontal

cleavage angles (vertical divisions), the more basal cell migrating out of the VZ, while self-enriching divisions producing two aRGs are correlated with vertical cleavages planes (horizontal divisions) (Lancaster and Knoblich, 2012; LaMonica et al., 2013). LaMonica et al. (2013) performed time-lapse imaging in human brain slices at GW 18 to study the fate of cells after aRGs had performed division. Observing 70 divisions, 15 induced the generation of a bRG, characterized by basal fiber maintenance after division and cell translocation. All these bRGs were generated from horizontal (14) or oblique (1) cleavage angles, with the most vertical cell becoming the bRG (LaMonica et al., 2013). If the other daughter cell was destined to become an aRG, these cells were shown to regrow their basal processes in a Notch-dependent fashion, suggesting a self-renewal process to maintain the pool of APs (Shitamukai et al., 2011; LaMonica et al., 2013). These data are compared to previous results showing that in the mouse developing cortex, depending on the age, aRGs could carry out symmetric and asymmetric divisions while maintaining a near vertical spindle angle for both (Noctor et al., 2008). While being slightly slanted to one side due to one daughter cell inheriting the basal process, these horizontal divisions between E13 and E15 led to a majority of self-amplifying divisions, while between E16 and E19, the vast majority of dividing aRGs produced two different cells. This suggests that mitotic spindle orientation is not the sole mechanism required to adjust cell fate after division.

In the ferret it was shown in lineage experiments that oSVZ bRGs are predominately produced from aRGs during a restricted time period (Martínez-Martínez et al., 2016), when self-consuming divisions produced bRGs which seed the oSVZ. Amongst genes showing changed gene expression at E34 (e.g., compared to E30) was the downregulated adherens junction *Cdh1* (*E-cadherin*) gene. Thus an influence on adherens junctions appears important for cell delamination. This is discussed in more detail in sections “mSWI/SNF Subunits BAF170 and BAF155,” “INSM1,” and “TBC1D3.”

### Cell Cycle Properties of bRGs

Features of bRG divisions are complex, and while they are akin to aRGs, some aspects in comparison with other progenitors make them unique. First, contrary to initial studies showing limited proliferation of bRGs (Hansen et al., 2010), it is now known that they can undergo not only two but several rounds of proliferation (Betizeau et al., 2013), like aRGs of the VZ. IPs perform divisions with random cleavage planes, unlike the vast majority of bRG divisions where the upper cell conserves the basal process and performs mitotic somal translocation (Hansen et al., 2010; LaMonica et al., 2012, 2013). Secondly, despite their delamination from the VZ, bRG amplification is strictly controlled. Unlike other well-structured epithelia, where the cohesiveness of cellular architecture strictly controls their proliferation, bRGs have other mechanisms, and despite their delamination, maintain a rigorous cell cycle regulation. Local extracellular matrix molecules secreted around the bRGs might create a microenvironment in the oSVZ in order to control the proliferation of  $\beta$ 1-integrin+ bRGs (Fietz et al., 2010, 2012; Pollen et al., 2015), in conjunction with other signals received

in the basal process. Their cell cycle length is also strikingly different from what is known for rodent progenitors. While the total duration of the progenitor cell cycle is increased according to developmental stages in rodent, in contrast, in primate cortex, the total duration of the cell cycle of bRGs is decreased (Haven, 1998). One of the direct consequences of this, is the acceleration of bRG proliferation within the oSVZ which correlates with the expansion of the cortex (Betizeau et al., 2013).

### oSVZ Genesis, Cell Composition, and Function

The SVZ has a very important role during brain development in gyrencephalic species, especially in primates. It becomes divided in two regions, the apical iSVZ, and the basal oSVZ between GW12 and 16 in humans (Hansen et al., 2010; Lewitus et al., 2013). Two major progenitor cell types can be found primarily in each of these regions. Cells enriched in the iSVZ mainly resemble IP cells present in the rodent SVZ and are TBR2+ while progenitors enriched in the oSVZ are mainly RG-like cells. In the human developing cortex, TBR2 staining is mostly present in the iSVZ, with the vast majority of cells expressing both TBR2 and PAX6. At GW16, 90% of progenitors in the iSVZ express TBR2 and 50% of progenitors express PAX6, while less than 5% are TBR2+ and more than 90% are PAX6+ in the oSVZ (Fietz et al., 2010). Out of the PAX6+ cells, 90% are SOX2+ and many express KI67, hence bRG-like cells present in the oSVZ are dividing progenitors. While neurogenesis from aRGs and IPs is important, oSVZ cells represent a large proportion of the proliferative cells throughout cortical development in humans (Hansen et al., 2010), suggesting the importance of bRGs during corticogenesis.

In the macaque, corticogenesis starts at E45. Different staining methods have shown the correlation between a wave of corticogenesis and the appearance of the oSVZ that occurs between E55 and E65 in the monkey and expands up to E94 (Smart et al., 2002; Betizeau et al., 2013). For comparison, in the ferret oSVZ seeding and production of upper-layer neurons starts at around E33 and the oSVZ remains up until P1 (with birth at E42) (Fietz et al., 2010; Martínez-Cerdeño et al., 2012). In the macaque iSVZ, the vast majority of cells express TBR2 (60–80% of TBR2+/PAX6+ and 5–30% TBR2+ only) with less than 15% of PAX6+ only cells. In the oSVZ, it is the opposite with the majority of cells expressing PAX6+ (25–50% of TBR2+/PAX6+ cells and 20 to 35% expressing PAX6+ alone), with only 10–20% of TBR2+ cells, which is similar to human development (Betizeau et al., 2013). A high proportion of cells located in the oSVZ that are proliferative present the typical morphology of bRGs: 46% of cells are SOX2+/p-VIM+, and display a basal process. Different experiments using GFP-expressing adenovirus and co-staining for BrdU and EdU (thymidine analogs) showed the high proliferative capacities of these cells, capable of symmetric or asymmetric division. Initial studies showed that bRGs can not only expand the pool of bRGs themselves (with two rounds of division) but also generate TBR2+ neuronal precursor cells (LaMonica et al., 2012). In human, an increase in size of the oSVZ during GW13 to GW15.5

is proportional to the expansion of the proliferative population (Hansen et al., 2010). Detailed studies in the macaque revealed the presence of a more heterogeneous population of bRGs than initially expected (Betizeau et al., 2013) hence the proportion of bRGs could have been underestimated initially on the basis of morphology alone.

### Contribution of bRG Proliferation to the Formation of Gyri and Sulci

The origins of formation of gyri and sulci in primate brains are still highly debated (Borrell, 2018; Kroenke and Bayly, 2018). Up to mid-gestation, in humans, the cortex is relatively agyric. From GW25 (Bystron et al., 2008), the CP expands rapidly and the folding process begins. What are the causes at the basis of the apparition of folds? These are very likely multiple. First, in recent years, compelling evidence from genetic manipulation of genes and pathways (described in section “Molecular Mechanisms Associated With the Generation and Amplification of bRGs, Including bRG-Like Cells in the Rodent”) revealed an amplification of bRGs as well as the formation of folds (Stahl et al., 2013; Ju et al., 2016; Wang et al., 2016a; del Toro et al., 2017). In the ferret, the modulation of BP/bRG proliferation can regulate gyri formation (Reillo et al., 2011; Nonaka-Kinoshita et al., 2013; Matsumoto et al., 2017). Changes in bRG proliferation can induce drastic consequences in radial fiber organization and subsequently induce folds. Second, regulation of neuronal migration (for instance by modulation of Flrt adhesion molecule expression) could potentially induce neuronal clustering underlying fissure formation (del Toro et al., 2017). Also, a balance between outward and inward forces generated by the modulation of bRG proliferation and neuronal migration, respectively, contributes to the formation of folds by mainly changing the radial organization. Third, a tangential dispersion of neurons arising from bRGs, coupled with the maturation of the neurons positioned in the different cortical layers is also a major component of cortical folding. The increased complexity of dendritic arborization and axon development contributes to changes in the stiffness of the cortical structure and thus also promotes the apparition of forces generating the formation of gyri and sulci. These modifications in the biophysical properties of the neural tissue have been reproduced in polymer gel models or in human organoid culture systems and consistently generated artificial folding (Tallinen et al., 2014, 2016; Karzbrun et al., 2018). Fourth, recent studies involving extracellular matrix molecules identified a certain number around bRGs in the oSVZ (Fietz et al., 2010, 2012; Pollen et al., 2015). Some of these molecules such as Lumican, Collagen I and HAPLN1 (HLC) concentrate principally in these germinal zones, and when their expression is modulated by artificial treatment they have the ability to change the stiffness of the tissue contributing also to fold formation (Long et al., 2018; Wianny et al., 2018). Consequently, although forces that are generated at the end of neurogenesis can contribute to the gyrification process, bRGs by their morphology (with a long basal process), their specific basal localization, their proliferative capacity and their neuron production, are likely to be major players in the events initiating cortical folding.

## MOLECULAR MECHANISMS ASSOCIATED WITH THE GENERATION AND AMPLIFICATION OF bRGs, INCLUDING bRG-LIKE CELLS IN THE RODENT

Understanding how bRGs are generated has been a priority for many research groups since 2010. As well as human tissue, using the ferret, or artificially enriching bRG-like cells in the mouse brain, are methods which have been used to identify mechanisms. Describing these studies, in the rodent, we refer to bRG-like cells as those that are localized in basal regions, possessing a basal process, expressing bRG markers such as Pax6, Sox2, and pVim and capable of undergoing multiple rounds of division. Hence, listed in this section are the genes and signaling pathways which were shown to be involved in bRG/bRG-like cell generation (also resumed in **Figure 2** and **Tables 1, 2**), with an update on the cellular mechanisms involved (**Figure 3**).

### FGF-MAPK Pathway

The MAPK pathway is involved in many processes such as proliferation, differentiation, migration and apoptosis. It is generally activated by soluble growth factors that interact with receptors, triggering a signaling cascade (e.g., Ras-Mek-Erk) that regulates many processes, including gene expression (Sun et al., 2015). It is therefore not surprising to find links between the MAPK pathway, cortical development and the generation of bRGs. Erk signaling has been shown to promote Bergmann glia generation and is important for cerebellar foliation (Li et al., 2014). As Bergmann glia are reminiscent of bRGs in several aspects (notably transcriptional signatures), Heng et al. (2017) investigated the role of the MAPK pathway in bRG generation. ERK signaling is strongly activated in humans as compared to the mouse. Interestingly, the authors showed that expression via *in utero* electroporation at E14 of constitutively active forms of Fgfr1 (a tyrosine kinase receptor known to activate the pathway), Mek (a MAP kinase) or Etv4 (a response gene of the MAPK pathway) all lead to increased generation of Hopx+/Pax6+/Sox2+ bRG-like cells in the mouse 2 days later, and these cells can produce neurons and astrocytes (Heng et al., 2017). bRGs produced with this method are akin to primate-like bRGs as they can efficiently proliferate (cells go through multiple rounds of divisions, producing clonal populations of neurons). Matsumoto et al. (2017) investigated whether FGF signaling was also involved in BP expansion in a gyrencephalic species, the ferret. They showed that several isoforms of FGFRs (FGFR1-3) are expressed in the developing cortex of the ferret at P0, when folding occurs. They also showed that *in utero* electroporation of a dominant-negative form of FGFR3 at E33 reduced cortical folding and reduced the proportion of IPs and bRGs in the oSVZ. This suggests that FGFR3 signaling promotes cortical folding and upper layer thickness by regulating BP (in particular bRG) production and proliferative properties. Overall, these results show that the FGF/MAPK/ETV axis is sufficient to promote the generation of

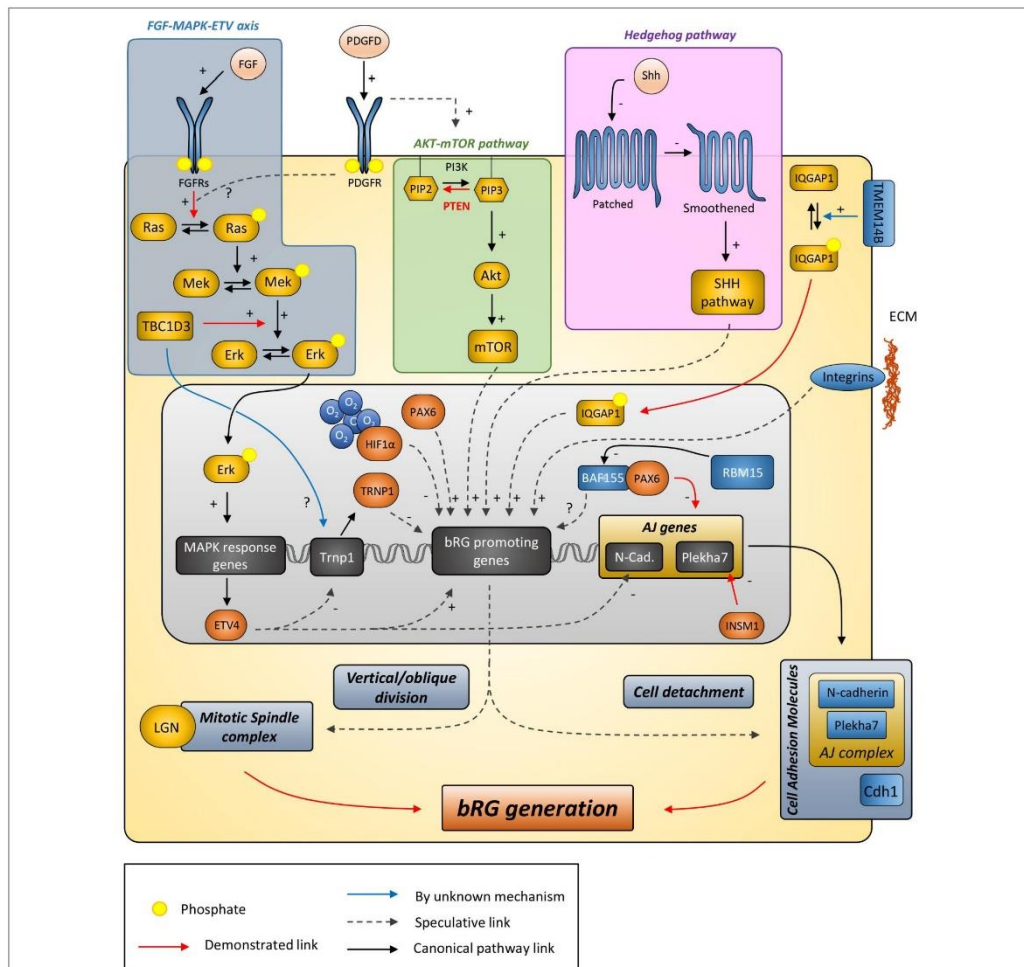
bRG-like cells in the mouse and is important for bRG production and folding in the ferret.

### PDGFD Signaling

PDGF signaling was also shown to be important for bRG generation. As mentioned in section “Gene Expression Profile,” Lui et al. (2014) identified 18 genes specific to human radial glia through gene expression analyses from human embryonic brain slices. PDGFD, a secreted growth factor, was identified in that list. Inhibitors of PDGFR $\beta$  decrease the number of neural progenitors (SOX2+ and TBR2+) in human embryonic brain slices but not in the mouse. Conversely, intraventricular injection of PDGF-DD or expression of a constitutively active form of PDGFR $\beta$  via *in utero* electroporation increases the proportion of Sox2+ cells in basal zones in the mouse. PDGF signaling is suggested to involve the MAPK pathway (Papadopoulos and Lennartsson, 2018), thus PDGFD stimulation could lead to an increase of bRG-like cells in the mouse in an Erk-dependent fashion.

### PTEN/AKT

The PI3K/PTEN/AKT pathway is involved in cell proliferation and is well characterized in cancer (Carnero and Paramio, 2014). PI3K increases levels of PIP3 which activates AKT signaling. PTEN works in the opposite direction, as it is a PIP3 phosphatase. This pathway is involved in cortical development, especially described in pathologies such as microcephaly and macrocephaly when the pathway is impaired or activated, respectively (Jansen et al., 2015; Wang et al., 2016b). The team of Li et al. (2017) used CRISPR/Cas9 targeting of PTEN in human organoids to study its role in progenitors. Loss of PTEN induced an increase in volume, surface area and folding at the surface of the organoids clearly visible at 6 weeks and beyond, when control organoids appeared smooth. PTEN deletion in mouse organoids increased their size, but did not induce folds, suggesting that AKT signaling regulates human-specific mechanisms. At early stages (4–6 weeks), human control organoids showed many DCX+ cells, while mutant organoids predominantly displayed Nestin+ cells. Loss of PTEN increased the proportion of cycling progenitor cells including SOX2+ and HOPX+ bRG cells. PTEN mutant organoids also showed decreased cell cycle exit at 4 and 6 weeks, and a decreased proportion of DCX+/EDU+ cells. All these results suggest that neuronal differentiation was delayed, consistent with an increased proportion of cycling progenitors. However, this delay was normalized in the following weeks (by week 8) with many cells acquiring neuronal fate. The presence of early folds when neurons are rare could be explained by the forces generated by the amplification of neural progenitors and the changed radial glia architecture. PTEN rescue experiments showed organoids displaying smooth surfaces and normal levels of proliferation. To further confirm AKT signaling involvement in folding, the authors treated the organoids with different known inhibitors of AKT signaling or expressed a dominant-negative form of AKT, showing that in each case, PTEN mutant organoids appeared smooth when AKT signaling was inhibited. All these results point to the importance of the PI3K/PTEN/AKT signaling pathway being a regulator of bRG generation, proliferation and cortical folding.



**FIGURE 2 |** Putative model describing the signaling pathways and other genes suggested to be involved in bRG generation. Canonical pathways currently demonstrated to promote bRG production include the FGF-MAPK axis, PDGFR signaling, PTEN/AKT/mTOR, and SHH pathways. Human/hominoid specific genes depicted in this figure include TBC1D3, a RABGAP protein that promotes Erk signaling and appears to repress Trnp1 expression, and TMEM14B, a transmembrane protein that promotes IQGAP1 translocation to the nucleus to regulate cell cycle progression. ARHGAP11B and Aspm are not indicated here as their function are either unclear or they do not obviously fit in the pathways with current knowledge. AJ, adherens junction; ECM, extracellular matrix.

### Hif1α

It has been suggested that neural progenitor cells are precisely regulated by oxygen (O<sub>2</sub>) levels (Pistolotto et al., 2007), involving the transcription factor Hif1α (which is activated by hypoxia). Hif1α was removed in the mouse brain using a Nestin-Cre mouse line, with pregnant mice at E14 exposed to 10% (hypoxia), 21% (normoxia), or 75% (hyperoxia) (Wagenführ et al., 2015). Hypoxia reduced brain volume while hyperoxia lead to an

increase in brain volume, accompanied with an increased number of Tbr2+ cells and Sox2+ bRG-like cells in a region beyond the SVZ forming a new neurogenic and proliferative niche (potentially oSVZ-like). Hyperoxia also increased the proportion of mitotic cells located in the IZ that were pVim+/Sox2+ and also pVim+/Sox2+/Tbr2+, but did not affect the proportion of mitoses in the VZ, suggesting that aRG proliferation was not altered by hyperoxia.



**TABLE 1** | List of genes involved in bRG generation.

Gene/Protein	Function	Model	Manipulation	Effect(s) on progenitors	Cell mechanism described	Other phenotype(s) described
ARHGAP11B	?	Mouse (IUE+mRNA microinjection)	Expression	IPs <sup>↑</sup> , basal mitoses <sup>↑</sup>	Cell fate change in aRG to produce more BPs, Proliferation <sup>↑</sup>	Thicker SVZ, Cortical folds, cortical expansion
		Ferret (IUE)	Expression	IPs <sup>↓</sup> , bRGs <sup>↑</sup>	Oblique/horizontal division in aRGs, Proliferation <sup>↑</sup>	Cortical expansion, upper-layer neurons <sup>↑</sup>
Aspm	MT associated protein	Ferret (transgenic line)	KO	bRGs <sup>↑</sup>	Early delamination of aRGs	Thinner VZ, microcephaly with conserved cortical layers
		Mouse (transgenic line)	KO	?	Mislocalized centrosomes and aberrant ventricular lining	-
Cdh1	Cell adhesion molecule	Ferret (IUE)	Expression of dominant-negative form	aRGs <sup>↓</sup> , bRGs <sup>↑</sup>	Cell adhesion <sup>↓</sup> , Oblique/horizontal division in aRGs	-
FGFR1, MEK, ERK, ETV4	RTK, MAPK, TF	Mouse (IUE)	Pathway activation (constitutively active form of FGFR1, Mek, Etv4)	bRGs <sup>↑</sup>	Proliferation <sup>↑</sup>	Upper-layer neurons <sup>↑</sup>
FGFRs	RTK	Ferret (IUE)	Pathway inhibition	bRGs <sup>↓</sup>	Proliferation <sup>↓</sup> in bRGs	Loss of cortical folds
GPSM2 (LGN)	Regulator of mitotic apparatus	Mouse (IUE/transgenic line)	Expression of dominant-negative form	bRGs <sup>↑</sup>	Oblique/horizontal division in aRGs	-
Hif1 $\alpha$	TF	Mouse	Regulation of the pathway (Hyperoxia during pregnancy)	IPs <sup>↑</sup> , bRGs <sup>↑</sup>	?	OSVZ-like region
INSM1	TF	Mouse (IUE)	Overexpression	IPs <sup>↑</sup> in the VZ, bRGs <sup>↑</sup>	Cell detachment from VZ, disruption of adherens junctions	-
Pax6	TF	Mouse (IUE/transgenic line)	Forced expression in BPs	IPs <sup>↓</sup> , bRGs <sup>↑</sup>	Oblique/horizontal division in aRGs, Proliferation <sup>↑</sup>	OSVZ-like region, thicker cortex, upper-layer neurons <sup>↑</sup>
		Mouse (transgenic line)	KO	bRGs <sup>↑</sup>	Cell adhesion <sup>↓</sup> , mostly non-cell autonomous	-
PDGFD/PDGFR signaling	PDGF receptor/ligand	Human brain slices	Pathway inhibition (treatment with PDGFR $\beta$ inhibitor)	IPs <sup>↓</sup> , bRGs <sup>↓</sup>	?	-
		Mouse (IUE+PDGF-DD injection)	Expression (constitutively active form of PDGFR $\beta$ )/Pathway activation	bRGs <sup>↑</sup>		
PTEN	Phosphatase	Human organoids	Pathway activation (CRISPR/Cas9 targeting of PTEN)	bRGs <sup>↑</sup>	?	Increased volume and cortical folds
		Mouse organoids		?		Increased volume but no cortical folds
SMARCC1 (Baf155)	Chromatin remodeling factor	Mouse (IUE/transgenic line)	KO	IPs <sup>↓</sup> (ectopic IPs in IZ), bRGs <sup>↑</sup>	Oblique/horizontal division in aRGs, regulates Pax6, cell adhesion <sup>↓</sup>	-
SmoM2	Shh pathway activator	Mouse (transgenic line)	Pathway activation (constitutively active form of SmoM2)	IPs <sup>↑</sup> , bRGs <sup>↑</sup>	Proliferation <sup>↑</sup>	Cortical folds, brain expansion
TBC1D3	RABGAP	Mouse (IUE/transgenic line)	Expression	aRGs <sup>↑</sup> , IPs <sup>↑</sup> , bRGs <sup>↑</sup>	Cell adhesion <sup>↓</sup> , proliferation <sup>↑</sup>	Cortical folds
		Human brain slices (electroporation)	KD	bRGs <sup>↓</sup>	?	-

(Continued)

**TABLE 1 |** Continued

Gene/Protein	Function	Model	Manipulation	Effect(s) on progenitors	Cell mechanism described	Other phenotype(s) described
TMEM14B	Kinase?	Mouse (IUE)	Expression	IPs <sup>↑</sup> , bRGs <sup>↑</sup>	Oblique/horizontal division in aRGs, Proliferation <sup>↑</sup>	OSVZ-like region, cortical folds
Trnp1	TF	Mouse (IUE)	KD	aRGs <sup>↓</sup> , IPs <sup>↓</sup> , bRGs <sup>↓</sup>	Cell adhesion?	Cortical folds

In this table are indicated the genes, their function, the model in which they were tested, the type of experiment performed, the effect on progenitor cells, the cellular mechanisms indicated in each study and other phenotypes associated with bRG regulation. IUE, in utero electroporation; aRGs<sup>↓</sup>, bRGs<sup>↓</sup>, diminution of the proportion of aRGs, IPs, and/or bRGs; aRGs<sup>↑</sup>, IPs<sup>↑</sup>, and bRGs<sup>↑</sup>, increase of the proportion of aRGs, IPs, and/or bRGs; Cell adhesion<sup>↓</sup>, diminution of cell adhesion (generally associated with loss or diminution of expression of adherens junction proteins or other cell adhesion molecules). Proliferation<sup>↑</sup>, increase in the proportion of mitotic and/or cycling cells; upper-layer neurons<sup>↑</sup>, increase in the proportion of upper-layer neurons in the cortical plate.

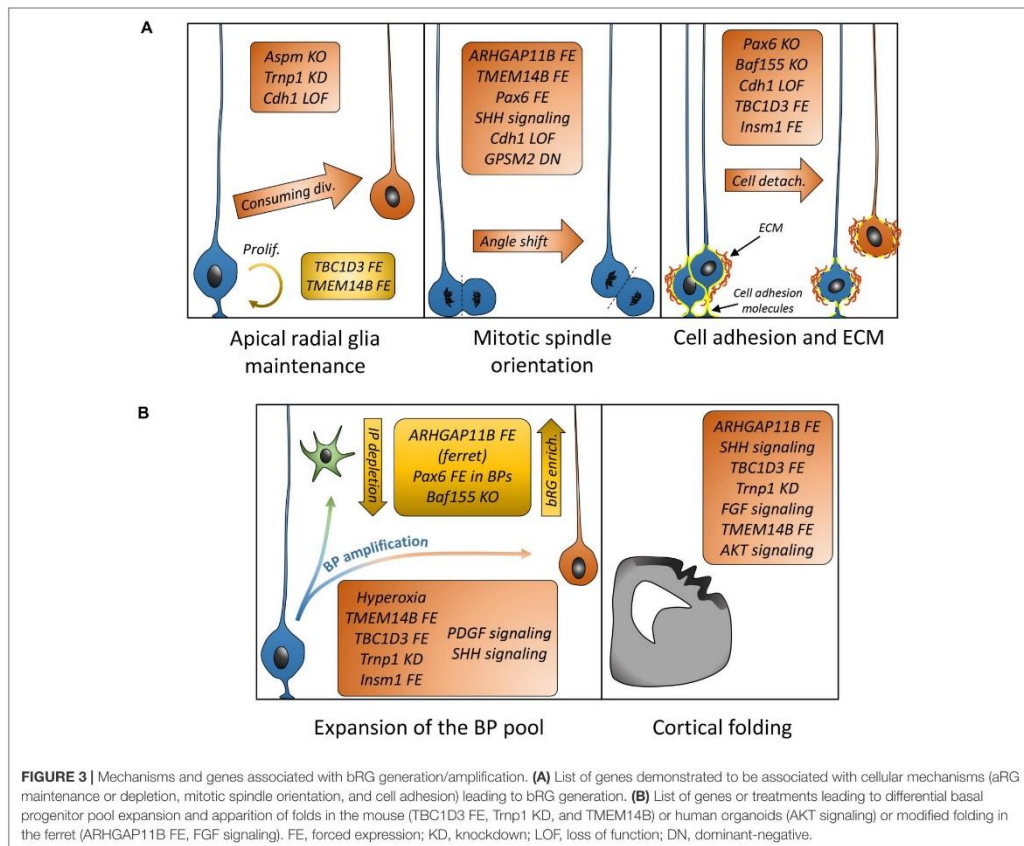
**TABLE 2 |** List of genetic tools used to promote or impair bRG generation.

Gene/Protein	Animals	Constructs	References
ARHGAP11B	-	pCMV6-AC-ARHGAP11B (Origene, SC324558) pCAGGS-ARHGAP11B	Florio et al., 2015 Florio et al., 2016
Aspm	Aspm KO ferrets Aspm KO mice	-	Johnson et al., 2018
Baf155	Baf155 fl/fl mice X Emx1:CRE mice	pCIG2-Cre-ires-eGFP	Narayanan et al., 2018
Cdh1	-	pCAG-DN-Cdh1	Martinez-Martinez et al., 2016
FGFR1, MEK, ERK, ETV4	-	pCAG-MekDD-IRES-EGFP, pCAG-Etv4-IRES-EGFP, pCAG-Etv5-IRES-EGFP, pCAG-FGFR1K656E-IRES-EGFP	Heng et al., 2017
FGFRs	-	pCAG-sFGFR3 (DN)	Matsumoto et al., 2017
Hif1α	Hif1α fl/fl mice X Nestin:Cre mice	-	Wagenführ et al., 2015
INSM1	-	pCAG-Insm1-IRES-mCherry, pCas9-Plekha7	Tavano et al., 2018
LGN	-	pCAG-Floxp-FLAG-LGN-C	Shitamukai et al., 2011
Pax6	Tis21:CreERT2 mice Pax6fl/fl mice X Emx1:CRE mice	pCAGGS-LoxP-GAP43-GFP-LoxP-Pax6-IRES-nRFP pCIG2-Cre-ires-eGFP	Wong et al., 2015 Narayanan et al., 2018
PDGFR/PDGFR signaling	-	pCAG-PDGFD-IRES-GFP	Lui et al., 2014
PTEN	-	gRNA for CRISPR/Cas9 mediated editing of human PTEN: 5'-aaacaaaggagatcaag-3'; FUW-DN-AKT and FUW-CA-AKT lentivirus constructs gRNA for CRISPR/Cas9 mediated editing of mouse Pten: 5'-agatcgttagcagaacaaaagg-3'	Li et al., 2017
SmoM2	Gt(ROSA)26Sortm1(Smo/EYFP)Amc X GFAP:Cre	-	Wang et al., 2016a
TBC1D3	Nestin:TBC1D3	pCS2-cMyc-TBC1D3, pCAGGS-TBC1D3-IRES-EGFP pSuper-siTBC1D3	Ju et al., 2016
TMEM14B	-	pCMV-3 Falg-TMEM14B-EGFP; pCMV-3 Falg-IQGAP1-EGFP	Liu et al., 2017
Trnp1	-	pSuper.GFPNEO_shRNA rv:DN-Trnp1	Stahl et al., 2013 Martinez-Martinez et al., 2016

In the IZ, hyperoxia, compared to normal O<sub>2</sub> levels, doubles the proportion of mitotic cells in a Hif1α-dependent fashion. Finally, O<sub>2</sub> tension was shown to regulate cortical thickness and layering including the correct positioning of migrating neurons. Hyperoxia increased cortical thickness with more Ctip2+ neurons (in deep layers). Hif1α is known to be regulated by the Akt/mTOR pathway in oncogenesis, leading to the regulation of gene programs involved in angiogenesis, metabolism and cell proliferation (El-Gazzar et al., 2014). Since AKT signaling promoted bRG generation in human organoids, it is possible that the AKT/mTOR/HIF1α signaling pathway could be regulated in such a way as to promote bRG genesis, especially in species in which bRGs are abundant.

### SHH Signaling

Shh signaling is involved in cell differentiation and the epithelial-mesenchymal transition (EMT) (Zhang et al., 2016; Chen et al., 2017). The delamination of neurons and progenitors (IPs and bRGs) could be compared to EMT since it involves delamination from the neuroepithelium and migration toward basal regions. Shh defects have been linked with microcephaly, in which the size of the brain and the cortex are reduced. Wang et al. (2016a) reported that transgenic mice expressing a constitutively active form SmoM2 of the Smoothed receptor display brain expansion and cortical folding at P7. These animals have increased proportions of Tbr2+ cells and bRG-like cells that are primate-like (possessing a basal and/or an



**FIGURE 3 |** Mechanisms and genes associated with bRG generation/amplification. **(A)** List of genes demonstrated to be associated with cellular mechanisms (aRG maintenance or depletion, mitotic spindle orientation, and cell adhesion) leading to bRG generation. **(B)** List of genes or treatments leading to differential basal progenitor pool expansion and apparition of folds in the mouse (TBC1D3 FE, Trnp1 KD, and TMEM14B) or human organoids (AKT signaling) or modified folding in the ferret (ARHGAP11B FE, FGF signaling). FE, forced expression; KD, knockdown; LOF, loss of function; DN, dominant-negative.

apical process and performing multiple rounds of division). aRGs display more oblique divisions when the Shh pathway is activated. Conversely, Smo mutant mice display microcephaly, with a decreased number of IPs and less oblique divisions. Interestingly, SHH signaling is strongly active during human embryonic development (Wang et al., 2016a). Wang et al. hence investigated whether SHH signaling could also promote bRG enrichment in human cerebral organoids. Indeed, activation of the SHH pathway was associated with an increased proportion of oblique divisions in aRGs and an increased number of bRGs. A very recent study investigated the role of Gpr161, a repressor of the Shh pathway (Shimada et al., 2019) in cortical development in the mouse. Conditional loss of Gpr161 in progenitors (deletion under the control of the Nestin promoter) causes various pathological phenotypes such as hydrocephaly and periventricular heterotopias. However, consistent with the previous study, an increased proportion of BPs (Tbr2+ IPs and Pax6+ bRG-like cells) could be found in basal regions. The proportion of mitotic cells in the SVZ and IZ was also increased.

These studies therefore suggest that SHH activation can induce the amplification of bRGs.

### Pax6

*Pax6* is a critical gene involved in many processes during development of the central nervous system (reviewed in Manuel et al., 2015). It codes for a radial glia-specific transcription factor that promotes the transition of NE cells to aRGs (Götz et al., 1998) and regulates proliferative and neurogenic properties of aRGs (Götz et al., 1998; Mo and Zecevic, 2008; Suter et al., 2009). In humans, PAX6 has a critical function as early as during neuroectoderm specification, as embryonic stem cells destined to become NEs express Pax6 before Sox2, which is not the case in the mouse (Zhang et al., 2010). Pax6 deficient mice display aRGs with abnormal glial fibers, and Pax6 regulates genetic programs in NE and aRGs to tightly control differentiation and neurogenesis in the forebrain, but also in eye development for which Pax6 has been shown to play a major role in the mouse and in *Drosophila* (Xie et al., 2013; Baker et al., 2018).

Pax6 is no longer expressed in aRG daughter cells that acquire either IP or neuronal cell fate in the mouse. In fact, Tis21 is a transcription factor that is expressed in a subpopulation of aRGs that will perform indirect or direct neurogenic divisions, while aRGs lacking Tis21 tend to perform self-amplifying divisions (Iacopetti et al., 2002). Wong et al. (2015) investigated the effect of sustained Pax6 expression in the daughter cells of Tis21-expressing aRGs, after generating a Tis21-CreER<sup>T2</sup> transgenic mouse line. By performing *in utero* electroporation in tamoxifen-treated animals at E13.5 with a plasmid expressing Pax6, they were able to express the gene specifically in the progeny of Tis21+ neurogenic aRGs. This experimental approach led 24 h later to an increased proportion of Pax6+ cells in the VZ and SVZ along with an increased proportion of proliferative cells in the SVZ. This was accompanied by a decrease of Tbr2+ and an increase of Sox2+, Pax6+, and pVim+ cells that possessed a basal process in the SVZ, as well as more oblique divisions of aRGs. Conditional Pax6+ expression therefore appears to change cell fate for aRG progeny by promoting bRG-like cell generation. Furthermore, cell cycle re-entry was also doubled in SVZ cells, suggesting that Pax6 sustained expression in BPs gives them primate-like proliferation and self-renewal features, as they perform multiple rounds of division. Consistent with other studies, bRG-like cell enrichment in this model also led to a thicker CP with an increase in the proportion of Satb2+ upper-layer neurons, both in electroporated mice or transgenic animals expressing Pax6 under the control of the Tis21 promoter. Therefore, Pax6-sustained expression in aRG daughter cells leads to the enrichment of bRG-like cells in the mouse, which further emphasizes the importance of Pax6 in cortical development, and especially how it regulates expression of its target genes in the context of bRG amplification.

### mSWI/SNF Subunits BAF170 and BAF155

Chromatin remodeling is an important mechanism that allows cell and tissue-specific gene expression patterns during development, as transcription factors require accessible chromatin to bind to the regulatory sequences of the target genes they interact with (de la Serna et al., 2006). This allows for lineage-specific promoters and enhancers to act and modulate cell fate, which is paramount during development (Alver et al., 2017; Vierbuchen et al., 2017). The mSWI/SNF complex, also known as the BAF complex, utilizes ATP-hydrolysis for energy to mobilize nucleosomes, and is critical for regulating cell proliferation and differentiation (Son and Crabtree, 2014). The complex is composed of many interchangeable elements including core subunits SMARCC1 (BAF155) and SMARCC2 (BAF170), and ATPases BRG1 and BRM. The composition of the complexes varies depending on time and cell type. Mutations of BAF complex components have been associated with cancer (Hodges et al., 2019) but also brain development impairments and intellectual disability (Machol et al., 2019).

The BAF complex and specifically certain subunits have been shown to be critical for cortical development, regulating the progenitor pools and differentiation (Tuoc et al., 2013a,b; Son and Crabtree, 2014). Brg1 was shown to be critical for the differentiation of NEs into aRGs (Matsumoto et al., 2016).

Baf155 is expressed early in NEs and aRGs, is important for their proliferation, and is replaced by Baf170 at the start of neurogenesis in dividing aRGs (Tuoc et al., 2013b). Baf170 loss of function in progenitors in the mouse (crossing Baf170<sup>fl/fl</sup> mice with Emx1-Cre mice to induce the deletion of the gene from E9.5 in neural progenitors) led to greater cortical size with an expansion of the pool of Tbr2+ cells in the SVZ, while Baf170 conditional overexpression led to the opposite phenotype with depletion of the progenitor pool and reduced cortical size (Tuoc et al., 2013a). In the absence of Baf170, the BAF complex includes more subunits of Baf155, which promotes Pax6-dependent gene modulation. Tuoc et al. showed that Baf170 regulates Pax6 dependent gene expression by recruiting the REST corepressor complex. Double conditional KO for both Baf155 and Baf170 using Emx1-dependent Cre expression led to dramatically affected cortical size and thinner germinal zones (Narayanan et al., 2015). Loss of both subunits resulted in a breakdown of the BAF complexes, leading to an overall increase of repressive epigenetic marks (H3K27me2 and H3K27me3), with subsequent overall gene repression. Finally, Baf170 KO in the developing and adult hippocampus showed alteration of the position and identity of progenitors in the dentate gyrus, enhanced gliogenesis and repressed neurogenesis (Tuoc et al., 2017). This suggests that epigenetic markers, regulated partly by the BAF complex, play a crucial role during several processes of cortical development (Narayanan et al., 2015; Nguyen et al., 2016). In a follow-up study, a Baf155 conditional KO (obtained by crossing Baf155<sup>fl/fl</sup> with Emx1-Cre mice) led to an overall decrease of Tbr2+ cells, but also among the remaining Tbr2+ cells, the presence of ectopic IPs in the IZ (Narayanan et al., 2018). The total proportion of Pax6+ cells was not affected, yet ectopic Pax6+/pVim+ cells that resembled bRG-like cells were observed in the IZ, suggesting a delamination of aRGs or bRG-like cell generation. This was accompanied by increased vertical mitoses in aRGs. No effects on cortical size and layers were observed in this model.

The Baf155/Baf170 balance hence appears to play a crucial role in the generation of both IPs and bRG-like cells. A conditional KO of Baf155, or Pax6 floxed mice electroporated with a Cre-expressing plasmid at E14.5 both promote the generation of bRG-like cells (with a stronger effect observed in a non-cell autonomous fashion). The authors deciphered this pathway by showing that Baf155 regulates bRG generation in a Pax6-dependent fashion by downregulating adherens junction-related genes, including genes coding for Cdc42 effector proteins 1 and 2 (Cep1 and 4, respectively). Knockdown of Cep4 via electroporation increased the proportion of IPs and bRG-like cells, mostly in a non-cell autonomous fashion. Finally, some genes enriched in human bRGs were shown to be upregulated in Baf155 KO animals, including Foxn4. Forced expression via *in utero* electroporation in the mouse yet again boosted Tbr2+ IPs and Pax6+ bRG-like cells in the mouse cortex. Finally, to further characterize how bRG production may be regulated by Baf155, Tuoc lab's studied how RNA methylation might impact Baf155 mRNA stability (Zhao et al., 2016; Xie et al., 2019). They showed that RNA-binding motif protein 15 (RBM15) binds to and enriches m6a methylation, and in the

mouse developing cortex, high levels of Rbm15 and low levels of Baf155 were found in the IZ and CP, and the converse situation in the VZ and SVZ, suggesting that methylation of Baf155 transcripts by Rbm15 may negatively regulate their half-life. Overexpression of Rbm15 via electroporation at E13.5 led to decreased levels of Baf155 in the VZ and to the presence of Pax6+/Sox2+ cells in basal regions in a non-cell autonomous fashion, consistent with Baf155 KO experiments mentioned above. Finally, the authors showed that Rbm15-dependent downregulation of Baf155 led to reduced Pax6-dependent activation of genes involved in adherens junctions and cell to cell interactions. Overall, these results suggest that there may be precise control of BAF155 mRNA through methylation, which in turn could modulate chromatin remodeling processes. Allowing certain transcription factors to promote or repress the expression of key genes could therefore be critical for progenitor function and generation of bRGs.

### INSM1

A major component of BP production appears to be delamination from the VZ, i.e., loss of attachment to the adherens junction belt. Tavano et al. (2018) studied the role of Insm1 [a transcription factor involved in the generation of BPs (Farkas et al., 2008)] in this process. Insm1 is present in a subset of VZ nuclei and the proportion of Insm1+ nuclei increases from E10.5 to E16.5 in the mouse, whereas expression in the SVZ is weak. Both in the mouse (E14.5) and the human developing cortex (between GW11 to 16), the majority of Insm1+ nuclei in the VZ are also Tbr2+, suggesting these cells are newborn IPs. However, in humans, the proportion of INSM1+/TBR2+ cells decreases during corticogenesis, with a corresponding increase of INSM1+/HOPX+ cells, suggesting that INSM1 is also expressed in newborn human bRGs. This suggests that INSM1 could potentially be involved in the increased complexity of the BP pool in humans as compared to mice. Insm1 overexpression at E12.5 via *in utero* electroporation in the mouse increased the proportion of Tbr2+ cells in the VZ with no increase in the SVZ and IZ 1 day later. Insm1 overexpression increased adventricular centrosomes (correlated with increased detachment of cells), and daughter pair analyses after mRNA microinjection showed an increase of the proportion of cell couples with only one, or no cell retaining their apical contact to the ventricular surface. Of the detached cells, almost 50% displayed typical bRG morphology and almost all were Sox2+. Insm1 overexpression hence promoted aRG delamination, leading to bRG-like cell generation (40% of cells that delaminated after Insm1 forced expression retained radial glia morphology). FACS followed by RNA sequencing showed 640 genes whose expression was regulated by Insm1 forced expression, some of which are involved in cell adhesion and migration. Among the genes that regulate these functions and have an involvement at adherens junctions, the authors focused on *Plekha7*, which is expressed in the most apical region of the VZ and is downregulated after Insm1 overexpression. They showed that disruption of *Plekha7* with a CRISPR/Cas9 approach phenocopies Insm1 overexpression with a delamination of progenitors, increasing the proportion of BPs, including cells with a basal process, further suggesting that loss of

cell adhesion in the VZ promotes progenitor delamination, and bRG-like cell production.

### GPSM2 and Notch-Delta

As mentioned previously, mitotic spindle orientation in the VZ could also be a key factor in the generation and detachment of newly generated bRGs, to allow them to migrate and disperse in basal regions of the developing cortex. Mitotic spindle orientation has been described to be of critical importance for cell fate (di Pietro et al., 2016), including in the cortex (LaMonica et al., 2013; Matsuzaki and Shitamukai, 2015). With this in mind, the team of Shitamukai et al. (2011) studied the impact of the Notch-Delta pathways and the involvement of GPSM2 (mentioned as LGN in the study) on the control of mitotic cleavage orientation. They showed that expression of a constitutively inactive form of GPSM2 in the mouse embryo after *in utero* electroporation increased the number of oblique and vertical divisions in aRGs, producing more daughter cells inheriting the basal process and migrating to basal regions. Consistent with Wang et al. (2011), they also showed that oblique divisions occurred in normal mouse brains, albeit being rare events. Artificially generated cells (after GPSM2 inactivation) were Pax6+, and found to have a similar morphology to human bRGs. Overactivation of the Notch-Delta pathway via overexpression of the Notch intracellular domain (NICD) leads to an increased conservation of APs and maintenance of newly generated bRG-like cells (capacity of performing multiple rounds of division). Furthermore of general interest, in this study authors showed that after aRGs perform mitosis, daughter cells that did not inherit the basal process were as likely to become aRGs as the ones that inherited it, by regrowing a process toward the basal surface.

### ASPM

Abnormal Spindle Microtubule Assembly (ASPM) codes for a protein involved in normal mitotic spindle function in neural progenitors (Fujimori et al., 2014). It is the most common recessive microcephaly gene in human. Johnson et al. (2018) generated *Aspm* mutant ferrets by injecting genome editing constructs in ferret zygotes. The mutant animals display microcephaly that is reminiscent of the human pathology (reduction of brain size with preserved cortical layers). Homozygous mutants displayed a thinner VZ and thicker oSVZ at E35 (at the beginning of neurogenesis), with an increased proportion of displaced Pax6+, Sox2+/Ki67+ cells basally (in the oSVZ), as well as Tbr2+ cells. Many of the displaced Pax6 cells resembled bRGs (basal process, pVim+, pH3+, Ptprz1+, and Hopx+). RNA sequencing showed that aRGs, endogenous bRGs and displaced bRGs are transcriptionally indistinguishable in this ferret model. All these results suggest a possible early enrichment of bRGs at the expense of aRGs depleting the pool of progenitors, either by aRG detachment from the ventricular surface or by cell division in which one daughter cell becomes a bRG, and the other one either a neuron or an IP. This depletion of the progenitor pool could explain the microcephaly. Interestingly, knockout mice for *Aspm* showed an increased proportion of Tbr2+ IPs at the expense of aRGs, but did not in this case

display ectopic Pax6+ or Sox2+ cells in basal regions (Johnson et al., 2018). This suggests that simply affecting mitotic spindle function is not sufficient to generate bRGs in an organism that naturally produces very few of them. Furthermore, ASPM interacts with the apical polarity complex, including PKC $\zeta$ , and centrosome proteins. Indeed, *Aspm* -/- mice show mislocalized centrosomes and an aberrant ventricular surface, which could potentially explain why BPs are enriched in the ferret and the mouse (Johnson et al., 2018).

### Human and Primate Evolutionary Inventions

In gene expression studies, some genes that were shown to be specifically expressed in bRGs were present only in humans or higher primate cells. Among these genes, the roles of TBC1D3, TMEM14B, and ARHGAP11B in the generation of bRGs were investigated.

#### TBC1D3

The team of Ju et al. (2016) studied the role of hominoid-specific *TBC1D3*, a gene coding for a member of a RABGAP family. The interest of this gene is that it is present in multiple copies on human chromosome 17, present in one copy in the chimpanzee and absent in other species, making it a potential candidate gene that could contribute to the increased complexity of the human brain. Expressing *TBC1D3* using *in utero* electroporation in the mouse embryonic brain at E13.5 increased the proportion of IPs and basal mitoses, including abundant bRG-like cells that were Pax6+ and Hopx+. Interestingly, expression of *TBC1D3* in all progenitors, via electroporation or in transgenic mice expressing the gene under the control of the nestin promoter, induced the apparition of pseudo-folds on the surface of the brain in early postnatal mice. Expression of *TBC1D3* influences the MAPK pathway, increasing levels of p-ERK, as well as downregulating *Trnp1*. *Trnp1* is a gene expressed in a subset of human and mouse aRGs that self-amplify and it regulates cell fate (Stahl et al., 2013). Stahl et al. (2013) overexpressed *Trnp1* in the mouse using *in utero* electroporation (at E13) and showed an enrichment of Pax6+ APs at the expense of the generation of Tbr2+ BPs at E16, and conversely, knocking down the gene induced the amplification of Tbr2+ cells in the SVZ, and most importantly of cells carrying the hallmarks of typical human bRGs 3 days after electroporation. Cells were Pax6+, localized outside of the VZ, and possessed a basal process extending to the pial surface. These cells could divide, with one daughter cell retaining the basal process. Knocking down *Trnp1* also led to the apparition of pseudo-circumvolutions on the surface of a subset of brains at post-natal day 2 (P2) and P5, similar to *TBC1D3* overexpression. *Trnp1* was shown to be a nuclear factor, and lowering its expression led to reduced gene expression levels of bHLH transcription factors, chromatin remodeling proteins, histone variants, as well as some anchoring and adhesion molecules such as Cdh6 and Cdh11, potentially suggesting that *Trnp1* can promote cell retention in the VZ, which is consistent with aRG enrichment following *Trnp1* overexpression. *TRNP1* expression in human fetal cortex varies along the VZ, low expression levels correlate with zones

of radial expansion (Martinez-Martinez et al., 2016). In the ferret brain, Martinez-Martinez showed temporal regulation of *Trnp1* and *Cdh1* expression allowing bRGs to be produced during an early time window (mentioned previously and in section "Gene Expression Profile"). The link between *Trnp1* and the MAPK pathways remains unknown, but it is possible that *TBC1D3* downregulates *Trnp1* expression via Erk signaling (Ju et al., 2016).

Further related to cell adhesion in the VZ, Martinez-Martinez et al. (2016) reported ferret genes that were differentially expressed during bRG production (E34–E36). They found that *Cdh1* was significantly lowered in expression just prior to peak bRG production from the VZ (lower at E34 than E30). *In utero* electroporation with a construct expressing a dominant-negative form of *Cdh1* increased the proportion of Pax6+ cells in the SVZ at the expense of Pax6+ cells in the VZ, further suggesting that changing cell adhesion in the VZ and at the ventricular surface promotes bRG production. This also led to an increased proportion of oblique divisions in aRGs. Expressing *Trnp1* in this paradigm prevented the apparition of these abundant bRGs, further suggesting the importance of maintaining low levels of *Trnp1* to produce bRGs.

*TBC1D3* also has an impact on cell adhesion since *TBC1D3* overexpression in the mouse decreased N-cadherin expression in the VZ (Ju et al., 2016). N-cadherin levels are known to control aRG proliferative properties (Miyamoto et al., 2015). Linked to the increase of basal mitoses, co-expression of *TBC1D3* with a construct expressing N-cadherin completely prevented the increase in abventricular divisions (and hence cells leaving the VZ), revealing the importance of *TBC1D3* in influencing adhesion. Overall, *TBC1D3* was shown to downregulate *Trnp1* and N-cadherin, which led to bRG amplification and apparition of folds on the surface of the brain. These results suggest that *TBC1D3* could be a key player in the complexification of the human brain, regulating critical processes of cortical development.

#### TMEM14B

Liu et al. (2017) performed RNA sequencing on human fetal brain samples, identifying bRG-specific genes, some not listed in previous studies, such as *TMEM14B*, *KCNK10*, *DAG1*, and *HP1BP3*. *TMEM14B* codes for a transmembrane protein present in primates. Its electroporation in the mouse at E13.5 cell autonomously induced the enrichment of Tbr2+ and Pax6+ BPs that showed basal processes, were localized in the SVZ and showed increased proliferation at E15.5. Mild cortical folding was observed, along with an increase in the proportion of Satb2+ cells, related to an increase in the proportion of upper-layer neurons. To express *TMEM14B* in all RGs, transgenic animals were generated that express *TMEM14B* under the control of the Nestin promoter using a conditional knock-in (CKI) approach. *In utero* electroporation and transgenic mice results were similar, showing at E15.5 an increased proportion of Tbr2+ cells, basally located Pax6+ and Pax6+/pVim+ cells in the SVZ and IZ (potentially forming an oSVZ-like region). There was an overall increase of neural progenitors with increased proliferation. Both *in utero* electroporation and CKI induced cortical folding,

however the effect was as expected much stronger in the CKI model (with an increased number of cells in upper and lower neuronal layers). To understand how TMEM14B expression promotes BP amplification, bRG-like cell generation in the mouse and cortical folding, mass spectrometry was performed using transfected HEK cells to study the TMEM14B interactome, and the Ras-activating-like protein IQGAP1 was identified. *In utero* electroporation of a construct expressing IQGAP1 partially phenocopied TMEM14B expression. It was shown that TMEM14B promotes IQGAP1 phosphorylation and subsequent nuclear localization.

### ARHGAP11B

In transcriptome analyses from fetal human and mouse neocortices to identify human-specific genes underlying bRG expansion, *ARHGAP11B* was revealed to be expressed both in human aRGs and bRGs, but not in neurons (Florio et al., 2015). The gene derives from partial duplication of *ARHGAP11A*, coding for a Rho GTPase, after divergence from the chimpanzee. However, ARHGAP11B does not have Rho GTPase activity. After electroporation at E13.5 of a construct expressing ARHGAP11B, mouse brains showed an increased proportion of Tbr2+ cells at E15.5, and daughter cell analyses after microinjection in aRGs showed that ARHGAP11B promoted cell detachment and symmetrical division to produce two Tbr2+ cells. Also, some electroporated brains showed cortical folding. ARHGAP11B-dependent BP enrichment requires a specific splice donor site in the *ARHGAP11B* gene which is absent in the ancestral gene (Florio et al., 2016). It allows the protein to have a particular C-ter domain thought to be essential for ARHGAP11B to promote BP and bRG production. ARHGAP11B was later expressed by *in utero* electroporation in the ferret embryo at E33, where bRGs are naturally abundant (Kalebic et al., 2018). The number of BPs was increased at P0, including cycling and mitotic cells in the SVZ (particularly in the oSVZ). The proportion of Sox2+ cells was increased but the proportion of Tbr2+ cells was decreased in the SVZ. Primate like Sox2+/Tbr2- bRGs were thus increased. Overall, by using BrdU and EdU injections, the study showed that ARHGAP11B expression in the ferret extended the neurogenic period as compared to control animals. Consequently, ARHGAP11B increased the proportion of upper layer neurons with an increased proportion of Satb2+ neurons (Kalebic et al., 2018). Overall, this data shows that ARHGAP11B expression promotes BP generation differentially between mouse and ferret, with increased Tbr2+ cells in the mouse, and increased bRGs in the ferret, with both species showing cortical expansion. This human-specific gene could therefore also be a good candidate to help explain bRG amplification during human cortical development.

### CEREBRAL ORGANOIDS – AN EMERGING HUMAN *IN VITRO* MODEL TO STUDY bRGs

Recent advances in stem cell technologies enable the generation of human cerebral organoids derived from pluripotent stem cells

(PSC). Today, several protocols to generate standardized and region-specific brain organoids are available representing different brain regions including dorsal and/or ventral telencephalon (reviewed in Marsoner et al., 2018). They all start by differentiating human PSCs as self-organizing 3-dimensional embryoid bodies. Most of the cortical region-specific organoids are generated under the influence of small molecule pathway modulators including SMAD signaling inhibitors to prevent mesoderm and endoderm differentiation, WNT signaling inhibitors to avoid posteriorization and SHH inhibitors to maintain dorsal identities (Kadoshima et al., 2013; Qian et al., 2016; Bagley et al., 2017). These organoids show similar 3D organization, histological layers, migration patterns as well the transcriptional profile of the early human developing brain (reviewed in Di Lullo and Kriegstein, 2017). First indications that bRGs are present in human cerebral organoids were made by the detection of SOX2+/PAX6+ proliferating cells located away from the ventricular-like zone (Kadoshima et al., 2013; Lancaster et al., 2013). These cells were described to exhibit a basal process extending toward the pia but to lack an apical process. In addition, the majority of these cells were shown to exhibit a horizontal cleavage angle. The molecular identity of bRGs could, however, first be reliably identified when molecular markers were established (Pollen et al., 2015). Comparative single cell transcriptome analyses of cerebral organoids with primary human brain tissue confirmed the presence of cells with bRG expression signatures in organoid cultures (Camp et al., 2015; Bershteyn et al., 2017). The structural positioning of bRGs within organoids were further investigated by Qian et al. (2016) who describe that organoids, similar to the developing human brain, exhibit an expanded SVZ-like zone, which is split by a thin gap into an iSVZ composed of TBR2+ IPs and an oSVZ. SOX2+ cells within the oSVZ were described to co-express the bRG markers HOPX, FAM107A, and PTPRZ1 and many of these cells were shown to actively divide. A further study investigating the characteristic mitotic behavior of bRGs in organoids by time-lapse confocal microscopy revealed that bRGs within the organoids display mitotic somal translocation (Bershteyn et al., 2017), the typical mitotic behavior for this cell population as mentioned in section “bRG Division: Mitotic Somal Translocation” (Lui et al., 2011), further supporting their cellular identity.

Although in human cerebral organoids, bRGs are proportionally fewer in number compared to respective human fetal tissue (Camp et al., 2015), they are potentially useful to identify and/or validate signaling pathways involved in the evolutionary expansion of this cell population. Watanabe et al. (2017) investigated the effect of the (LIFR)/STAT3 pathway on bRGs in cerebral organoids, this pathway being described to be expressed in bRGs of human and macaque, and to impact cell cycle progression (Pollen et al., 2015). They found that augmented stimulation of the (LIFR)/STAT3 pathway lead to a >3-fold increase in bRGs, thickening of the SVZ-like zone, and enhanced formation and separation of cortical layers thus supporting the importance of this pathway for bRG expansion (Watanabe et al., 2017). The impact of the SHH signaling pathway, which was described to be strongly active in human

fetal neocortex, on bRGs was also tested in human cerebral organoids. However, even though this study reported a decrease in bRGs when applying a Smoothed (SMO) antagonist, adding a SMO agonist to the organoid cultures did not change bRG production. This differential efficacy of the SMO antagonist and agonist most likely reflects the already high levels of endogenous SHH signaling in the organoid cultures (Wang et al., 2016a) (described above in section “SHH Signaling”). The PTEN-AKT signaling pathway was also suggested to impact bRG proliferation in human, but not mouse, cerebral organoids (described in section “PTEN/AKT”) (Li et al., 2017). Further comparison of human cerebral organoids and human primary cells to chimpanzee organoids and primary macaque cells suggest that the PI3K-AKT-mTOR pathway is strongly active in human bRGs, possibly promoting bRG expansion (Pollen et al., 2019). In addition, the mTOR effector phosphorylated ribosomal protein S6 (pS6), which was reported to strongly immunolabel bRGs in the human developing brain (Nowakowski et al., 2017), was found to also strongly immunolabel bRGs in human organoids, while chimpanzee organoid- and primary macaque-derived bRGs showed only faint pS6 immunoreactivity (Pollen et al., 2019). Thus these studies not only provide candidate molecular mechanisms governing human-specific changes in bRG signaling pathways but also highlight that organoids can serve as a platform for systematically characterizing features of human bRGs during development, evolution and pathology (e.g., for the latter, see Bershteyn et al., 2017). It is, however, important to note that organoids have their limitations with respect to fully reproducing the *in vivo* situation of the human developing brain. Protocols need to be further developed to improve amongst others the anatomy, the interconnection of different brain regions, the maturation and cellular diversity. But even though the organoid technology is still at its infancy further developments will presumably allow researchers to investigate previously experimentally inaccessible processes of human brain development *in vitro*.

## bRGs AND PATHOLOGY

A lot remains to be understood when it comes to the role of bRGs in normal cortical development and pathology. Genetic manipulation serves as a driving force to push either the mouse or the ferret neocortex to have more bRGs and more proliferation, serving as models to study normal human cortical development. But strikingly this is not always the case. For instance, concerning *Aspm*, early conversion of aRGs into bRGs in the ferret leads to a deleterious phenotype (Johnson et al., 2018), in which depletion of the pool of aRGs to promote bRG-like cell production led to microcephaly. However, mice mutated for *Aspm* (generated by gene-trap) which display microcephaly, show no obvious effect on mitotic spindle orientation and asymmetric vs. symmetric divisions in progenitors (Pulvers et al., 2010). This suggests either that truncated *Aspm* could exert some of its functions, or that there are species-specific mechanisms. Macrocephaly and microcephaly are suggested to be caused by progenitor malfunction (Desikan and Barkovich,

2016; Romero et al., 2018). Whether mutations leading to brain size defects in humans specifically affect bRGs remains unknown. Nevertheless, maintenance of aRGs, the core progenitors during cortical development, and correct timing and rate of production of bRGs, are critical to achieve the correct balance of all types of progenitors, and alteration of these processes could lead to these pathologies (Uzquiano et al., 2018). Also, our lab previously described that the brains of *HeCo* mice, mutated for Echinoderm Microtubule Associated Protein-like 1 (*Eml1*), display heterotopia (Kielar et al., 2014). Brains are characterized by clusters of cells (both early and late born neurons) which are retarded in the IZ during embryogenesis. Late-born neurons are finally trapped in these subcortical regions (the white matter) in adults. Human patients with mutations in *EML1* also show ribbon-like heterotopias (Romero et al., 2018). Neuronal migration itself did not appear affected in these mice during corticogenesis, but abnormally located Pax6+/pVim+ progenitors were observed in the IZ and CP. This phenotype was also associated with an increase in the proportion of oblique divisions in aRGs. However abnormally located cells were found to not always be radially oriented suggesting basal detachment. Ectopically generated neurons from these abnormal basal Pax6+ progenitors are likely to contribute to the heterotopias in these mice. *Shh* activation in the mouse via the *Gpr161* conditional KO also induced heterotopias that are accompanied with “bRG-like” cell amplification (Shimada et al., 2019). Furthermore, Pax6 loss of function in the *small eye* mouse mutant also displays basally located progenitors that carry RG characteristics, which is consistent with the results obtained in the Pax6 conditional mutants (Götz et al., 1998; Narayanan et al., 2018). Other mutations have also been shown to be associated with the presence of ectopically located progenitors (reviewed by Bizzotto and Francis, 2015) such as *Arl13b* and *Marcks* mouse mutants, potentially showing subtle differences from bRG-like cells. Alteration of bRG proliferation and function could however, also be involved in lissencephaly. While most of the previous studies mainly focused on neuronal migration impairment in these pathologies (Hirotune et al., 1998; Tsai and Gleeson, 2005; Romero et al., 2018), little is known about the role of progenitors and especially bRGs (Yingling et al., 2008; Bershteyn et al., 2017). Due to their abundant presence in gyrencephalic brains, and the formation of folds on the surface of the mouse cortex when they are artificially enriched, they have been suggested to be crucial for the development of circumvolutions on the surface of the brain. Therefore, one can assume that they could be involved in pathologies in which gyri and sulci are not formed. However, it is also known that the presence of bRGs does not always strictly correlate with cortical folds, as the marmoset, which is a near-lissencephalic primate, possesses abundant bRGs and an oSVZ layer during corticogenesis (Hevner and Haydar, 2012; Kelava et al., 2012).

As mentioned in section “Gene Expression Profile,” the extracellular matrix could also play a role not only in the proliferative properties of bRGs but also in their generation. Indeed, each germinal zone expresses its specific pattern of these molecules (Fietz et al., 2012). Integrins are the main extracellular



matrix receptors, mediating cell adhesion processes as well as initiating intracellular signaling cascades (Barczyk et al., 2010). Integrin  $\alpha_v\beta_3$  is expressed in RG basal processes at the level of varicosities, and disruption of  $\alpha_v\beta_3$  integrin in the ferret via echistatin or blocking antibody treatment leads to a decreased proportion of cycling Pax6+ cells in the SVZ (Fietz et al., 2012). However, earlier studies showed that disruption of  $\beta_1$  in the mouse, either via genetic KO in neural progenitors (Radakovits et al., 2009) or blocking antibody treatment (Loulier et al., 2009) leads to impaired cortical development. In these studies, proliferation of aRGs is affected, leading to reduced cortical size. The authors showed that  $\beta_1$  integrin loss of function increased the proportion of abventricular mitoses, due to the fact that the basal process detaches from the basal membrane and aRG cell bodies delaminate from the VZ. This delamination leads to abnormal basal processes, and eventually apoptosis. These results suggest that the extracellular matrix and its receptors are involved in the maintenance of the basal process, which plays potentially a crucial role in bRG generation, since basal process maintenance is a hallmark of these cells, as well as cell delamination from the VZ.

While enrichment of bRGs is generally associated with increased proliferation and is considered as a major factor in the process of cortical folding, the examples mentioned above showcase situations in which “bRG-like” cells are generated in deleterious conditions, or in models of human-related pathologies. It is important to revisit these pathologies with our current knowledge about bRGs as, for instance, the function of ectopic Pax6+ progenitors mentioned above and their contribution to the pathological phenotypes remain unclear in these contexts. Furthermore, their nature is also unknown, single-cell RNA sequencing could help us answer whether these cells have bRG identity (and characteristics) or if they are mislocalized and aberrant aRGs. Depletion of the AP pool, abnormal generation of neurons (proliferation and site of neurogenesis) could both affect normal corticogenesis. bRGs therefore represent a major subject for the scientific field and understanding how these cells are generated and function will help us understand better how the neocortex develops in humans, and therefore bring insights to help us fully understand human malformations of cortical development. This could potentially pave the way toward the development of new therapeutic strategies.

## CONCLUSION

This review offers a comprehensive view on bRGs, including mechanisms and genes currently described as being involved in their generation, their characteristics in terms of morphology and function as well as their role in the gyrification of the cortex. An intriguing phenomenon that is highlighted by mouse studies described in section “Molecular Mechanisms Associated With the Generation and Amplification of bRGs, Including bRG-Like Cells in the Rodent” is that enriched bRG-like cells behave like human cells when considering proliferation and progeny. This suggests that not only do these genes promote the cell machinery that is required for aRGs to massively generate bRGs, they also could activate a transcriptional program in newly generated

bRG-like cells that is potentially distinct from mouse resident bRG-like cells.

Considering all the information mentioned above, another interesting feature of the studies that we highlighted is that each of the genes that were manipulated are individually sufficient to promote bRG-like cell generation when their expression and/or function are modified. For most of them, an expression level modification is sufficient to generate primate like bRG-like cells in the mouse by affecting different cellular mechanisms (Figure 3A and Table 1). Overall, the genes identified impact various signaling pathways and belong to gene families that possess different functions, however these all converge to promote bRG-like cells (Figure 2). This suggesting that either there exist multiple distinct signaling pathways and cellular mechanisms which are responsible for bRG generation from aRGs independent from one another (this could be the case impacting either spindle orientation or cell adhesion changes), or that all these genes are part of an all-encompassing pathway in which alteration of one actor impacts part or all the other actors in the network. It currently remains a challenge to have a global understanding of how these pathways interact together and regulate each other (Figure 2), and thus it is impossible today to have a definitive answer to this question.

However, even though bRGs (or bRG-like cells) are amplified in all cases mentioned, the studies describe different consequences that are associated with bRG enrichment, such as depletion of certain pools of progenitors or folding on the surface of the mouse brain, depending on the gene involved and the model used (Figure 3B). This may suggest that not all the bRG-enriching methods are equal, potentially contradicting the all-encompassing hypothesis. Considering the current trend of this field of scientific research, we can expect in the near future more bRG generation genes to be identified and tested, which will further reveal the potential interrelations between these signaling pathways.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed have made a substantial, direct and intellectual contribution to the work, and approved it for publication. JL wrote the human organoid section. MP, RB, and FF wrote the rest of the manuscript.

## FUNDING

We are grateful for the funding provided by the JTC 2015 Neurodevelopmental Disorders affiliated with the French Agence Nationale de la Recherche ANR (Eranet NEURON8-Full-815-006 STEM-MCD). This work was supported by the ANR, under the frame of E-Rare-3, the ERA-Net for Research on Rare Diseases (ERARE18-049). Further funding was obtained from the ANR-13-BSV4-0008-01 and ANR-16-CE16-0011-03 projects to FF and the Hector Foundation II to JL. MP is funded by the Neuron ERANET network and is affiliated with the Complexité du Vivant Doctoral School. The laboratory of FF is associated with the BioPsy Labex

project and the Ecole des Neurosciences de Paris Ile-de-France (ENP) network and supported by Inserm, Sorbonne University, and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) for salaries.

## REFERENCES

- Alver, B. H., Kim, K. H., Lu, P., Wang, X., Manchester, H. E., Wang, W., et al. (2017). The SWI/SNF chromatin remodelling complex is required for maintenance of lineage specific enhancers. *Nat. Commun.* 8:14648. doi: 10.1038/ncomms14648
- Bagley, J. A., Reumann, D., Bian, S., Lévi-Strauss, J., and Knoblich, J. A. (2017). Fused cerebral organoids model interactions between brain regions. *Nat. Methods* 14, 743–751. doi: 10.1038/NMETH.4304
- Baker, L. R., Weasner, B. M., Nagel, A., Neuman, S. D., Bashirullah, A., and Kumar, J. P. (2018). Eyeless/Pax6 initiates eye formation non-autonomously from the peripodial epithelium. *Development* 145:dev163329. doi: 10.1242/dev.163329
- Baldauf, C., Jeschke, A., Kanbach, V., Catala-lehnen, P., Harroch, S., and Schinke, T. (2015). The protein tyrosine phosphatase Rptp $\gamma$  suppresses osteosarcoma development in Trp53-heterozygous mice. *PLoS One* 10:e0137745. doi: 10.1371/journal.pone.0137745
- Barczyk, M., Carracedo, S., and Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell Tissue Res.* 339, 269–280. doi: 10.1007/s00441-009-0834-6
- Bershteyn, M., Nowakowski, T. J., Pollen, A. A., Di Lullo, E., Nene, A., Wynshaw-Boris, A., et al. (2017). Human iPSC-derived cerebral organoids model cellular features of lissencephaly and reveal prolonged mitosis of outer radial glia. *Cell Stem Cell* 20, 435–449.e4. doi: 10.1016/j.stem.2016.12.007
- Betizeau, M., Cortay, V., Patti, D., Pfister, S., Gautier, E., Bellemín-Ménard, A., et al. (2013). Precursor diversity and complexity of lineage relationships in the outer subventricular zone of the primate. *Neuron* 80, 442–457. doi: 10.1016/j.neuron.2013.09.032
- Bizzotto, S., and Francis, F. (2015). Morphological and functional aspects of progenitors perturbed in cortical malformations. *Front. Cell. Neurosci.* 9:30. doi: 10.3389/fncel.2015.00030
- Borrell, V. (2018). How cells fold the cerebral cortex. *J. Neurosci.* 38, 776–783. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1106-17.2017
- Borrell, V., and Götz, M. (2014). Role of radial glial cells in cerebral cortex folding. *Curr. Opin. Neurobiol.* 27, 39–46. doi: 10.1016/j.conb.2014.02.007
- Bystron, L., Blakemore, C., and Rakic, P. (2008). Development of the human cerebral cortex: boulder committee revisited. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 110–122. doi: 10.1038/nrn2252
- Camp, J. G., Badsha, F., Florio, M., Kanton, S., Gerber, T., Wilsch-Bräuninger, M., et al. (2015). Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 15672–15677. doi: 10.1073/PNAS.1520760112
- Carnero, A., and Paramio, J. M. (2014). The PTEN/PI3K/AKT pathway in vivo, cancer mouse models. *Front. Oncol.* 4:252. doi: 10.3389/fonc.2014.00252
- Chen, T., You, Y., Jiang, H., and Wang, Z. Z. (2017). Epithelial-mesenchymal transition (EMT): a biological process in the development, stem cell differentiation, and tumorigenesis. *J. Cell. Physiol.* 232, 3261–3272. doi: 10.1002/jcp.25797
- De Juan Romero, C., and Borrell, V. (2015). Coevolution of radial glial cells and the cerebral cortex. *Glia* 63, 1303–1319. doi: 10.1002/glia.22827
- de la Serna, I. L., Ohkawa, Y., and Imbalzano, A. N. (2006). Chromatin remodelling in mammalian differentiation: lessons from ATP-dependent remodellers. *Nat. Rev. Genet.* 7, 461–473. doi: 10.1038/nrg1882
- del Toro, D., Ruff, T., Cederfjäll, E., Villalba, A., Seyit-Bremer, G., Borrell, V., et al. (2017). Regulation of cerebral cortex folding by controlling neuronal migration via FLRT adhesion molecules. *Cell* 169, 621–635.e16. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.012
- Dennis, D., Picketts, D., Slack, R. S., and Schuurmans, C. (2016). Forebrain neurogenesis: from embryo to adult. *Trends Dev. Biol.* 9, 77–90.
- Desikan, R. S., and Barkovich, J. (2016). Malformations of cortical development. *Ann. Neurol.* 80, 797–810. doi: 10.1002/ana.24793
- Di Lullo, E., and Kriegstein, A. R. (2017). The use of brain organoids to investigate neural development and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 573–584. doi: 10.1038/nrn.2017.107
- di Pietro, F., Echard, A., and Morin, X. (2016). Regulation of mitotic spindle orientation: an integrated view. *EMBO Rep.* 17, 1106–1130. doi: 10.15252/embr.201642292
- El-Gazzar, A., Heller, G., Tomasich, E., Krainer, M., Horak, P., Spittler, A., et al. (2014). HIF1 $\alpha$  regulates mTOR signaling and viability of prostate cancer stem cells. *Mol. Cancer Res.* 13, 556–564. doi: 10.1158/1541-7786.mcr-14-0153-t
- Farkas, L. M., Haffner, C., Giger, T., Khaitovich, P., Nowick, K., and Birchmeier, C. (2008). Insulinoma-associated 1 has a panneurogenic role and promotes the generation and expansion of basal progenitors in the developing mouse neocortex. *Neuron* 60, 40–55. doi: 10.1016/j.neuron.2008.09.020
- Fernández, V., Llinares-Benadero, C., and Borrell, V. (2016). Cerebral cortex expansion and folding: what have we learned? *EMBO J.* 35, 1021–1044. doi: 10.15252/emj
- Fietz, S. A., Kelava, I., Vogt, J., Wilsch-Bräuninger, M., Stenzel, D., Fish, J. L., et al. (2010). OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. *Nat. Neurosci.* 13, 690–699. doi: 10.1038/nn.2553
- Fietz, S. A., Lachmann, R., Brandl, H., Kircher, M., Samusik, N., Schroder, R., et al. (2012). Transcriptomes of germinal zones of human and mouse fetal neocortex suggest a role of extracellular matrix in progenitor self-renewal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 11836–11841. doi: 10.1073/pnas.1209647109
- Florio, M., Albert, M., Taverna, E., Namba, T., Brandl, H., Lewitus, E., et al. (2015). Human-specific gene ARHGAP11B promotes basal progenitor amplification and neocortex expansion. *Science* 347, 1465–1470. doi: 10.1126/science.aaa1975
- Florio, M., Namba, T., Pääbo, S., Hiller, M., and Huttner, W. B. (2016). A single splice site mutation in human-specific ARHGAP11B causes basal progenitor amplification. *Sci. Adv.* 2:e1601941. doi: 10.1126/sciadv.1601941
- Fujimori, A., Itoh, K., Goto, S., Hirakawa, H., Wang, B., Kokubo, T., et al. (2014). Disruption of *Aspm* causes microcephaly with abnormal neuronal differentiation. *Brain Dev.* 36, 661–669. doi: 10.1016/j.braindev.2013.10.006
- Gambello, M. J., Darling, D. L., Yingling, J., Tanaka, T., Gleason, J. G., and Wynshaw-Boris, A. (2003). Multiple dose-dependent effects of *Lis1* on cerebral cortical development. *J. Neurosci.* 23, 1719–1729. doi: 10.1523/jneurosci.23-05-01719.2003
- Garcion, E., Halilagic, A., Faissner, A., and ffrench-Constant, C. (2004). Generation of an environmental niche for neural stem cell development by the extracellular matrix molecule tenascin C. *Development* 131, 3423–3432. doi: 10.1242/dev.01202
- Götz, M., and Huttner, W. B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 777–788. doi: 10.1038/nrm1739
- Götz, M., Stoykova, A., and Gruss, P. (1998). Pax6 controls radial glia differentiation. *Neuron* 21, 1031–1044. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80621-2
- Hansen, D. V., Lui, J. H., Parker, P. R. L., and Kriegstein, A. R. (2010). Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature* 464, 554–561. doi: 10.1038/nature08845
- Hatanaka, Y., Zhu, Y., Torigoe, M., Kita, Y., and Murakami, F. (2016). 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
- Haven, N. (1998). Changes in cell-cycle kinetics during the development and evolution of primate neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 1242–1246. doi: 10.1073/pnas.95.3.1242
- Heng, X., Guo, Q., Leung, A. W., and Li, J. Y. H. (2017). Analogous mechanism regulating formation of neocortical basal radial glia and cerebellar Bergmann glia. *eLife* 6:e23253. doi: 10.7554/eLife.23253
- Hevner, R. F., and Haydar, T. F. (2012). The (Not Necessarily) convoluted role of basal radial glia in cortical neurogenesis. *Cereb. Cortex* 22, 465–468. doi: 10.1093/cercor/bhr336

- Hirotsune, S., Fleck, M. W., Gambello, M. J., Bix, G. J., Chen, A., Clark, G. D., et al. (1998). Graded reduction of Pafah1b1 (Lis1) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Nat. Genet.* 19, 333–339. doi: 10.1038/1221
- Hodges, C., Kirkland, J. G., and Crabtree, G. R. (2019). The many roles of BAF (mSWI/SNF) and PBAF complexes in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6:a026930. doi: 10.1101/cshperspect.a026930
- Howard, B. M., Mo, Z., Filipovic, R., Moore, A. R., Antic, S. D., and Zecevic, N. (2008). Radial glia cells in the developing human brain. *Neuroscientist* 14, 459–473. doi: 10.1117/1073858407313512
- Huttner, W. B., and Kosodo, Y. (2005). Symmetric versus asymmetric cell division during neurogenesis in the developing vertebrate central nervous system. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 648–657. doi: 10.1016/j.ccb.2005.10.005
- Iacopetti, P., Michelini, M., Stuckmann, I., Obach, B., Aaku-Saraste, E., and Huttner, W. B. (2002). Expression of the antiproliferative gene TIS21 at the onset of neurogenesis identifies single neuroepithelial cells that switch from proliferative to neuron-generating division. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 4639–4644. doi: 10.1073/pnas.96.8.4639
- Jansen, L. A., Mirzaa, G. M., Ishak, G. E., O’Roak, B. J., Hiatt, J. B., Roden, W. H., et al. (2015). PI3K/AKT pathway mutations cause a spectrum of brain malformations from megalencephaly to focal cortical dysplasia. *Brain* 138, 1613–1628. doi: 10.1093/brain/awv045
- Johnson, M. B., Sun, X., Kodani, A., Borges-monroy, R., Girsakis, K. M., Patel, K., et al. (2018). *Aspm* knockout ferret reveals an evolutionary mechanism governing cerebral cortical size. *Nature* 556, 370–375. doi: 10.1038/s41586-018-0035-0
- Johnson, M. B., Wang, P. P., Atabay, K. D., Murphy, E. A., Doan, R. N., Hecht, J. L., et al. (2015). Single-cell analysis reveals transcriptional heterogeneity of neural progenitors in human cortex. *Nat. Neurosci.* 18, 637–646. doi: 10.1038/nn.3980
- Ju, X. C., Hou, Q. Q., Sheng, A. L., Wu, K. Y., Zhou, Y., Jin, Y., et al. (2016). The hominoid-specific gene *TBC1D3* promotes generation of basal neural progenitors and induces cortical folding in mice. *eLife* 5:e18197. doi: 10.7554/eLife.18197
- Kadoshima, T., Sakaguchi, H., Nakano, T., Soen, M., Ando, S., Eiraku, M., et al. (2013). Self-organization of axial polarity, inside-outside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 20284–20289. doi: 10.1073/pnas.1315710110
- Kalebic, N., Gilardi, C., Albert, M., Namba, T., Long, K. R., Kostic, M., et al. (2018). Human-specific *ARHGAP11B* induces hallmarks of neocortical expansion in developing ferret neocortex. *Elife* 7:e41241. doi: 10.7554/eLife.41241
- Karzbrun, E., Kshirsagar, A., Cohen, S. R., Hanna, J. H., and Reiner, O. (2018). Human brain organoids on a chip reveal the physics of folding. *Nat. Phys.* 14, 515–522. doi: 10.1038/s41567-018-0046-7
- Kawasaki, H., Toda, T., and Tanno, K. (2012). *In vivo* genetic manipulation of cortical progenitors in gyrencephalic carnivores using *in utero* electroporation. *Biol. Open* 2, 95–100. doi: 10.1242/bio.20123160
- Kelava, I., Reillo, I., Murayama, A. Y., Kalinka, A. T., Stenzel, D., Tomancak, P., et al. (2012). Abundant occurrence of basal radial glia in the subventricular zone of embryonic neocortex of a lissencephalic primate, the common marmoset *Callithrix jacchus*. *Cereb. Cortex* 22, 469–481. doi: 10.1093/cercor/bhr301
- Kielar, M., Phan Dinh Tuy, F., Bizzotto, S., Lebrand, C., de Juan Romero, C., Poirier, K., et al. (2014). Mutations in *Eml1* lead to ectopic progenitors and neuronal heterotopia in mouse and human. *Nat. Neurosci.* 17, 923–933. doi: 10.1038/nn.3729
- Kiwerska, K., Szaumkessel, M., Paczkowska, J., Bodnar, M., Byzia, E., Kowal, E., et al. (2017). Combined deletion and DNA methylation result in silencing of *FAM107A* gene in laryngeal tumors. *Sci. Rep.* 7:5386. doi: 10.1038/s41598-017-05857-1
- Kroenke, C. D., and Bayly, P. V. (2018). How forces fold the cerebral cortex. *J. Neurosci.* 38, 767–775. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1105-17.2017
- LaMonica, B. E., Lui, J. H., Hansen, D. V., and Kriegstein, A. R. (2013). Mitotic spindle orientation predicts outer radial glial cell generation in human neocortex. *Nat. Commun.* 4:1665. doi: 10.1038/ncomms2647
- LaMonica, B. E., Lui, J. H., Wang, X., and Kriegstein, A. R. (2012). OSVZ progenitors in the human cortex: an updated perspective on neurodevelopmental disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 747–753. doi: 10.1016/j.conb.2012.03.006.OSVZ
- Lancaster, M. A., and Knoblich, J. A. (2012). Spindle orientation in mammalian cerebral cortical development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 737–746. doi: 10.1016/j.conb.2012.04.003
- Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C.-A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurles, M. E., et al. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 501, 373–379. doi: 10.1038/nature12517
- Lewitus, E., Kelava, I., and Huttner, W. B. (2013). Conical expansion of the outer subventricular zone and the role of neocortical folding in evolution and development. *Front. Hum. Neurosci.* 7:424. doi: 10.3389/fnhum.2013.00424
- Li, K., Leung, A. W., Guo, Q., Yang, W., and Li, J. Y. H. (2014). Shp2-dependent ERK signaling is essential for induction of Bergmann glia and foliation of the cerebellum. *J. Neurosci.* 34, 922–931. doi: 10.1523/jneurosci.3476-13.2014
- Li, Y., Muffat, J., Omer, A., Bosch, I., Lancaster, M. A., Sur, M., et al. (2017). Induction of expansion and folding in human cerebral organoids. *Cell Stem Cell* 20, 385–396.e3. doi: 10.1016/j.stem.2016.11.017
- Liu, J., Liu, W., Yang, L., Wu, Q., Zhang, H., Fang, A., et al. (2017). The primate-specific gene *TMEM14B* marks outer radial glia cells and promotes cortical expansion and folding. *Cell Stem Cell* 21, 635–649.e8. doi: 10.1016/j.stem.2017.08.013
- Long, K. R., Newland, B., Florio, M., Kalebic, N., Langen, B., Kolterer, A., et al. (2018). Extracellular matrix components HAPLN1, lumican, and collagen I cause hyaluronic acid-dependent folding of the developing human neocortex. *Neuron* 99, 702–719.e6. doi: 10.1016/j.neuron.2018.07.013
- Loulier, K., Lathia, J. D., Marthiens, V., Relucio, J., Mughal, M. R., Tang, S. C., et al. (2009). beta1 integrin maintains integrity of the embryonic neocortical stem cell niche. *PLoS Biol.* 7:e1000176. doi: 10.1371/journal.pbio.1000176
- Lui, J. H., Hansen, D. V., and Kriegstein, A. R. (2011). Development and evolution of the human neocortex. *Cell* 146, 18–36. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.030
- Lui, J. H., Nowakowski, T. J., Pollen, A. A., Javaherian, A., Kriegstein, A. R., and Oldham, M. C. (2014). Radial glia require PDGFR $\beta$ -PDGFR $\beta$  signalling in human but not mouse neocortex. *Nature* 515, 264–268. doi: 10.1038/nature13973
- Machol, K., Rousseau, J., Ehresmann, S., Garcia, T., Tuyet, T., Nguyen, M., et al. (2019). Expanding the spectrum of BAF-related disorders: de novo variants in *SMARCC2* cause a syndrome with intellectual disability and developmental delay. *Am. J. Hum. Genet.* 104, 164–178. doi: 10.1016/j.ajhg.2018.11.007
- Malatesta, P., Hack, M. A., Hartfuss, E., Kettenmann, H., Klinkert, W., Kirchhoff, F., et al. (2003). Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* 37, 751–764.
- Manuel, M. N., Mi, D., Mason, J. O., and Price, D. J. (2015). Regulation of cerebral cortical neurogenesis by the Pax6 transcription factor. *Front. Cell. Neurosci.* 9:70. doi: 10.3389/fncel.2015.00070
- Marsoner, F., Koch, P., and Ladewig, J. (2018). Cortical organoids: why all this hype? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 52, 22–28. doi: 10.1016/j.gde.2018.04.008
- Martinez-Cerdeño, V., Cunningham, C. L., Camacho, J., Antczak, J. L., Prakash, A. N., Cziep, M. E., et al. (2012). Comparative analysis of the subventricular zone in rat, ferret and macaque: evidence for an outer subventricular zone in rodents. *PLoS One* 7:e30178. doi: 10.1371/journal.pone.0030178
- Martinez-cerdeño, V., and Noctor, S. C. (2014). Cajal, retzius, and cajal-retzius cells. *Front. Neuroanat.* 8:48. doi: 10.3389/fnana.2014.00048
- Martinez-Martinez, M. Á., De Juan Romero, C., Fernández, V., Cárdenas, A., Götz, M., and Borrell, V. (2016). A restricted period for formation of outer subventricular zone defined by *Cdh1* and *Trnp1* levels. *Nat. Commun.* 7:11812. doi: 10.1038/ncomms11812
- Matsumoto, N., Shinmyo, Y., Ichikawa, Y., and Kawasaki, H. (2017). Gyrfication of the cerebral cortex requires FGF signaling in the mammalian brain. *eLife* 6:e29285. doi: 10.7554/eLife.29285
- Matsumoto, S., Banine, F., Feistel, K., Foster, S., Xing, R., Struve, J., et al. (2016). *Brg1* directly regulates *Olig2* transcription and is required for oligodendrocyte progenitor cell specification. *Dev. Biol.* 413, 173–187. doi: 10.1016/j.ydbio.2016.04.003
- Matsuzaki, F., and Shitamukai, A. (2015). Cell division modes and cleavage planes of neural progenitors during mammalian cortical development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7:a015719. doi: 10.1101/cshperspect.a015719
- Meyer, G., Schaaps, J. P., Moreau, L., and Goffinet, A. M. (2018). Embryonic and early fetal development of the human neocortex. *J. Neurosci.* 20, 1858–1868. doi: 10.1523/jneurosci.20-05-01858.2000

- Miyamoto, Y., Sakane, F., and Hashimoto, K. (2015). N-cadherin-based adherens junction regulates the maintenance, proliferation, and differentiation of neural progenitor cells during development. *Cell Adh. Migr.* 9, 183–192. doi: 10.1080/19336918.2015.1005466
- Mo, Z., and Zecevic, N. (2008). Is Pax6 critical for neurogenesis in the human fetal brain? *Cereb. Cortex* 12, 1455–1465. doi: 10.1093/cercor/bhm181
- Narayanan, R., Pham, L., Kerimoglu, C., Watanabe, T., Hernandez, R. C., Sokpor, G., et al. (2018). Chromatin remodeling BAF155 subunit regulates the genesis of basal progenitors in developing cortex. *iScience* 4, 109–126. doi: 10.1016/j.isci.2018.05.014
- Narayanan, R., Pirouz, M., Kerimoglu, C., Pham, L., Wagener, R. J., Kiszka, K. A., et al. (2015). Loss of BAF (mSWI/SNF) complexes causes global transcriptional and chromatin state changes in forebrain development article loss of BAF (mSWI/SNF) complexes causes global transcriptional and chromatin state changes in forebrain development. *Cell Rep.* 13, 1842–1854. doi: 10.1016/j.celrep.2015.10.046
- Nguyen, H., Sokpor, G., Pham, L., Rosenbusch, J., Stoykova, A., Staiger, J. F., et al. (2016). Epigenetic regulation by BAF (mSWI/SNF) chromatin remodeling complexes is indispensable for embryonic development. *Cell Cycle* 15, 1317–1324. doi: 10.1080/15384101.2016.1160984
- Noctor, S. C., Martínez-Cerdeño, V., and Kriegstein, A. R. (2008). Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical. *J. Comp. Neurol.* 44, 28–44. doi: 10.1002/cne.21669
- Nonaka-Kinoshita, M., Reillo, I., Artegiani, B., Angeles Martínez-Martínez, M., Nelson, M., Borrell, V., et al. (2013). Regulation of cerebral cortex size and folding by expansion of basal progenitors. *EMBO J.* 32, 1817–1828. doi: 10.1038/emboj.2013.96
- Nowakowski, T. J., Bhaduri, A., Pollen, A. A., Alvarado, B., Mostajo-Radji, M. A., Di Lullo, E., et al. (2017). Spatiotemporal gene expression trajectories reveal developmental hierarchies of the human cortex. *Science* 358, 1318–1323. doi: 10.1126/science.aap8809
- Ostrem, B. E. L., Lui, J. H., Gertz, C. C., and Kriegstein, A. R. (2014). Control of outer radial glial stem cell mitosis in the human brain. *Cell Rep.* 8, 656–664. doi: 10.1016/j.celrep.2014.06.058
- Papadopoulos, N., and Lennartsson, J. (2018). The PDGF/PDGFR pathway as a drug target. *Mol. Aspects Med.* 62, 75–88. doi: 10.1016/j.mam.2017.11.007
- Pistolato, F., Chen, H., Schwartz, P. H., Basso, G., and Panchision, D. M. (2007). Oxygen tension controls the expansion of human CNS precursors and the generation of astrocytes and oligodendrocytes. *Mol. Cell. Neurosci.* 35, 424–435. doi: 10.1016/j.mcn.2007.04.003
- Pollen, A. A., Bhaduri, A., Andrews, M. G., Nowakowski, T. J., Meyerson, O. S., Mostajo-Radji, M. A., et al. (2019). Establishing cerebral organoids as models of human-specific brain evolution. *Cell* 176, 743–756.e17. doi: 10.1016/j.cell.2019.01.017
- Pollen, A. A., Nowakowski, T. J., Chen, J., Retallack, H., Sandoval-Espinosa, C., Nicholas, C. R., et al. (2015). Molecular identity of human outer radial glia during cortical development. *Cell* 163, 55–67. doi: 10.1016/j.cell.2015.09.004
- Pollen, A. A., Nowakowski, T. J., Shuga, J., Wang, X., Leyrat, A. A., Lui, J. H., et al. (2014). Low-coverage single-cell mRNA sequencing reveals cellular heterogeneity and activated signaling pathways in developing cerebral cortex. *Nat. Biotechnol.* 32, 1053–1058. doi: 10.1038/nbt.2967
- Pulvers, J. N., Bryk, J., Fish, J. L., Wilsch-Bräuninger, M., Arai, Y., Schreier, D., et al. (2010). Mutations in mouse *Aspm* (abnormal spindle-like microcephaly associated) cause not only microcephaly but also major defects in the germline. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 16595–16600. doi: 10.1073/pnas.1010494107
- Qian, X., Nguyen, H. N., Song, M. M., Hadiono, C., Ogden, S. C., Hammack, C., et al. (2016). Brain-region-specific organoids using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure. *Cell* 165, 1238–1254. doi: 10.1016/j.cell.2016.04.032
- Radakovits, R., Barros, C. S., Belvindrah, R., Patton, B., and Muller, U. (2009). Regulation of radial glial survival by signals from the meninges. *J. Neurosci.* 29, 7694–7705. doi: 10.1523/jneurosci.5537-08.2009
- Reillo, I., De Juan Romero, C., García-Cabezas, M. Á., and Borrell, V. (2011). A Role for intermediate radial glia in the tangential expansion of the mammalian cerebral cortex. *Cereb. Cortex* 21, 1674–1694. doi: 10.1093/cercor/bhq238
- Romero, D. M., Bahi-Buisson, N., and Francis, F. (2018). Genetics and mechanisms leading to human cortical malformations. *Semin. Cell Dev. Biol.* 76, 33–75. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.09.031
- Sekine, K., Kubo, K. I., and Nakajima, K. (2014). How does Reelin control neuronal migration and layer formation in the developing mammalian neocortex? *Neurosci. Res.* 86, 50–58. doi: 10.1016/j.neures.2014.06.004
- Shimada, I. S., Somatilaka, B. N., Hwang, S.-H., Anderson, A. G., Shelton, J. M., Rajaram, V., et al. (2019). Derepression of sonic hedgehog signaling upon Gpr161 deletion unravels forebrain and ventricular abnormalities. *Dev. Biol.* 450, 47–62. doi: 10.1016/j.ydbio.2019.03.011
- Shitamukai, A., Konno, D., and Matsuzaki, F. (2011). Oblique radial glial divisions in the developing mouse neocortex induce self-renewing progenitors outside the germinal zone that resemble primate outer subventricular zone progenitors. *J. Neurosci.* 31, 3683–3695. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4773-10.2011
- Smart, I. H. M., Dehay, C., Giroud, P., Berland, M., and Kennedy, H. (2002). 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. doi: 10.1093/cercor/12.1.37
- Son, E. Y., and Crabtree, G. R. (2014). The role of BAF (mSWI/SNF) complexes in mammalian neural development. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 166C, 333–349. doi: 10.1002/ajmg.c.31416
- Stahl, R., Walcher, T., De Juan Romero, C., Pilz, G. A., Cappello, S., Irmir, M., et al. (2013). Trnp1 regulates expansion and folding of the mammalian cerebral cortex by control of radial glial fate. *Cell* 153, 535–549. doi: 10.1016/j.cell.2013.03.027
- Sun, Y., Liu, W., Liu, T., Feng, X., Yang, N., and Zhou, H. (2015). Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 35, 600–604. doi: 10.3109/10799893.2015.1030412
- Suter, D. M., Tirefort, D., Julien, S., and Krause, K.-H. (2009). A Sox1 to Pax6 switch drives neuroectoderm to radial glia progression during differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 27, 49–58. doi: 10.1634/stemcells.2008-0319
- Tallinen, T., Chung, J. Y., Biggins, J. S., and Mahadevan, L. (2014). Gyrfication from constrained cortical expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 12667–12672. doi: 10.1073/pnas.1406015111
- Tallinen, T., Chung, J. Y., Rousseau, F., Girard, N., Lefèvre, J., and Mahadevan, L. (2016). On the growth and form of cortical convolutions. *Nat. Phys.* 12, 588–593. doi: 10.1038/nphys3632
- Tavano, S., Taverna, E., Kalebic, N., Haffner, C., Namba, T., Dahl, A., et al. (2018). Insm1 induces neural progenitor delamination in developing neocortex via downregulation of the adherens junction belt-specific protein Plekha7. *Neuron* 97, 1299–1314.e8. doi: 10.1016/j.neuron.2018.01.052
- Taverna, E., and Huttner, W. B. (2010). Neural progenitor nuclei IN motion. *Neuron* 67, 906–914. doi: 10.1016/j.neuron.2010.08.027
- Thomsen, E. R., Mich, J. K., Yao, Z., Hodge, R. D., Doyle, A. M., Jang, S., et al. (2015). Fixed single-cell transcriptomic characterization of human radial glial diversity. *Nat. Methods* 13, 87–93. doi: 10.1038/nmeth.3629
- Tsai, L. H., and Gleeson, J. G. (2005). Nucleokinesis in neuronal migration. *Neuron* 46, 383–388. doi: 10.1016/j.neuron.2005.04.013
- Tuoc, T., Dere, E., Radyushkin, K., Pham, L., Nguyen, H., Tonchev, A. B., et al. (2017). Ablation of BAF170 in developing and postnatal dentate gyrus affects neural stem cell proliferation, differentiation, and learning. *Mol. Neurobiol.* 54, 4618–4635. doi: 10.1007/s12035-016-9948-5
- Tuoc, T. C., Boretius, S., Sansom, S. N., Pitulescu, M. E., Frahm, J., Livesey, F. J., et al. (2013a). Chromatin regulation by BAF170 controls cerebral cortical size and thickness. *Dev. Cell* 25, 256–269. doi: 10.1016/j.devcel.2013.04.005
- Tuoc, T. C., Narayanan, R., and Stoykova, A. (2013b). BAF chromatin remodeling complex: cortical size regulation and beyond. *Cell Cycle* 12, 2953–2959. doi: 10.4161/cc.25999
- Uzquiano, A., Gladwyn-Ng, I., Nguyen, L., Reiner, O., Götz, M., Matsuzaki, F., et al. (2018). Cortical progenitor biology: key features mediating proliferation versus differentiation. *J. Neurochem.* 146, 500–525. doi: 10.1111/jnc.14338
- Vaid, S., Camp, J. G., Hersemann, L., Oegema, C. E., Heninger, A., Winkler, S., et al. (2018). A novel population of Hopx-dependent basal radial glial cells in the developing mouse neocortex. *Development* 145:dev169276. doi: 10.1242/dev.169276
- Vierbuchen, T., Ling, E., Cowley, C. J., Harmin, D. A., Roberts, C. W. M., Greenberg, M. E., et al. (2017). AP-1 transcription factors and the BAF complex mediate signal-dependent enhancer selection article AP-1 transcription factors

- and the BAF complex mediate signal-dependent enhancer selection. *Mol. Cell* 68, 1067–1082.e12. doi: 10.1016/j.molcel.2017.11.026
- Wagenführ, L., Meyer, A. K., Braunschweig, L., Marrone, L., and Storch, A. (2015). Brain oxygen tension controls the expansion of outer subventricular zone-like basal progenitors in the developing mouse brain. *Development* 142, 2904–2915. doi: 10.1242/dev.121939
- Wang, L., Hou, S., and Han, Y. G. (2016a). Hedgehog signaling promotes basal progenitor expansion and the growth and folding of the neocortex. *Nat. Neurosci.* 19, 888–896. doi: 10.1038/nn.4307
- Wang, L., Zhou, K., Fu, Z., Yu, D., Huang, H., Zang, X., et al. (2016b). Brain development and akt signaling: the crossroads of signaling pathway and neurodevelopmental diseases. *J. Mol. Neurosci.* 61, 379–384. doi: 10.1007/s12031-016-0872-y
- Wang, X., Tsai, J.-W., LaMonica, B., and Kriegstein, A. R. (2011). A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex. *Nat. Neurosci.* 14, 555–561. doi: 10.1038/nn.2807
- Watanabe, M., Buth, J. E., Vishlaghi, N., de la Torre-Ubieta, L., Taxis, J., Khakh, B. S., et al. (2017). Self-organized cerebral organoids with human-specific features predict effective drugs to combat zika virus infection. *Cell Rep.* 21, 517–532. doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.047
- Wianny, F., Kennedy, H., and Dehay, C. (2018). Bridging the Gap between mechanics and genetics in cortical folding: ECM as a major driving force. *Neuron* 99, 625–627. doi: 10.1016/j.neuron.2018.08.012
- Wong, F. K., Fei, J. F., Mora-Bermúdez, F., Taverna, E., Haffner, C., Fu, J., et al. (2015). Sustained Pax6 expression generates primate-like basal radial glia in developing mouse neocortex. *PLoS Biol.* 13:e1002217. doi: 10.1371/journal.pbio.1002217
- Wu, H., Cheng, X., Jing, X., Ji, X., Chen, X., Zhang, Y., et al. (2018). LIFR promotes tumor angiogenesis by up-regulating IL-8 levels in colorectal. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1864, 2769–2784. doi: 10.1016/j.bbdis.2018.05.004
- Xie, Q., Yang, Y., Huang, J., Ninkovic, J., Walcher, T., Wolf, L., et al. (2013). Pax6 interactions with chromatin and identification of its novel direct target genes in lens and forebrain. *PLoS One* 8:e54507. doi: 10.1371/journal.pone.0054507
- Xie, Y., Castro-hernández, R., Sokpor, G., Pham, L., Narayanan, R., Rosenbusch, J., et al. (2019). RBM15 modulates the function of chromatin remodeling factor BAF155 through RNA methylation in developing cortex. *Mol. Neurobiol.* doi: 10.1007/s12035-019-1595-1 [Epub ahead of print].
- Yap, L. F., Lai, S. L., Patmanathan, S. N., Gokulan, R., Robinson, C. M., White, J. B., et al. (2016). HOPX functions as a tumour suppressor in head and neck cancer. *Sci. Rep.* 6:38758. doi: 10.1038/srep38758
- Yingling, J., Youn, Y. H., Darling, D., Toyo-oka, K., Pramparo, T., Hirotsune, S., et al. (2008). Neuroepithelial stem cell proliferation requires LIS1 for precise spindle orientation and symmetric division. *Cell* 132, 474–486. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.026
- Zecevic, N. (2004). Specific characteristic of radial glia in the human fetal telencephalon. *Glia* 48, 27–35. doi: 10.1002/glia.20044
- Zhang, J., Tian, X., and Xing, J. (2016). Signal transduction pathways of EMT induced by TGF- $\beta$ , SHH, and WNT and their crosstalks. *J. Clin. Med.* 5:E41. doi: 10.3390/jcm5040041
- Zhang, X., Huang, C. T., Chen, J., Pankratz, M. T., Xi, J., Li, J., et al. (2010). Pax6 is a human neuroectoderm cell fate determinant. *Stem Cell* 7, 90–100. doi: 10.1016/j.stem.2010.04.017
- Zhao, B. S., Roundtree, I. A., and He, C. (2016). Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 31–42. doi: 10.1038/nrm.2016.132

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Penisson, Ladewig, Belvindrah and Francis. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## E. Références Bibliographiques

- Aaku-Saraste, E., Hellwig, A., and Huttner, W. B. (1996). Loss of occludin and functional tight junctions, but not ZO-1, during neural tube closure - Remodeling of the neuroepithelium prior to neurogenesis. *Dev. Biol.* 180, 664–679. doi:10.1006/dbio.1996.0336.
- Aaku-Saraste, E., Oback, B., Hellwig, A., and Huttner, W. B. (1997). Neuroepithelial cells downregulate their plasma membrane polarity prior to neural tube closure and neurogenesis. *Mech. Dev.* 69, 71–81. doi:10.1016/S0925-4773(97)00156-1.
- Abbastabar, M., Kheyrollah, M., Azizian, K., Bagherlou, N., Tehrani, S. S., Maniati, M., et al. (2018). Multiple functions of p27 in cell cycle, apoptosis, epigenetic modification and transcriptional regulation for the control of cell growth: A double-edged sword protein. *DNA Repair (Amst)*. doi:10.1016/j.dnarep.2018.07.008.
- Abdallah, Y. M. Y. (2017). History of Medical Imaging. *Arch. Med. Heal. Sci.*, 275-278. doi:10.4103/amhs.amhs.
- Abdollahi, M. R., Morrison, E., Sirey, T., Molnar, Z., Hayward, B. E., Carr, I. M., et al. (2009). Mutation of the Variant  $\alpha$ -Tubulin TUBA8 Results in Polymicrogyria with Optic Nerve Hypoplasia. *Am. J. Hum. Genet.* doi:10.1016/j.ajhg.2009.10.007.
- Abuelo, D. (2007). Microcephaly Syndromes. *Semin. Pediatr. Neurol.* 14, 118–127. doi:10.1016/j.spen.2007.07.003.
- Adams, C. L., Chen, Y. T., Smith, S. J., and Nelson, W. J. (1998). Mechanisms of epithelial cell-cell adhesion and cell compaction revealed by high-resolution tracking of E-cadherin-green fluorescent protein. *J. Cell Biol.* 142, 1105–1119. doi:10.1083/jcb.142.4.1105.
- Agirman, G., Broix, L., and Nguyen, L. (2017). Cerebral cortex development: an outside-in perspective. *FEBS Lett.* 591, 3978–3992. doi:10.1002/1873-3468.12924.
- Akhtar, N. (2008). Wolf-Hirschhorn syndrome. *J. Coll. Physicians Surg. Pakistan*. doi:10.1097/anc.0000000000000116.
- Alcantara, D., Timms, A. E., Gripp, K., Baker, L., Park, K., Collins, S., et al. (2017). Mutations of AKT3 are associated with a wide spectrum of developmental disorders including extreme megalencephaly. *Brain* 140. doi:10.1093/brain/awx203.
- Álvarez-Satta, M., Moreno-Cugnon, L., and Matheu, A. (2019a). Primary cilium and brain aging: role in neural stem cells, neurodegenerative diseases and glioblastoma. *Ageing Res. Rev.* 52, 53–63. doi:10.1016/j.arr.2019.04.004.
- Álvarez-Satta, M., Moreno-Cugnon, L., and Matheu, A. (2019b). Primary cilium and brain aging: role in neural stem cells, neurodegenerative diseases and glioblastoma. *Ageing Res. Rev.* 52, 53–63. doi:10.1016/j.arr.2019.04.004.
- Arai, Y., Pulvers, J. N., Haffner, C., Schilling, B., Nüsslein, I., Calegari, F., et al. (2011). Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nat. Commun.* 2. doi:10.1038/ncomms1155.
- Armatas, V. (2009). Mental Retardation : Definitions , Etiology ,. *J. Sport Heal. Res.* 1, 112–122.
- Arnold, S. J., Huang, G., Cheung, A. F. P., Era, T., Nishikawa, S., Bikoff, E. K., et al. (2008). The T-box transcription factor Eomes/Tbr2 regulates neurogenesis in the cortical subventricular zone. 2479–2484. doi:10.1101/gad.475408.GENES.
- Aypar, E., Yildirim, M. S., Sert, A., Ciftci, I., and Odabas, D. (2011). A girl with metopic synostosis and trisomy 13 mosaicism: Case report and review of the literature. *Am. J. Med. Genet. Part A*.

doi:10.1002/ajmg.a.33839.

- Azevedo, F. A. C., Carvalho, L. R. B., Grinberg, L. T., Farfel, J. M., Ferretti, R. E. L., Leite, R. E. P., et al. (2009). 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.
- Babinet, C., and Cohen-Tannoudji, M. (2001). Genome engineering via homologous recombination in mouse embryonic stem (ES) cells: An amazingly versatile tool for the study of mammalian biology. *An. Acad. Bras. Cienc.* 73. doi:10.1590/S0001-37652001000300007.
- Bahi-Buisson, N., and Cavallin, M. (1993). Tubulinopathies Overview. *GeneReviews*®, 1–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27010057>.
- Bahi-Buisson, N., and Guerrini, R. (2013). *Diffuse malformations of cortical development*. 1st ed. Elsevier B.V. doi:10.1016/B978-0-444-52891-9.00068-3.
- Bahi-Buisson, N., Poirier, K., Fourniol, F., Saillour, Y., Valence, S., Lebrun, N., et al. (2014). The wide spectrum of tubulinopathies: What are the key features for the diagnosis? *Brain*. doi:10.1093/brain/awu082.
- Baird, P. A., and Sadovnick, A. D. (1985). Mental retardation in over half-a-million consecutive livebirths: An epidemiological study. *Am. J. Ment. Defic.* 89, 323–330.
- Barbiero, I., De Rosa, R., and Kilstrup-Nielsen, C. (2019). Microtubules: A key to understand and correct neuronal defects in CDKL5 deficiency disorder? *Int. J. Mol. Sci.* 20. doi:10.3390/ijms20174075.
- Barker-Haliski, M., and Steve White, H. (2015). Glutamatergic mechanisms associated with seizures and epilepsy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5, 1–15. doi:10.1101/cshperspect.a022863.
- Barkovich, A. J. (2010). Current concepts of polymicrogyria. *Neuroradiology* 52, 479–487. doi:10.1007/s00234-009-0644-2.
- Barkovich, A. J., Chuang, S. H., and Norman, D. (1987). MR of neuronal migration anomalies. *Am. J. Roentgenol.* 150, 179–187. doi:10.2214/ajr.150.1.179.
- Barkovich, A. J., Guerrini, R., Kuzniecky, R. I., Jackson, G. D., and Dobyns, W. B. (2012). A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: Update 2012. *Brain* 135, 1348–1369. doi:10.1093/brain/aws019.
- Barkovich, A. J., Kuzniecky, R. I., Dobyns, W. B., Jackson, G. D., Becker, L. E., and Evrard, P. (1996). A classification scheme for malformations of cortical development. *Neuropediatrics*. doi:10.1055/s-2007-973750.
- Barkovich, A. J., Kuzniecky, R. I., Jackson, G. D., Guerrini, R., and Dobyns, W. B. (2005). A developmental and genetic classification for malformations of cortical development. *Neurology*. doi:10.1212/01.wnl.0000183747.05269.2d.
- Baumbach, J., Murthy, A., McClintock, M. A., Dix, C. I., Zalyte, R., Hoang, H. T., et al. (2017). Lissencephaly-1 is a context-dependent regulator of the human dynein complex. *Elife* 6, 1–31. doi:10.7554/eLife.21768.
- Belizário, J. E., Akamini, P., Wolf, P., Strauss, B., and Xavier-Neto, J. (2012). New routes for transgenesis of the mouse. *J. Appl. Genet.* 53. doi:10.1007/s13353-012-0096-y.
- Bellion, A., Baudoin, J. P., Alvarez, C., Bornens, M., and Métin, C. (2005). Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: Forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear. *J. Neurosci.* 25, 5691–5699. doi:10.1523/JNEUROSCI.1030-05.2005.
- Belvindrah, R., Natarajan, K., Shabajee, P., Bruel-Jungerman, E., Bernard, J., Goutierre, M., et al.

- (2017). Mutation of the  $\alpha$ -tubulin Tuba1a leads to straighter microtubules and perturbs neuronal migration. *J. Cell Biol.* 216, 2443–2461. doi:10.1083/jcb.201607074.
- Bergbrede, T., Chuky, N., Schoebel, S., Blankenfeldt, W., Geyer, M., Fuchs, E., et al. (2009). Biophysical analysis of the interaction of Rab6a GTPase with its effector domain. *J. Biol. Chem.* 284. doi:10.1074/jbc.M806003200.
- Bershteyn, M., Nowakowski, T. J., Pollen, A. A., Di Lullo, E., Nene, A., Wynshaw-Boris, A., et al. (2017). Human iPSC-Derived Cerebral Organoids Model Cellular Features of Lissencephaly and Reveal Prolonged Mitosis of Outer Radial Glia. *Cell Stem Cell* 20, 435–449.e4. doi:10.1016/j.stem.2016.12.007.
- Bertipaglia, C., Gonçalves, J. C., and Vallee, R. B. (2017). Nuclear migration in mammalian brain development. *Semin. Cell Dev. Biol.* doi:10.1016/j.semcdb.2017.11.033.
- Betizeau, M., Cortay, V., Patti, D., Pfister, S., Gautier, E., Bellemin-Ménard, A., et al. (2013). Precursor Diversity and Complexity of Lineage Relationships in the Outer Subventricular Zone of the Primate. *Neuron* 80, 442–457. doi:10.1016/j.neuron.2013.09.032.
- Bhabha, G., Johnson, G. T., Schroeder, C. M., and Vale, R. D. (2016). How Dynein Moves Along Microtubules. *Trends Biochem. Sci.* 41, 94–105. doi:10.1016/j.tibs.2015.11.004.
- Bi, W., Sapir, T., Shchelochkov, O. A., Zhang, F., Withers, M. A., Hunter, J. V., et al. (2009). Increased LIS1 expression affects human and mouse brain development. *Nat. Genet.* 41, 168–177. doi:10.1038/ng.302.
- Biasini, F. J., Grupe, L., Huffman, L., and Bray, N. W. (1999). “MENTAL RETARDATION: A SYMPTOM AND A SYNDROME,” in *Comprehensive Textbook of Child and Adolescent Disorders* doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- Blazejewski, S. M., Bennison, S. A., Smith, T. H., and Toyo-oka, K. (2018). Neurodevelopmental genetic diseases associated with microdeletions and microduplications of chromosome 17p13.3. *Front. Genet.* 9, 1–18. doi:10.3389/fgene.2018.00080.
- Boesch, C. (2004). Nobel prizes for nuclear magnetic resonance: 2003 and Historical perspectives. *J. Magn. Reson. Imaging* 20, 177–179. doi:10.1002/jmri.20120.
- Borrell, V. (2019). Recent advances in understanding neocortical development. *F1000Research*. doi:10.12688/f1000research.20332.1.
- Braga, V. L., da Costa, M. D. S., Riera, R., dos Santos Rocha, L. P., de Oliveira Santos, B. F., Matsumura Hondo, T. T., et al. (2018). Schizencephaly: A Review of 734 Patients. *Pediatr. Neurol.* 87, 23–29. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2018.08.001.
- Brenner, M., and Messing, A. (1996). METHODS: A Companion to Methods in GFAP Transgenic Mice. *Enzymology* 10, 351–364.
- Breuss, M., Fritz, T., Gstrein, T., Chan, K., Ushakova, L., Yu, N., et al. (2016). Mutations in the murine homologue of TUBB5 cause microcephaly by perturbing cell cycle progression and inducing p53-associated apoptosis. *Dev.* doi:10.1242/dev.131516.
- Brickman, J. M., and Serup, P. (2017). Properties of embryoid bodies. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* doi:10.1002/wdev.259.
- Buchsbaum, I. Y., and Cappello, S. (2019). Neuronal migration in the CNS during development and disease: Insights from in vivo and in vitro models. *Dev.* 146. doi:10.1242/dev.163766.
- Buckley, C. D., Tan, J., Anderson, K. L., Hanein, D., Volkmann, N., Weis, W. I., et al. (2014). The minimal cadherin-catenin complex binds to actin filaments under force. *Science (80- )*. doi:10.1126/science.1254211.



- Budd, J., and Kisvárdy, Z. (2013). How do you wire a brain? *Front. Neuroanat.* 7, 1–3. doi:10.3389/fnana.2013.00014.
- Budd, J., and Kisvárdy, Z. F. (2012). Communication and Wiring in the Cortical Connectome. *Front. Neuroanat.* 6, 1–59. doi:10.3389/fnana.2012.00042.
- Burgess, S. A., Walker, M. L., Sakakibara, H., Knight, P. J., and Oiwa, K. (2003). Dynein structure and power stroke. *Nature* 421, 715–718. doi:10.1038/nature01377.
- Burgio, G. (2018). Redefining mouse transgenesis with CRISPR/Cas9 genome editing technology. *Genome Biol.* 19. doi:10.1186/s13059-018-1409-1.
- Cahana, A., Escamez, T., Nowakowski, R. S., Hayes, N. L., Giacobini, M. B., Von Holst, A., et al. (2001). Targeted mutagenesis of *Lis1* disrupts cortical development and LIS1 homodimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6429–6434. doi:10.1073/pnas.101122598.
- Cahana, A., Jin, X. L., Reiner, O., Wynshaw-Boris, A., and O'Neill, C. (2003). A study of the nature of embryonic lethality in LIS1-1- mice. *Mol. Reprod. Dev.* 66, 134–142. doi:10.1002/mrd.10339.
- Calegari, F., Haubensak, W., Haffner, C., and Huttner, W. B. (2005). Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development. *J. Neurosci.* 25, 6533–6538. doi:10.1523/JNEUROSCI.0778-05.2005.
- Calegari, F., and Huttner, W. B. (2003). An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. *J. Cell Sci.* 116, 4947–4955. doi:10.1242/jcs.00825.
- Capuano, P., Cialdella, M., and D'addario, V. (2017). Malformations of cortical development. *Donald Sch. J. Ultrasound Obstet. Gynecol.* 11, 308–313. doi:10.5005/jp-journals-10009-1538.
- Cardoso, C., Leventer, R. J., Dowling, J. J., Ward, H. L., Chung, J., Petras, K. S., et al. (2002). Clinical and molecular basis of classical lissencephaly: Mutations in the LIS1 gene (PFAFH1B1). *Hum. Mutat.* 19, 4–15. doi:10.1002/humu.10028.
- Cardoso, C., Leventer, R. J., Matsumoto, N., Julie, K., Ramocki, M. B., Mewborn, S. K., et al. (2000). The location and type of mutation predict malformation severity in isolated lissencephaly caused by abnormalities within the LIS1 gene. *Hum. Mol. Genet.* 9, 3019–3028. doi:10.1093/hmg/9.20.3019.
- Cardoso, C., Leventer, R. J., Ward, H. L., Toyooka, K., Chung, J., Gross, A., et al. (2003). Refinement of a 400-kb critical region allows genotypic differentiation between isolated lissencephaly, Miller-Dieker syndrome, and other phenotypes secondary to deletions of 17p13.3. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 918–930. doi:10.1086/374320.
- Caron, L. (2015). Thomas Willis, the Restoration and the First Works of Neurology. *Med. Hist.* 59. doi:10.1017/mdh.2015.45.
- Caspi, M., Atlas, R., Kantor, A., Sapir, T., and Reiner, O. (2000). Interaction between LIS1 and doublecortin, two lissencephaly gene products. *Hum. Mol. Genet.* doi:10.1093/oxfordjournals.hmg.a018911.
- Caspi, M., Coquelle, F. M., Koifman, C., Levy, T., Arai, H., Aoki, J., et al. (2003). LIS1 missense mutations. Variable phenotypes result from unpredictable alterations in biochemical and cellular properties. *J. Biol. Chem.* 278, 38740–38748. doi:10.1074/jbc.M301147200.
- Cavallin, M., Bijlsma, E. K., El Morjani, A., Moutton, S., Peeters, E. A. J., Maillard, C., et al. (2017). Recurrent KIF2A mutations are responsible for classic lissencephaly. *Neurogenetics.* doi:10.1007/s10048-016-0499-8.
- Chen, H. Y., Albertson, T. E., and Olson, K. R. (2016). Treatment of drug-induced seizures. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 81, 412–419. doi:10.1111/bcp.12720.

- Chen, J. F., Zhang, Y., Wilde, J., Hansen, K. C., Lai, F., and Niswander, L. (2014). Microcephaly disease gene *Wdr62* regulates mitotic progression of embryonic neural stem cells and brain size. *Nat. Commun.* doi:10.1038/ncomms4885.
- Chenn, A., and Walsh, C. A. (2002). Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science (80-. )*. 297, 365–369. doi:10.1126/science.1074192.
- Chenn, A., and Walsh, C. A. (2003). Increased neuronal production, enlarged forebrains and cytoarchitectural distortions in  $\beta$ -catenin overexpressing transgenic mice. *Cereb. Cortex* 13, 599–606. doi:10.1093/cercor/13.6.599.
- Chong, S. S., Pack, S. D., Roschke, A. V., Tanigami, A., Carrozzo, R., Smith, A. C. M., et al. (1997). A revision of the lissencephaly and Miller-Dieker syndrome critical regions in chromosome 17p13.3. *Hum. Mol. Genet.* 6, 147–155. doi:10.1093/hmg/6.2.147.
- Christodoulou, J. A., Walker, L. M., Del Tufo, S. N., Katzir, T., Gabrieli, J. D. E., Whitfield-Gabrieli, S., et al. (2012). Abnormal structural and functional brain connectivity in gray matter heterotopia. *Epilepsia*. doi:10.1111/j.1528-1167.2012.03466.x.
- Cianfrocco, M. A., Desantis, M. E., Leschziner, A. E., and Reck-Peterson, S. L. (2015). Mechanism and Regulation of Cytoplasmic Dynein. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 31, 83–108. doi:10.1146/annurev-cellbio-100814-125438.
- Cockell, M. M., Baumer, K., and Gönczy, P. (2004). *lis-1* is required for dynein-dependent cell division processes in *C. elegans* embryos. *J. Cell Sci.* 117, 4571–4582. doi:10.1242/jcs.01344.
- Coleman, M. P., and Freeman, M. R. (2010). Wallerian Degeneration, Wld S, and Nmnat. *Annu. Rev. Neurosci.* 33, 245–267. doi:10.1146/annurev-neuro-060909-153248.
- Cope, D. W., Di Giovanni, G., Fyson, S. J., Orbán, G., Errington, A. C., Lrincz, M. L., et al. (2009). Enhanced tonic GABA A inhibition in typical absence epilepsy. *Nat. Med.* 15, 1392–1398. doi:10.1038/nm.2058.
- Coquelle, F. M., Caspi, M., Cordelières, F. P., Dompierre, J. P., Dujardin, D. L., Koifman, C., et al. (2002). LIS1, CLIP-170's Key to the Dynein/Dynactin Pathway. *Mol. Cell. Biol.* doi:10.1128/mcb.22.9.3089-3102.2002.
- Croquelois, A., Giuliani, F., Savary, C., Kielar, M., Amiot, C., Schenk, F., et al. (2009). Characterization of the HeCo mutant mouse: A new model of subcortical band heterotopia associated with seizures and behavioral deficits. *Cereb. Cortex* 19, 563–575. doi:10.1093/cercor/bhn106.
- Croquelois, A., and Welker, E. (2007). A new and unique animal model of cortical band heterotopia associated with lowered epileptic seizures threshold: The mouse mutant HeCo. *Clin. Neurophysiol.* doi:10.1016/j.clinph.2006.06.723.
- Curry, C. J., Rosenfeld, J. A., Grant, E., Gripp, K. W., Anderson, C., Aylsworth, A. S., et al. (2013). The duplication 17p13.3 phenotype: Analysis of 21 families delineates developmental, behavioral and brain abnormalities, and rare variant phenotypes. *Am. J. Med. Genet. Part A* 161, 1833–1852. doi:10.1002/ajmg.a.35996.
- D'Arcangelo, G., Miao, G. G., Chen, S. C., Scares, H. D., Morgan, J. I., and Curran, T. (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant *reeler*. *Nature* 374, 719–723. doi:10.1038/374719a0.
- Dambaska, M., Wisniewski, K., and Sher, J. H. (1983). Lissencephaly: two distinct clinico-pathological types. *Brain Dev.* 5, 302–310. doi:10.1016/S0387-7604(83)80023-0.
- Darnell, D., and Gilbert, S. F. (2016). Neuroembryology. *WIREs Dev Biol.* doi:10.1002/wdev.215.
- de Araújo, T. V. B., Ximenes, R. A. de A., Miranda-Filho, D. de B., Souza, W. V., Montarroyos, U.

- R., de Melo, A. P. L., et al. (2018). Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: Final report of a case-control study. *Lancet Infect. Dis.* doi:10.1016/S1473-3099(17)30727-2.
- De Vita, D., Mei, D., Rutigliano, D., Bartalucci, N., Cinnante, C. M., Parrini, E., et al. (2018). Familial dominant epilepsy and mild pachygyria associated with a constitutional LIS1 mutation. *Am. J. Med. Genet. Part A* 176, 2808–2812. doi:10.1002/ajmg.a.40503.
- Dehay, C., and Kennedy, H. (2007). Cell-cycle control and cortical development. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 438–450. doi:10.1038/nrn2097.
- Del Bene, F., Wehman, A. M., Link, B. A., and Baier, H. (2008). Regulation of Neurogenesis by Interkinetic Nuclear Migration through an Apical-Basal Notch Gradient. *Cell* 134, 1055–1065. doi:10.1016/j.cell.2008.07.017.
- Delanty, N., Vaughan, C. J., and French, J. A. (1998). Medical causes of seizures. *Lancet* 352, 383–390. doi:10.1016/S0140-6736(98)02158-8.
- DeMyer, W. (1986). Megalencephaly: Types, clinical syndromes, and management. *Pediatr. Neurol.* 2. doi:10.1016/0887-8994(86)90072-X.
- Dennis, D., Picketts, D., Slack, R. S., and Schuurmans, C. (2016). Forebrain neurogenesis: From embryo to adult. *Trends Dev. Biol.* 9, 77–90.
- Derycke, L. D. M., Bracke, M. E., and Bracke, M. (2004). Ncadherin in the spotlight of cellcell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling Migration and invasion. *Int. J. Dev. Biol* 48, 463476.
- Des Portes, V., Pinard, J. M., Billuart, P., Vinet, M. C., Koulakoff, A., Carrié, A., et al. (1998). A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X- linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. *Cell* 92, 51–61. doi:10.1016/S0092-8674(00)80898-3.
- DeSantis, M. E., Cianfrocco, M. A., Htet, Z. M., Tran, P. T., Reck-Peterson, S. L., and Leschziner, A. E. (2017). Lis1 Has Two Opposing Modes of Regulating Cytoplasmic Dynein. *Cell* 170, 1197–1208.e12. doi:10.1016/j.cell.2017.08.037.
- Desikan, R. S., and Barkovich, J. (2016). Malformations of cortical development. *Ann. Neurol.* 80, 797–810. doi:10.5005/jp-journals-10009-1538.
- Devisme, L., Bouchet, C., Gonzals, M., Alanio, E., Bazin, A., Bessires, B., et al. (2012). Cobblestone lissencephaly: Neuropathological subtypes and correlations with genes of dystroglycanopathies. *Brain* 135, 469–482. doi:10.1093/brain/awr357.
- Di Donato, N., Chiari, S., Mirzaa, G. M., Aldinger, K., Parrini, E., Olds, C., et al. (2017). Lissencephaly: Expanded imaging and clinical classification. *Am. J. Med. Genet. Part A* 173, 1473–1488. doi:10.1002/ajmg.a.38245.
- Di Donato, N., Timms, A. E., Aldinger, K. A., Mirzaa, G. M., Bennett, J. T., Collins, S., et al. (2018). Analysis of 17 genes detects mutations in 81% of 811 patients with lissencephaly. *Genet. Med.* 20, 1354–1364. doi:10.1038/gim.2018.8.
- di Pietro, F., Echard, A., and Morin, X. (2016). Regulation of mitotic spindle orientation: an integrated view. *EMBO Rep.* 17, 1106–1130. doi:10.15252/embr.201642292.
- Dobyns, W. B., and Mirzaa, G. M. (2019). Megalencephaly syndromes associated with mutations of core components of the PI3K-AKT-MTOR pathway: PIK3CA, PIK3R2, AKT3, and MTOR. *Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet.* 181, 582–590. doi:10.1002/ajmg.c.31736.
- Dobyns, W. B., Reiner, O., Carrozzo, R., and Ledbetter, D. H. (1993). Lissencephaly: A Human Brain Malformation Associated With Deletion of the LIS1 Gene Located at Chromosome 17p13. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 270, 2838–2842. doi:10.1001/jama.270.23.2838.

- Dobyns, W. B., Stratton, R. F., and Greenberg, F. (1984). Syndromes with lissencephaly. I: Miller-Dieker and Norman-Roberts syndromes and isolated lissencephaly. *Am. J. Med. Genet.* 18, 509–526. doi:10.1002/ajmg.1320180320.
- Dobyns, W. B., Stratton, R. F., Parke, J. T., Greenberg, F., Nussbaum, R. L., and Ledbetter, D. H. (1983). Miller-Dieker syndrome: Lissencephaly and monosomy 17p. *J. Pediatr.* 102, 552–558. doi:10.1016/S0022-3476(83)80183-8.
- Doetschman, T., and Georgieva, T. (2017). Gene Editing with CRISPR/Cas9 RNA-Directed Nuclease. *Circ. Res.* 120, 876–894. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309727.
- Dooms, G. C., Hecht, S., and Brant-Zawadski, M. (1986). Brain radiation lesions: MR imaging. *Radiology.* doi:10.1148/radiology.158.1.3940373.
- Doyle, A., McGarry, M. P., Lee, N. A., and Lee, J. J. (2012). The construction of transgenic and gene knockout/knockin mouse models of human disease. *Transgenic Res.* 21, 327–349. doi:10.1007/s11248-011-9537-3.
- Durak, O., Gao, F., Kaeser-Woo, Y. J., Rueda, R., Martorell, A. J., Nott, A., et al. (2016). Chd8 mediates cortical neurogenesis via transcriptional regulation of cell cycle and Wnt signaling. *Nat. Neurosci.* doi:10.1038/nn.4400.
- Edelman, R. R. (2014). The History of MR Imaging as Seen through the Pages of Radiology. 273, 181–200.
- Edmondson, J. C., and Hatten, M. E. (1987). Glial-guided granule neuron migration in vitro: A high-resolution time-lapse video microscopic study. *J. Neurosci.* 7, 1928–1934. doi:10.1523/jneurosci.07-06-01928.1987.
- Egan, M. J., Tan, K., and Reck-Peterson, S. L. (2012). Lis1 is an initiation factor for dynein-driven organelle transport. *J. Cell Biol.* 197, 971–982. doi:10.1083/jcb.201112101.
- Elias, L. A. B., Wang, D. D., and Kriegstein, A. R. (2007). Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature.* doi:10.1038/nature06063.
- Endo, T. (2015). Glycobiology of  $\alpha$ -dystroglycan and muscular dystrophy. *J. Biochem.* doi:10.1093/jb/mvu066.
- Englund, C., Fink, A., Lau, C., Pham, D., Daza, R. A. M., Bulfone, A., et al. (2005). Pax6, Tbr2, and Tbr1 Are Expressed Sequentially by Radial Glia, Intermediate Progenitor Cells, and Postmitotic Neurons in Developing Neocortex. *J. Neurosci.* 25, 247–251. doi:10.1523/JNEUROSCI.2899-04.2005.
- Escayg, A., MacDonald, B. T., Meisler, M. H., Baulac, S., Huberfeld, G., An-Gourfinkel, I., et al. (2000). Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nat. Genet.* doi:10.1521/00332747.1963.11023367.
- Faizan, M. I., Abdullah, M., Ali, S., Naqvi, I. H., Ahmed, A., and Parveen, S. (2017). Zika Virus-Induced Microcephaly and Its Possible Molecular Mechanism. *Intervirology.* doi:10.1159/000452950.
- Falconer, D. S. (1951). Two new mutants, “trembler” and “reeler”, with neurological actions in the house mouse (*Mus musculus* L.). *J. Genet.* doi:10.1007/BF02996215.
- Fallil, Z., Pardoe, H., Bachman, R., Cunningham, B., Parulkar, I., Shain, C., et al. (2015). Phenotypic and imaging features of FLNA-negative patients with bilateral periventricular nodular heterotopia and epilepsy. *Epilepsy Behav.* 51, 321–327. doi:10.1016/j.yebeh.2015.07.041.
- Faravelli, F., D’Arrigo, S., Bagnasco, I., Selicorni, A., D’Incerti, L., Riva, D., et al. (2002). Oligoeyric microcephaly in a child with Williams syndrome. *Am. J. Med. Genet. Part A.* doi:10.1002/ajmg.a.10892.

- Farkas, L. M., and Huttner, W. B. (2008). The cell biology of neural stem and progenitor cells and its significance for their proliferation versus differentiation during mammalian brain development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 707–715. doi:10.1016/j.ceb.2008.09.008.
- Faulkner, N. E., Dujardin, D. L., Tai, C. Y., Vaughan, K. T., O'connell, C. B., Wang, Y. L., et al. (2000). A role for the lissencephaly gene *Lis1* in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nat. Cell Biol.* 2, 784–791. doi:10.1038/35041020.
- Faux, C., Rakic, S., Andrews, W., and Britto, J. M. (2012). Neurons on the move: Migration and lamination of cortical interneurons. *NeuroSignals* 20, 168–189. doi:10.1159/000334489.
- Feil, S., Valtcheva, N., and Feil, R. (2009). Inducible cre mice. *Methods Mol. Biol.* doi:10.1007/978-1-59745-471-1\_18.
- Fietz, S. A., Kelava, I., Vogt, J., Wilsch-Bräuninger, M., Stenzel, D., Fish, J. L., et al. (2010). OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. *Nat. Neurosci.* 13, 690–699. doi:10.1038/nn.2553.
- Finucane, B., Haas-Givler, B., and Simon, E. W. (2003). Genetics, Mental Retardation, and the Forging of New Alliances. *Am. J. Med. Genet. Part C* 117, 204–66–72. doi:10.1002/ajmg.10021.
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., et al. (2014). ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55, 475–482. doi:10.1111/epi.12550.
- Fisher, R. S., Van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., et al. (2005). Epileptic seizures and Epilepsy: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE) [4]. *Epilepsia* 46, 1701–1702. doi:10.1111/j.1528-1167.2005.00273\_4.x.
- Fleck, M. W., Hirotsune, S., Gambello, M. J., Phillips-Tansey, E., Soares, G., Mervis, R. F., et al. (2000). Hippocampal abnormalities and enhanced excitability in a murine model of human lissencephaly. *J. Neurosci.* 20, 2439–2450. doi:10.1523/jneurosci.20-07-02439.2000.
- Florio, M., Albert, M., Taverna, E., Namba, T., Brandl, H., Lewitus, E., et al. (2015). Human-specific gene *ARHGAP11B* promotes basal progenitor amplification and neocortex expansion. *Science* (80-. ). 347, 1465–1470. doi:10.1126/science.aaa1975.
- Florio, M., and Huttner, W. B. (2014). Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. *Development* 141, 2182–2194. doi:10.1242/dev.090571.
- Fogli, A., Guerrini, R., Moro, F., Fernandez-Alvarez, E., Livet, M. O., Renieri, A., et al. (1999). Intracellular levels of the *LIS1* protein correlate with clinical and neuroradiological findings in patients with classical lissencephaly. *Ann. Neurol.* 45, 154–161. doi:10.1002/1531-8249(199902)45:2<154::AID-ANA4>3.0.CO;2-P.
- Foster, A., Zachariou, A., Loveday, C., Ashraf, T., Blair, E., Clayton-Smith, J., et al. (2019). The phenotype of Sotos syndrome in adulthood: A review of 44 individuals. *Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet.* 181, 502–508. doi:10.1002/ajmg.c.31738.
- Francis, F., Koulakoff, A., Boucher, D., Chafey, P., Schaar, B., Vinet, M. C., et al. (1999). Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron.* doi:10.1016/S0896-6273(00)80777-1.
- Francis, F., Meyer, G., Fallet-bianco, C., Moreno, S., and Kappeler, C. (2006). Human disorders of cortical development : from past to present. 23, 877–893. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04649.x.
- Frittoli, E., Palamidessi, A., Pizzigoni, A., Lanzetti, L., Garrè, M., Troglia, F., et al. (2008). The primate-specific protein *TBC1D3* is required for optimal macropinocytosis in a novel *ARF6*-

- dependent pathway. *Mol. Biol. Cell*. doi:10.1091/mbc.E07-06-0594.
- Fujikura, K., Setsu, T., Tanigaki, K., Abe, T., Kiyonari, H., Terashima, T., et al. (2013). Kif14 Mutation Causes Severe Brain Malformation and Hypomyelination. *PLoS One* 8, 1–17. doi:10.1371/journal.pone.0053490.
- Fujimori, A., Itoh, K., Goto, S., Hirakawa, H., Wang, B., Kokubo, T., et al. (2014). Disruption of *Aspm* causes microcephaly with abnormal neuronal differentiation. *Brain Dev.* 36, 661–669. doi:10.1016/j.braindev.2013.10.006.
- Gambello, M. J., Darling, D. L., Yingling, J., Tanaka, T., Gleeson, J. G., and Wynshaw-Boris, A. (2003). Multiple Dose-Dependent Effects of *Lis1* on Cerebral Cortical Development.
- Garcia-Higuera, I., Fenoglio, J., Li, Y., Lewis, C., Panchenko, M. P., Reiner, O., et al. (1996). Folding of proteins with WD-repeats: Comparison of six members of the WD-repeat superfamily to the G protein  $\beta$  subunit. *Biochemistry*. doi:10.1021/bi9612879.
- Gerlitz, G., Darhin, E., Giorgio, G., Franco, B., and Reiner, O. (2005). Novel functional features of the Lis-H domain: Role in protein dimerization, half-life and cellular localization. *Cell Cycle* 4, 1632–1640. doi:10.4161/cc.4.11.2151.
- Gertz, C. C., Lui, J. H., LaMonica, B. E., Wang, X., and Kriegstein, A. R. (2014). Diverse Behaviors of Outer Radial Glia in Developing Ferret and Human Cortex. *J. Neurosci.* 34, 2559–2570. doi:10.1523/JNEUROSCI.2645-13.2014.
- Giannandrea, M., Bianchi, V., Mignogna, M. L., Sirri, A., Carrabino, S., D’Elia, E., et al. (2010). Mutations in the Small GTPase Gene *RAB39B* Are Responsible for X-linked Mental Retardation Associated with Autism, Epilepsy, and Macrocephaly. *Am. J. Hum. Genet.* doi:10.1016/j.ajhg.2010.01.011.
- Gilmore, E. G., and Herrup, K. (1997). Cortical development: Layers of complexity. *Curr. Biol.* 7, 231–234. doi:10.1016/s0960-9822(06)00108-4.
- Girard, N., Koob, M., and Brunel, H. (2016). Normal development. *Handb. Clin. Neurol.* 136, 1091–1119. doi:10.1016/B978-0-444-53486-6.00057-0.
- Gorlin, R. J., Cohen, M. M., Condon, L. M., and Burke, B. A. (1992). Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome. *Am. J. Med. Genet.* doi:10.1002/ajmg.1320440309.
- Gorski, J. A., Talley, T., Qiu, M., Puellas, L., Rubenstein, J. L. R., and Jones, K. R. (2002). Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the *Emx1*-expressing lineage. *J. Neurosci.* 22, 6309–6314. doi:10.1523/jneurosci.22-15-06309.2002.
- Götz, M., and Huttner, W. B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 777–788. doi:10.1038/nrm1739.
- Götz, M., Stoykova, A., and Gruss, P. (1998). Pax6 Controls Radial Glia Differentiation. *Neuron* 21, 1031–1044.
- Greene, N. D. E., and Copp, A. J. (2014). Neural Tube Defects NTDs: Neural tube defects. *Annu. Rev. Neurosci.* 37, 221–242. doi:10.1146/annurev-neuro-062012-170354.
- Gruber, R., Zhou, Z., Sukchev, M., Joerss, T., Frappart, P. O., and Wang, Z. Q. (2011). MCPH1 regulates the neuroprogenitor division mode by coupling the centrosomal cycle with mitotic entry through the Chk1-Cdc25 pathway. *Nat. Cell Biol.* doi:10.1038/ncb2342.
- Guarnieri, F. C., De Chevigny, A., Falace, A., and Cardoso, C. (2018). Disorders of neurogenesis and cortical development. *Dialogues Clin. Neurosci.* 20, 255–266. doi:10.31887/dcns.2018.20.4/ccardoso.
- Guerrini, R., and Dobyns, W. B. (2014). Malformations of cortical development: Clinical features and

- genetic causes. *Lancet Neurol.* 13, 710–726. doi:10.1016/S1474-4422(14)70040-7.
- Guerrini, R., Dobyns, W. B., and Barkovich, A. J. (2008). Abnormal development of the human cerebral cortex: genetics, functional consequences and treatment options. *Trends Neurosci.* 31, 154–162. doi:10.1016/j.tins.2007.12.004.
- Guerrini, R., and Parrini, E. (2010). Neuronal migration disorders. *Neurobiol. Dis.* 38, 154–166. doi:10.1016/j.nbd.2009.02.008.
- Gurumurthy, C. B., and Kent Lloyd, K. C. (2019). Generating mouse models for biomedical research: Technological advances. *DMM Dis. Model. Mech.* 12. doi:10.1242/dmm.029462.
- Gutierrez, P. A., Ackermann, B. E., Vershinin, M., and McKenney, R. J. (2017). Differential effects of the dynein-regulatory factor Lissencephaly-1 on processive dynein-dynactin motility. *J. Biol. Chem.* 292, 12245–12255. doi:10.1074/jbc.M117.790048.
- Guy, J., and Staiger, J. F. (2017). The functioning of a cortex without layers. *Front. Neuroanat.* 11, 1–13. doi:10.3389/fnana.2017.00054.
- Haimes, A. B., Zimmerman, R. D., Morgello, S., Weingarten, K., Becker, R. D., Jennis, R., et al. (1989). MR imaging of brain abscesses. *Am. J. Roentgenol.* doi:10.2214/ajr.152.5.1073.
- Hansen, D. V., Lui, J. H., Parker, P. R. L., and Kriegstein, A. R. (2010). Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature* 464, 554–561. doi:10.1038/nature08845.
- Harding, B. N., Moccia, A., Drunat, S., Soukariéh, O., Tubeuf, H., Chitty, L. S., et al. (2016). Mutations in Citron Kinase Cause Recessive Microlissencephaly with Multinucleated Neurons. *Am. J. Hum. Genet.* doi:10.1016/j.ajhg.2016.07.003.
- Harland, R. (2000). Neural induction. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 357–362. doi:10.1016/S0959-437X(00)00096-4.
- Hatanaka, Y., Zhu, Y., Torigoe, M., Kita, Y., and Murakami, F. (2016). From migration to settlement: the pathways, migration modes and dynamics of neurons in the developing brain. *Proc. Japan Acad. Ser. B* 92, 1–19. doi:10.2183/pjab.92.1.
- Hatten, M. E., and Mason, C. A. (1990). Mechanisms of glial-guided neuronal migration in vitro and in vivo. *Experientia.* doi:10.1007/BF01939383.
- Hattori, M., Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H., and Inoue, K. (1994). Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor. *Nature.* doi:10.1038/370216a0.
- Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W., and Huttner, W. B. (2004). Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: A major site of neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3196–3201. doi:10.1073/pnas.0308600100.
- Haverfield, E. V., Whited, A. J., Petras, K. S., Dobyns, W. B., and Das, S. (2009). Intragenic deletions and duplications of the LIS1 and DCX genes: A major disease-causing mechanism in lissencephaly and subcortical band heterotopia. *Eur. J. Hum. Genet.* 17, 911–918. doi:10.1038/ejhg.2008.213.
- He, Z., Tian, T., Guo, D., Wu, H., Chen, Y., Zhang, Y., et al. (2014). Cytoplasmic retention of a nucleocytoplasmic protein TBC1D3 by microtubule network is required for enhanced EGFR signaling. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0094134.
- Hemmati-Brivanlou, A., and Melton, D. (1997). Vertebrate Neural Induction. *Annu. Rev. Neurosci.* 20, 43–60. doi:10.1146/annurev.neuro.20.1.43.
- Hendel, A., Bak, R. O., Clark, J. T., Kennedy, A. B., Ryan, D. E., Roy, S., et al. (2015). Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nat. Biotechnol.* 33, 985–989. doi:10.1038/nbt.3290.

- Heng, X., Guo, Q., Leung, A. W., and Li, J. Y. H. (2017). Analogous mechanism regulating formation of neocortical basal radial glia and cerebellar Bergmann glia. *Elife* 6, 1–30. doi:10.7554/eLife.23253.
- Herculano-Houzel, S. (2009). The human brain in numbers: A linearly scaled-up primate brain. *Front. Hum. Neurosci.* 3, 1–11. doi:10.3389/neuro.09.031.2009.
- Herculano-Houzel, S., Catania, K., Manger, P. R., and Kaas, J. H. (2015). Mammalian Brains Are Made of These: A Dataset of the Numbers and Densities of Neuronal and Nonneuronal Cells in the Brain of Glires, Primates, Scandentia, Eulipotyphlans, Afrotherians and Artiodactyls, and Their Relationship with Body Mass. *Brain. Behav. Evol.* 86, 145–163. doi:10.1159/000437413.
- Herculano-Houzel, S., Mota, B., and Lent, R. (2006). Cellular scaling rules for rodent brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12138–12143. doi:10.1073/pnas.0604911103.
- Heron, S. E., Phillips, H. A., Mulley, J. C., Mazarib, A., Neufeld, M. Y., Berkovic, S. F., et al. (2004). Genetic Variation of CACNA1H in Idiopathic Generalized Epilepsy [1]. *Ann. Neurol.* 55, 595–596. doi:10.1002/ana.20028.
- Hesselink, J. R., Dowd, C. F., Healy, M. E., Hajek, P., Baker, L. L., and Luerssen, T. G. (1988). MR imaging of brain contusions: A comparative study with CT. *Am. J. Neuroradiol.*
- Hessenbruch, A. (2002). A brief history of x-rays. *Endeavour* 26, 137–141. doi:10.1016/S0160-9327(02)01465-5.
- Hevner, R. F. (2019). Intermediate progenitors and Tbr2 in cortical development. *J. Anat.* 235, 616–625. doi:10.1111/joa.12939.
- Hinsch, K., and Zupanc, G. K. H. (2007). Generation and long-term persistence of new neurons in the adult zebrafish brain: A quantitative analysis. *Neuroscience* 146, 679–696. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.01.071.
- Hirotsune, S., Fleck, M. W., Gambello, M. J., Bix, G. J., Chen, A., Clark, G. D., et al. (1998). Graded reduction of Pafah1b1 (Lis1) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Nat. Genet.* 19, 333–339. doi:10.1038/1221.
- Hodzic, D., Kong, C., Wainszelbaum, M. J., Charron, A. J., Su, X., and Stahl, P. D. (2006). TBC1D3, a hominoid oncoprotein, is encoded by a cluster of paralogues located on chromosome 17q12.88, 731–736. doi:10.1016/j.ygeno.2006.05.009.
- Horn, Z., Behesti, H., and Hatten, M. E. (2018). N-cadherin provides a cis and trans ligand for astrotactin that functions in glial-guided neuronal migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.1811100115.
- Hou, Y., and Witman, G. B. (2015). Dynein and intraflagellar transport. *Exp. Cell Res.* doi:10.1016/j.yexcr.2015.02.017.
- Howard, B. M., Mo, Z., Filipovic, R., Moore, A. R., Antic, S. D., and Zecevic, N. (2008). Radial glia cells in the developing human brain. *Neuroscientist* 14, 459–473. doi:10.1177/1073858407313512.
- Htet, Z. M., Gillies, J. P., Baker, R. W., Leschziner, A. E., DeSantis, M. E., and Reck-Peterson, S. L. (2020). LIS1 promotes the formation of activated cytoplasmic dynein-1 complexes. *Nat. Cell Biol.* 22, 518–525. doi:10.1038/s41556-020-0506-z.
- Huang, J., Roberts, A. J., Leschziner, A. E., and Reck-Peterson, S. L. (2012). Lis1 acts as a “clutch” between the ATPase and microtubule-binding domains of the dynein motor. *Cell* 150, 975–986. doi:10.1016/j.cell.2012.07.022.
- Huttner, W. B., and Kosodo, Y. (2005). Symmetric versus asymmetric cell division during neurogenesis in the developing vertebrate central nervous system. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17,



648–657. doi:10.1016/j.ceb.2005.10.005.

- Iacopetti, P., Michelini, M., Stuckmann, I., Oback, B., Aaku-Saraste, E., and Huttner, W. B. (1999). Expression of the antiproliferative gene TIS21 at the onset of neurogenesis identifies single neuroepithelial cells that switch from proliferative to neuron-generating division. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 4639–4644. doi:10.1073/pnas.96.8.4639.
- Iefremova, V., Manikakis, G., Krefft, O., Jabali, A., Weynans, K., Wilkens, R., et al. (2017). An Organoid-Based Model of Cortical Development Identifies Non-Cell-Autonomous Defects in Wnt Signaling Contributing to Miller-Dieker Syndrome. *Cell Rep.* 19, 50–59. doi:10.1016/j.celrep.2017.03.047.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 412, 565–566. doi:10.1038/35087627.
- Ishii, H., Baffa, R., Numata, S. I., Murakumo, Y., Rattan, S., Inoue, H., et al. (1999). The FEZ1 gene at chromosome 8p22 encodes a leucine-zipper protein, and its expression is altered in multiple human tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3928–3933. doi:10.1073/pnas.96.7.3928.
- Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., et al. (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol. Med.* doi:10.1007/BF03401776.
- Jackson, A. P., Eastwood, H., Bell, S. M., Adu, J., Toomes, C., Carr, I. M., et al. (2002). Identification of microcephalin, a protein implicated in determining the size of the human brain. *Am. J. Hum. Genet.* doi:10.1086/341283.
- Jaglin, X. H., Poirier, K., Saillour, Y., Buhler, E., Tian, G., Bahi-Buisson, N., et al. (2009). Mutations in the B-tubulin gene TUBB2B result in asymmetrical polymicrogyria. *Nat. Genet.* doi:10.1038/ng.380.
- Jansen, L. A., Mirzaa, G. M., Ishak, G. E., O’Roak, B. J., Hiatt, J. B., Roden, W. H., et al. (2015). PI3K/AKT pathway mutations cause a spectrum of brain malformations from megalencephaly to focal cortical dysplasia. *Brain* 138, 1613–1628. doi:10.1093/brain/awv045.
- Jha, R., Roostalu, J., Cade, N. I., Trokter, M., and Surrey, T. (2017). Combinatorial regulation of the balance between dynein microtubule end accumulation and initiation of directed motility. *EMBO J.* 36, 3387–3404. doi:10.15252/embj.201797077.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* (80-. ). doi:10.1126/science.1225829.
- Jinnou, H., Sawada, M., Kawase, K., Kaneko, N., Herranz-Pérez, V., Miyamoto, T., et al. (2018). Radial Glial Fibers Promote Neuronal Migration and Functional Recovery after Neonatal Brain Injury. *Cell Stem Cell* 22, 128–137.e9. doi:10.1016/j.stem.2017.11.005.
- Johnson, I. R., Symonds, E. M., Kean, D. M., Worthington, B. S., Pipkin, F. B., Hawkes, R. C., et al. (1984). Imaging the pregnant human uterus with nuclear magnetic resonance. *Am. J. Obstet. Gynecol.* doi:10.1016/0002-9378(84)90642-2.
- Johnson, M. B., Sun, X., Kodani, A., Borges-monroy, R., Girsakis, K. M., Patel, K., et al. (2018). Aspm knockout ferret reveals an evolutionary mechanism governing cerebral cortical size.
- Johnson, M. B., Wang, P. P., Atabay, K. D., Murphy, E. A., Doan, R. N., Hecht, J. L., et al. (2015). Single-cell analysis reveals transcriptional heterogeneity of neural progenitors in human cortex. *Nat. Neurosci.* 18, 637–646. doi:10.1038/nn.3980.
- Jones, E. G. (2009). The origins of cortical interneurons: Mouse versus monkey and human. *Cereb. Cortex.* doi:10.1093/cercor/bhp088.

- Ju, X. C., Hou, Q. Q., Sheng, A. L., Wu, K. Y., Zhou, Y., Jin, Y., et al. (2016). The hominoid-specific gene TBC1D3 promotes generation of basal neural progenitors and induces cortical folding in mice. *Elife* 5, 1–25. doi:10.7554/eLife.18197.
- Junghans, D., Hack, I., Frotscher, M., Taylor, V., and Kemler, R. (2005).  $\beta$ -catenin-mediated cell-adhesion is vital for embryonic forebrain development. in *Developmental Dynamics* doi:10.1002/dvdy.20365.
- Kadoshima, T., Sakaguchi, H., Nakano, T., Soen, M., Ando, S., Eiraku, M., et al. (2013). Self-organization of axial polarity, inside-outside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 20284–20289. doi:10.1073/pnas.1315710110.
- Kadowaki, M., Nakamura, S., Machon, O., Krauss, S., Radice, G. L., and Takeichi, M. (2007). N-cadherin mediates cortical organization in the mouse brain. *Dev. Biol.* 304, 22–33. doi:10.1016/j.ydbio.2006.12.014.
- Kalebic, N., Gilardi, C., Albert, M., Namba, T., Long, K. R., Kostic, M., et al. (2018). Human-specific ARHGAP11B induces hallmarks of neocortical expansion in developing ferret neocortex. *Elife* 7, 395830. doi:10.7554/eLife.41241.
- Kaneko, N., Sawada, M., and Sawamoto, K. (2017). Mechanisms of neuronal migration in the adult brain. *J. Neurochem.* 141, 835–847. doi:10.1111/jnc.14002.
- Karimian, A., Ahmadi, Y., and Yousefi, B. (2016). Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. doi:10.1016/j.dnarep.2016.04.008.
- Kato, M. (2003). Lissencephaly and the molecular basis of neuronal migration. *Hum. Mol. Genet.* 12, 89R–96. doi:10.1093/hmg/ddg086.
- Katsuyama, Y., and Terashima, T. (2009). Developmental anatomy of reeler mutant mouse. *Dev. Growth Differ.* 51, 271–286. doi:10.1111/j.1440-169X.2009.01102.x.
- Kawaguchi, A., Ikawa, T., Kasukawa, T., Ueda, H. R., Kurimoto, K., Saitou, M., et al. (2008). Single-cell gene profiling defines differential progenitor subclasses in mammalian neurogenesis. *Development* 135, 3113–3124. doi:10.1242/dev.022616.
- Kawaue, T., Shitamukai, A., Nagasaka, A., Tsunekawa, Y., Shinoda, T., Saito, K., et al. (2019). Lzts1 controls both neuronal delamination and outer radial glial-like cell generation during mammalian cerebral development. *Nat. Commun.* 10, 2780. doi:10.1038/s41467-019-10730-y.
- Kelava, I., Reillo, I., Murayama, A. Y., Kalinka, A. T., Stenzel, D., Tomancak, P., et al. (2012). Abundant occurrence of basal radial glia in the subventricular zone of embryonic neocortex of a lissencephalic primate, the common marmoset callithrix jacchus. *Cereb. Cortex* 22, 469–481. doi:10.1093/cercor/bhr301.
- Kengaku, M. (2018). Cytoskeletal control of nuclear migration in neurons and non-neuronal cells. *Proc. Japan Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 94, 337–349. doi:10.2183/pjab.94.022.
- Keppler-Noreuil, K. M., Rios, J. J., Parker, V. E. R., Semple, R. K., Lindhurst, M. J., Sapp, J. C., et al. (2015). PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS): Diagnostic and testing eligibility criteria, differential diagnosis, and evaluation. *Am. J. Med. Genet. Part A* 167. doi:10.1002/ajmg.a.36836.
- Kerstein, P. C., Nichol, R. H., and Gomez, T. M. (2015). Mechanochemical regulation of growth cone motility. *Front. Cell. Neurosci.* doi:10.3389/fncel.2015.00244.
- Khalaf-Nazzal, R., Stouffer, M. A., Olaso, R., Muresan, L., Roumegous, A., Lavilla, V., et al. (2017). Early born neurons are abnormally positioned in the doublecortin knockout hippocampus. *Hum. Mol. Genet.* 26, 90–108. doi:10.1093/hmg/ddw370.

- Khoo, H. M., von Ellenrieder, N., Zazubovits, N., Hall, J. A., Dubeau, F., and Gotman, J. (2019). Internodular functional connectivity in heterotopia-related epilepsy. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* doi:10.1002/acn3.769.
- Kielar, M., Phan Dinh Tuy, F., Bizzotto, S., Lebrand, C., de Juan Romero, C., Poirier, K., et al. (2014). Mutations in *Eml1* lead to ectopic progenitors and neuronal heterotopia in mouse and human. *Nat. Neurosci.* 17. doi:10.1038/nn.3729.
- Kim, D., Xing, T., Yang, Z., Dudek, R., Lu, Q., and Chen, Y.-H. (2017). Epithelial Mesenchymal Transition in Embryonic Development, Tissue Repair and Cancer: A Comprehensive Overview. *J. Clin. Med.* 7, 1. doi:10.3390/jcm7010001.
- Kim, M. H., Cooper, D. R., Oleksy, A., Devedjiev, Y., Derewenda, U., Reiner, O., et al. (2004). The structure of the N-terminal domain of the product of the lissencephaly gene *Lis1* and its functional implications. *Structure* 12, 987–998. doi:10.1016/j.str.2004.03.024.
- Kinnier Wilson, J. V., and Reynolds, E. H. (1990). TRANSLATION AND ANALYSIS OF A CUNEIFORM TEXT FORMING PART OF A BABYLONIAN TREATISE ON EPILEPSY. 185–198.
- Kölker, S., Christensen, E., Leonard, J. V., Greenberg, C. R., Boneh, A., Burlina, A. B., et al. (2011). Diagnosis and management of glutaric aciduria type I - Revised recommendations. *J. Inherit. Metab. Dis.* 34, 677–694. doi:10.1007/s10545-011-9289-5.
- Kon, T., Nishiura, M., Ohkura, R., Toyoshima, Y. Y., and Sutoh, K. (2004). Distinct functions of nucleotide-binding/hydrolysis sites in the four AAA modules of cytoplasmic dynein. *Biochemistry.* doi:10.1021/bi048985a.
- Konno, D., Shioi, G., Shitamukai, A., Mori, A., Kiyonari, H., Miyata, T., et al. (2008). Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nat. Cell Biol.* 10, 93-U78. doi:Doi 10.1038/Ncb1673.
- Korenberg, J. R., Chen, X. N., Schipper, R., Sun, Z., Gonsky, R., Gerwehr, S., et al. (1994). Down syndrome phenotypes: The consequences of chromosomal imbalance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 4997–5001. doi:10.1073/pnas.91.11.4997.
- Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. (2009). The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 149–184. doi:10.1146/annurev.neuro.051508.135600.
- Krivit, W., Desnick, R. J., Lee, J., Moller, J., Wright, F., Sweeley, C. C., et al. (1972). Generalized accumulation of neutral glycosphingolipids with GM2 ganglioside accumulation in the brain. Sandhoff's disease (variant of Tay-Sachs disease). *Am. J. Med.* doi:10.1016/0002-9343(72)90082-4.
- Kühn, R., Schwenk, F., Aguet, M., and Rajewsky, K. (1995). Inducible gene targeting in mice. *Science* (80-. ). doi:10.1126/science.7660125.
- Kulikova, S., Abatis, M., Heng, C., and Lelievre, V. (2011). Interkinetic nuclear migration: Reciprocal activities of dynein and kinesin. *Cell Adhes. Migr.* 5, 277–279. doi:10.4161/cam.5.4.17432.
- Kurata, H., Shirai, K., Saito, Y., Okazaki, T., Ohno, K., Oguri, M., et al. (2018). Neurodevelopmental disorders in children with macrocephaly: A prevalence study and PTEN gene analysis. *Brain Dev.* 40, 36–41. doi:10.1016/j.braindev.2017.07.005.
- Lainhart, J. E., Piven, J., Wzorek, M., Landa, R., Santangelo, S. L., Coon, H., et al. (1997). Macrocephaly in children and adults with autism. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry.* doi:10.1097/00004583-199702000-00019.
- Lambert de Rouvroit, C., and Goffinet, A. M. (1998). The reeler mouse as a model of brain development. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* doi:10.1007/978-3-642-72257-8.

- LaMonica, B. E., Lui, J. H., Hansen, D. V., and Kriegstein, A. R. (2013). Mitotic spindle orientation predicts outer radial glial cell generation in human neocortex. *Nat. Commun.* 4. doi:10.1038/ncomms2647.
- LaMonica, B. E., Lui, J. H., Wang, X., and Kriegstein, A. R. (2012). OSVZ progenitors in the human cortex: An updated perspective on neurodevelopmental disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 747–753. doi:10.1016/j.conb.2012.03.006.
- Lancaster, M. A., and Knoblich, J. A. (2012). Spindle orientation in mammalian cerebral cortical development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 737–746. doi:10.1016/j.conb.2012.04.003.
- Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C.-A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurler, M. E., et al. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 501, 373–379. doi:10.1038/nature12517.
- Lanctot, A. A., Peng, C. Y., Pawlisch, A. S., Joksimovic, M., and Feng, Y. (2013). Spatially Dependent Dynamic MAPK Modulation by the Nde1-Lis1-Brap Complex Patterns Mammalian CNS. *Dev. Cell* 25, 241–255. doi:10.1016/j.devcel.2013.04.006.
- Lange, C., Huttner, W. B., and Calegari, F. (2009). Cdk4/CyclinD1 Overexpression in Neural Stem Cells Shortens G1, Delays Neurogenesis, and Promotes the Generation and Expansion of Basal Progenitors. *Cell Stem Cell* 5, 320–331. doi:10.1016/j.stem.2009.05.026.
- Lange, M., Kasper, B., Bohring, A., Rutsch, F., Kluger, G., Hoffjan, S., et al. (2015). 47 patients with FLNA associated periventricular nodular heterotopia. *Orphanet J. Rare Dis.* 10, 1–11. doi:10.1186/s13023-015-0331-9.
- Latasa, M. J., Cisneros, E., and Frade, J. M. (2009). Cell cycle control of Notch signaling and the functional regionalization of the neuroepithelium during vertebrate neurogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 53, 895–908. doi:10.1387/ijdb.082721ml.
- Lauterbur, P. C. (1973). Image formation by induced local interactions: Examples employing nuclear magnetic resonance. *Nature.* doi:10.1038/242190a0.
- Lauterbur, P. C. (1974). Magnetic Resonance Zeugmatography. *Pure Appl. Chem.* 40, 149–157. doi:10.1351/pac197440010149.
- Lee, J. (2017). Malformations of cortical development: Genetic mechanisms and diagnostic approach. *Korean J. Pediatr.* 60, 1–9. doi:10.3345/kjp.2017.60.1.1.
- Lei, Y., and Warrior, R. (2000). The Drosophila lissencephaly (DLis1) gene is required for nuclear migration. *Dev. Biol.* 226, 57–72. doi:10.1006/dbio.2000.9848.
- Lepanto, P., Badano, J. L., and Zolessi, F. R. (2016). Neuron's little helper: The role of primary cilia in neurogenesis. *Neurogenesis* 3, 1–9. doi:10.1080/23262133.2016.1253363.
- Lerman-Sagie, T., and Leibovitz, Z. (2016). Malformations of Cortical Development: From Postnatal to Fetal Imaging. *Can. J. Neurol. Sci.* 43, 611–618. doi:10.1017/cjn.2016.271.
- Letunic, I., Doerks, T., and Bork, P. (2015). SMART: Recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Res.* 43, D257–D260. doi:10.1093/nar/gku949.
- Leventer, R. J., Cardoso, C., Ledbetter, D. H., and Dobyns, W. B. (2001). LIS1 missense mutations cause milder lissencephaly phenotypes including a child with normal IQ. *Neurology* 57, 416–422. doi:10.1212/WNL.57.3.416.
- Levine, D. (2002). MR imaging of fetal central nervous system abnormalities. *Brain Cogn.* doi:10.1016/S0278-2626(02)00533-X.
- Li, J., Lee, W. L., and Cooper, J. A. (2005). NudEL targets dynein to microtubule ends through LIS1. *Nat. Cell Biol.* 7, 686–690. doi:10.1038/ncb1273.

- Li, Y., Muffat, J., Omer, A., Bosch, I., Lancaster, M. A., Sur, M., et al. (2017). Induction of Expansion and Folding in Human Cerebral Organoids. *Cell Stem Cell* 20, 385–396.e3. doi:10.1016/j.stem.2016.11.017.
- Li, Z., and Engelhardt, J. F. (2003). Progress toward generating a ferret model of cystic fibrosis by somatic cell nuclear transfer. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 1–8. doi:10.1186/1477-7827-1-83.
- Lien, W. H., Klezovitch, O., Fernandez, T. E., Delrow, J., and Vasioukhin, V. (2006).  $\alpha$ E-catenin controls cerebral cortical size by regulating the hedgehog signaling pathway. *Science* (80-. ). doi:10.1126/science.1121449.
- Lim, L., Mi, D., Llorca, A., and Marín, O. (2018). Development and Functional Diversification of Cortical Interneurons. *Neuron* 100, 294–313. doi:10.1016/j.neuron.2018.10.009.
- Liu, J., Liu, W., Yang, L., Wu, Q., Zhang, H., Fang, A., et al. (2017a). The Primate-Specific Gene TMEM14B Marks Outer Radial Glia Cells and Promotes Cortical Expansion and Folding. *Cell Stem Cell* 21, 635–649.e8. doi:10.1016/j.stem.2017.08.013.
- Liu, L., Lu, J., Li, X., Wu, A., Wu, Q., Zhao, M., et al. (2018). The LIS1/NDE1 Complex Is Essential for FGF Signaling by Regulating FGF Receptor Intracellular Trafficking. *Cell Rep.* 22, 3277–3291. doi:10.1016/j.celrep.2018.02.077.
- Liu, W., Yan, B., An, D., Xiao, J., Hu, F., and Zhou, D. (2017b). Sporadic periventricular nodular heterotopia: Classification, phenotype and correlation with Filamin A mutations. *Epilepsy Res.* 133, 33–40. doi:10.1016/j.eplesyres.2017.03.005.
- Liu, Z., Xie, T., and Steward, R. (1999). Lis1, the Drosophila homolog of a human lissencephaly disease gene, is required for germline cell division and oocyte differentiation. *Development* 126, 4477–4488.
- Lo Nigro, C., Chong, S. S., Smith, A. C. M., Dobyns, W. B., Carrozzo, R., and Ledbetter, D. H. (1997). Point mutations and an intragenic deletion in LIS1, the lissencephaly causative gene in isolated lissencephaly sequence and Miller-Dieker syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 6, 157–164. doi:10.1093/hmg/6.2.157.
- Lockrow, J. P., Holden, K. R., Dwivedi, A., Matheus, M. G., and Lyons, M. J. (2012). LIS1 Duplication: Expanding the Phenotype. *J. Child Neurol.* 27, 791–795. doi:10.1177/0883073811425972.
- Louvi, A., and Grove, E. A. (2011). Cilia in the CNS: The quiet organelle claims center stage. *Neuron* 69, 1046–1060. doi:10.1016/j.neuron.2011.03.002.
- Lozano, R., Rosero, C. A., and Hagerman, R. J. (2014). Fragile X spectrum disorders. *Intractable Rare Dis. Res.* 3, 134–146. doi:10.5582/irdr.2014.01022.
- Lu, B., Roegiers, F., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (2001). Adherens junctions inhibit asymmetric division in the Drosophila epithelium. *Nature.* doi:10.1038/35054077.
- Lucke-Wold, B. P., Nguyen, L., Turner, R. C., Logsdon, A. F., Chen, Y. W., Smith, K. E., et al. (2015). Traumatic brain injury and epilepsy: Underlying mechanisms leading to seizure. *Seizure* 33, 13–23. doi:10.1016/j.seizure.2015.10.002.
- Lui, J. H., Nowakowski, T. J., Pollen, A. A., Javaherian, A., Kriegstein, A. R., and Oldham, M. C. (2014). Radial glia require PDGFD–PDGFRb signalling in human but not mouse neocortex. doi:10.1038/nature13973.
- Lukaszewicz, A., Cortay, V., Giroud, P., Berland, M., Smart, I., Kennedy, H., et al. (2006). The concerted modulation of proliferation and migration contributes to the specification of the cytoarchitecture and dimensions of cortical areas. *Cereb. Cortex* 16. doi:10.1093/cercor/bhk011.
- Lukaszewicz, A., Savatier, P., Cortay, V., Kennedy, H., and Dehay, C. (2002). Contrasting effects of

- basic fibroblast growth factor and neurotrophin 3 on cell cycle kinetics of mouse cortical stem cells. *J. Neurosci.* 22, 6610–6622. doi:10.1523/jneurosci.22-15-06610.2002.
- Lunn, E. R., Perry, V. H., Brown, M. C., Rosen, H., and Gordon, S. (1989). Absence of Wallerian Degeneration does not Hinder Regeneration in Peripheral Nerve. *Eur. J. Neurosci.* doi:10.1111/j.1460-9568.1989.tb00771.x.
- Lykke-Andersen, S., and Jensen, T. H. (2015). Nonsense-mediated mRNA decay: An intricate machinery that shapes transcriptomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 665–677. doi:10.1038/nrm4063.
- Magini, P., Smits, D. J., Vandervore, L., Schot, R., Columbaro, M., Kasteleijn, E., et al. (2019). Loss of SMPD4 Causes a Developmental Disorder Characterized by Microcephaly and Congenital Arthrogryposis. *Am. J. Hum. Genet.* doi:10.1016/j.ajhg.2019.08.006.
- Mairet-Coello, G., Tury, A., van Buskirk, E., Robinson, K., Genestine, M., and DiCicco-Bloom, E. (2012). p57 KIP2 regulates radial glia and intermediate precursor cell cycle dynamics and lower layer neurogenesis in developing cerebral cortex. *Development* 139, 475–487. doi:10.1242/dev.067314.
- Mansfield, P., and Maudsley, A. A. (1977). Medical imaging by NMR. *Br. J. Radiol.* doi:10.1259/0007-1285-50-591-188.
- Mansfield, P., and Pykett, I. L. (1978). Biological and medical imaging by NMR. 1978. *J. Magn. Reson.* 29, 355–373. doi:10.1016/j.jmr.2011.09.020.
- Marín-Padilla, M. (2015). Human cerebral cortex Cajal-Retzius neuron: Development, structure and function. A Golgi study. *Front. Neuroanat.* doi:10.3389/fnana.2015.00021.
- Marín-Padilla, M. (1992). Ontogenesis of the pyramidal cell of the mammalian neocortex and developmental cytoarchitectonics: A unifying theory. *J. Comp. Neurol.* doi:10.1002/cne.903210205.
- Marín, O., and Müller, U. (2014). Lineage origins of GABAergic versus glutamatergic neurons in the neocortex. *Curr. Opin. Neurobiol.* doi:10.1016/j.conb.2014.01.015.
- Maris, A. F., Barbato, I. T., Trott, A., and Montano, M. A. E. (2013). Familial mental retardation: a review and practical classification. *Cien. Saude Colet.* 18, 1717–1729. doi:10.1590/s1413-81232013000600023.
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., and Wu, C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat. Rev. Neurosci.* doi:10.1038/nrn1519.
- Markus, S. M., Punch, J. J., and Lee, W. L. (2009). Motor- and Tail-Dependent Targeting of Dynein to Microtubule Plus Ends and the Cell Cortex. *Curr. Biol.* 19, 196–205. doi:10.1016/j.cub.2008.12.047.
- Martínez-Cerdeño, V., Cunningham, C. L., Camacho, J., Antczak, J. L., Prakash, A. N., Cziep, M. E., et al. (2012). Comparative analysis of the subventricular zone in rat, ferret and macaque: Evidence for an outer subventricular zone in rodents. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0030178.
- Martínez-cerdeño, V., and Noctor, S. C. (2014). Cajal , Retzius , and Cajal – Retzius cells. *Front. Neuroanat.* 8, 1–7. doi:10.3389/fnana.2014.00048.
- Martínez-Martínez, M. Á., De Juan Romero, C., Fernández, V., Cárdenas, A., Götz, M., and Borrell, V. (2016). A restricted period for formation of outer subventricular zone defined by Cdh1 and Trnp1 levels. *Nat. Commun.* 7. doi:10.1038/ncomms11812.
- Mateja, A., Cierpicki, T., Paduch, M., Derewenda, Z. S., and Otlewski, J. (2006). The dimerization mechanism of LIS1 and its implication for proteins containing the LisH motif. *J. Mol. Biol.* 357,

621–631. doi:10.1016/j.jmb.2006.01.002.

- Matsui, A., Yoshida, A. C., Kubota, M., Ogawa, M., and Shimogori, T. (2011). Mouse in utero electroporation: Controlled spatiotemporal gene transfection. *J. Vis. Exp.*, 1–6. doi:10.3791/3024.
- Matsumoto, N., Shinmyo, Y., Ichikawa, Y., and Kawasaki, H. (2017). Gyrification of the cerebral cortex requires FGF signaling in the mammalian brain. *Elife* 6, 1–20. doi:10.7554/eLife.29285.
- McInnes, R. R., Michaud, J. L., Wynshaw-Boris, A., and Wynshaw-Boris, A. (2007). Developmental Biology: Frontiers for Clinical Genetics Lissencephaly and LIS1: insights into the molecular mechanisms of neuronal migration and development. *Clin Genet* 72, 296–304. doi:10.1111/j.1399-0004.2007.00888.x.
- McKenney, R. J., Vershinin, M., Kunwar, A., Vallee, R. B., and Gross, S. P. (2010). LIS1 and NudE induce a persistent dynein force-producing state. *Cell* 141, 304–314. doi:10.1016/j.cell.2010.02.035.
- McPhee, C., Reed, J., and Zubizarreta, I. (2015). Nuclear Magnetic Resonance (NMR). *Dev. Pet. Sci.* 64, 655–669. doi:10.1016/B978-0-444-63533-4.00011-1.
- Mei, D., Lewis, R., Parrini, E., Lazarou, L. P., Marini, C., Pilz, D. T., et al. (2008). High frequency of genomic deletions - And a duplication - In the LIS1 gene in lissencephaly: Implications for molecular diagnosis. *J. Med. Genet.* 45, 355–361. doi:10.1136/jmg.2007.056507.
- Meyer, G. (1999). Feature Article: What is a Cajal-Retzius cell? A Reassessment of a Classical Cell Type Based on Recent Observations in the Developing Neocortex. *Cereb. Cortex.* doi:10.1093/cercor/9.8.765.
- Meyer, G., Schaaps, J. P., Moreau, L., and Goffinet, A. M. (2000). Embryonic and Early Fetal Development of the Human Neocortex. *J. Neurosci.* 20, 1858–1868. doi:10.1523/jneurosci.20-05-01858.2000.
- Mihalas, A. B., Elsen, G. E., Bedogni, F., Daza, R. A. M., Ramos-Laguna, K. A., Arnold, S. J., et al. (2016). Intermediate Progenitor Cohorts Differentially Generate Cortical Layers and Require Tbr2 for Timely Acquisition of Neuronal Subtype Identity. *Cell Rep.* 16, 92–105. doi:10.1016/j.celrep.2016.05.072.
- Mirzaa, G. M., Conway, R. L., Gripp, K. W., Lerman-Sagie, T., Siegel, D. H., deVries, L. S., et al. (2012). Megalencephaly-capillary malformation (MCAP) and megalencephaly-polydactyly-polymicrogyria-hydrocephalus (MPPH) syndromes: Two closely related disorders of brain overgrowth and abnormal brain and body morphogenesis. *Am. J. Med. Genet. Part A* 158 A. doi:10.1002/ajmg.a.34402.
- Mirzaa, G. M., and Poduri, A. (2014). Megalencephaly and hemimegalencephaly: Breakthroughs in molecular etiology. *Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet.* doi:10.1002/ajmg.c.31401.
- Miyamoto, Y., Sakane, F., and Hashimoto, K. (2015). N-cadherin-based adherens junction regulates the maintenance, proliferation, and differentiation of neural progenitor cells during development. *Cell Adh. Migr.* 9, 183–192. doi:10.1080/19336918.2015.1005466.
- Miyata, T. (2008). Development of three-dimensional architecture of the neuroepithelium: Role of pseudostratification and cellular “community.” *Dev. Growth Differ.* 50. doi:10.1111/j.1440-169X.2007.00980.x.
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Kawano, M., and Muto, T. (2004). Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development*, 3133–3145. doi:10.1242/dev.01173.
- Mlakar, J., Korva, M., Tul, N., Popović, M., Poljšak-Prijatelj, M., Mraz, J., et al. (2016). Zika virus associated with microcephaly. *N. Engl. J. Med.* doi:10.1056/NEJMoa1600651.

- Molnár, Z. (2004). Thomas Willis (1621–1675), the founder of clinical neuroscience. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 329–335. doi:10.1038/nrn1369.
- Molnár, Z., Métin, C., Stoykova, A., Tarabykin, V., Price, D. J., Francis, F., et al. (2006). Comparative aspects of cerebral cortical development. *Eur. J. Neurosci.* 23, 921–934. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04611.x.
- Monda, J. K., and Cheeseman, I. M. (2018). Nde1 promotes diverse dynein functions through differential interactions and exhibits an isoform-specific proteasome association. *Mol. Biol. Cell* 29, 2336–2345. doi:10.1091/mbc.E18-07-0418.
- Moon, H. M., Hippenmeyer, S., Luo, L., and Wynshaw-Boris, A. (2020). LIS1 determines cleavage plane positioning by regulating actomyosin-mediated cell membrane contractility. *Elife* 9, 1–31. doi:10.7554/eLife.51512.
- Moon, H. M., Youn, Y. H., Pemble, H., Yingling, J., Wittmann, T., and Wynshaw-Boris, A. (2014). LIS1 controls mitosis and mitotic spindle organization via the LIS1-NDEL1-dynein complex. *Hum. Mol. Genet.* doi:10.1093/hmg/ddt436.
- Morris, S. M., Albrecht, U., Reiner, O., Eichele, G., and Yu-Lee, L. Y. (1998). The lissencephaly gene product Lis1, a protein involved in neuronal migration, interacts with a nuclear movement protein, NudC. *Curr. Biol.* 8, 603–606. doi:10.1016/S0960-9822(98)70232-5.
- Mouse Genome Sequencing Consortium (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520–562. Available at: <http://www.nature.com/nature/journal/v420/n6915/full/nature01262.html>.
- Murciano, A., Zamora, J., López-Sánchez, J., and Frade, J. M. (2002). Interkinetic nuclear movement may provide spatial clues to the regulation of neurogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.* 21, 285–300. doi:10.1006/mcne.2002.1174.
- Murray, A., Francisco, S., and Francisco, S. (1994). Cell cycle checkpoints. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 872–876. doi:10.1016/0955-0674(94)90059-0.
- Myers, K. A., Bello-Espinosa, L. E., Kherani, A., Wei, X. C., and Innes, A. M. (2015). TUBA1A Mutation Associated With Eye Abnormalities in Addition to Brain Malformation. *Pediatr. Neurol.* doi:10.1016/j.pediatrneurol.2015.07.004.
- Nadarajah, B., and Parnavelas, J. G. (2002). Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 423–432. doi:10.1038/nrn845.
- Narayanan, R., Pham, L., Kerimoglu, C., Watanabe, T., Hernandez, R. C., Sokpor, G., et al. (2018). Chromatin Remodeling BAF155 Subunit Regulates the Genesis of Basal Progenitors in Developing Cortex Chromatin Remodeling BAF155 Subunit Regulates the Genesis of Basal Progenitors in Developing Cortex. *ISCIENCE* 4, 109–126. doi:10.1016/j.isci.2018.05.014.
- Naveed, M., Kazmi, S. K., Amin, M., Asif, Z., Islam, U., Shahid, K., et al. (2018). Comprehensive review on the molecular genetics of autosomal recessive primary microcephaly (MCPH). *Genet. Res. (Camb)*. doi:10.1017/S0016672318000046.
- Nawathe, A., Doherty, J., and Pandya, P. (2018). Fetal microcephaly. *BMJ* 361, 1–5. doi:10.1136/bmj.k2232.
- Neganova, I., Zhang, X., Atkinson, S., and Lako, M. (2009). Expression and functional analysis of G1 to S regulatory components reveals an important role for CDK2 in cell cycle regulation in human embryonic stem cells. *Oncogene* 28, 20–30. doi:10.1038/onc.2008.358.
- Nguyen, L., Besson, A., Heng, J. I. T., Schuurmans, C., Teboul, L., Parras, C., et al. (2006). p27kip1 independently promotes neuronal differentiation and migration in the cerebral cortex. *Genes Dev.* doi:10.1101/gad.377106.



- Nicholas, A. K., Khurshid, M., Désir, J., Carvalho, O. P., Cox, J. J., Thornton, G., et al. (2010). WDR62 is associated with the spindle pole and is mutated in human microcephaly. *Nat. Genet.* doi:10.1038/ng.682.
- Niday, Z., and Tzingounis, A. V. (2018). Potassium channel gain of function in epilepsy: an unresolved paradox. *Neuroscientist.* doi:doi:10.1177/1073858418763752.
- Nikolopoulou, E., Galea, G. L., Rolo, A., Greene, N. D. E., and Copp, A. J. (2017). Neural tube closure: Cellular, molecular and biomechanical mechanisms. *Dev.* 144, 552–566. doi:10.1242/dev.145904.
- Noctor, S. C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L., and Kriegstein, A. R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat. Neurosci.* 7, 136–144. doi:10.1038/nn1172.
- Nowakowski, R. S., Lewin, S. B., and Miller, M. W. (1989). Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J. Neurocytol.* 18, 311–318. doi:10.1007/BF01190834.
- Nulty, J., Alsaffar, M., and Barry, D. (2015). Radial glial cells organize the central nervous system via microtubule dependant processes. *Brain Res.* 1625, 171–179. doi:10.1016/j.brainres.2015.08.027.
- O'Reilly, H., Thiébaud, F. I., and White, S. J. (2013). Is macrocephaly a neural marker of a local bias in autism? *Dev. Cogn. Neurosci.* 6, 149–154. doi:10.1016/j.dcn.2013.09.002.
- Oberst, P., Fièvre, S., Baumann, N., Concetti, C., Bartolini, G., and Jabaudon, D. (2019). Temporal plasticity of apical progenitors in the developing mouse neocortex. *Nature* 573, 370–374. doi:10.1038/s41586-019-1515-6.
- Oegema, R., Barkovich, A. J., Mancini, G. M. S., Guerrini, R., and Dobyns, W. B. (2019). Subcortical heterotopic gray matter brain malformations: Classification study of 107 individuals. *Neurology* 93, E1360–E1373. doi:10.1212/WNL.0000000000008200.
- Olson, K. R., Kearney, T. E., Dyer, J. E., Benowitz, N. L., and Blanc, P. D. (1993). Seizures associated with poisoning and drug overdose [corrected and republished in Am J Emerg Med 1994 May;12(3):392-5]. *Am. J. Emerg. Med.* 11, 565–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8192750>.
- Orford, K. W., and Scadden, D. T. (2008). Deconstructing stem cell self-renewal: Genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat. Rev. Genet.* 9, 115–128. doi:10.1038/nrg2269.
- Osterling, W. L., Boyer, R. S., Hedlund, G. L., and Bale, J. F. (2011). MPPH syndrome: Two new cases. *Pediatr. Neurol.* 44. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2010.12.009.
- Ostrem, B. E. L. L., Lui, J. H., Gertz, C. C., and Kriegstein, A. R. (2014). Control of outer radial glial stem cell mitosis in the human brain. *Cell Rep.* 8, 656–664. doi:10.1016/j.celrep.2014.06.058.
- Pakkenberg, B., and Gundersen, H. J. G. (1997). Neocortical neuron number in humans: Effect of sex and age. *J. Comp. Neurol.* 384, 312–320. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19970728)384:2<312::AID-CNE10>3.0.CO;2-K.
- Pandey, J. P., and Smith, D. S. (2011). A Cdk5-Dependent Switch Regulates Lis1/Ndel1/Dynein-Driven Organelle Transport in Adult Axons. *J. Neurosci.* 31, 17207–17219. doi:10.1523/JNEUROSCI.4108-11.2011.
- Parrini, E., Conti, V., Dobyns, W. B., and Guerrini, R. (2016). Genetic basis of brain malformations. *Mol. Syndromol.* 7, 220–233. doi:10.1159/000448639.
- Parrini, E., Ramazzotti, A., Dobyns, W. B., Mei, D., Moro, F., Veggiotti, P., et al. (2006). Periventricular heterotopia: Phenotypic heterogeneity and correlation with Filamin a mutations.

- Brain* 129, 1892–1906. doi:10.1093/brain/awl125.
- Paschal, B. M., and Vallee, R. B. (1987). Retrograde transport by the microtubule-associated protein MAP 1C. *Nature* 330, 181–183. doi:10.1038/330181a0.
- Passemard, S., Kaindl, A. M., and Verloes, A. (2013). Microcephaly. *Handb. Clin. Neurol.* 111, 129–141. doi:10.1016/B978-0-444-52891-9.00013-0.
- Pavone, P., Praticò, A. D., Rizzo, R., Corsello, G., Ruggieri, M., Parano, E., et al. (2017). A clinical review on megalencephaly: A large brain as a possible sign of cerebral impairment. *Med. (United States)* 96. doi:10.1097/MD.0000000000006814.
- Pawlisz, A. S., Mutch, C., Wynshaw-Boris, A., Chenn, A., Walsh, C. A., and Feng, Y. (2008). Lis1-Nde1-dependent neuronal fate control determines cerebral cortical size and lamination. *Hum. Mol. Genet.* 17, 2441–2455. doi:10.1093/hmg/ddn144.
- Payne, C., St. John, J. C., Ramalho-Santos, J., and Schatten, G. (2003). LIS1 Association with Dynactin is Required for Nuclear Motility and Genomic Union in the Fertilized Mammalian Oocyte. *Cell Motil. Cytoskeleton.* doi:10.1002/cm.10151.
- Pei, L., Peng, Y., Yang, Y., Ling, X. B., Eyndhoven, W. G. Van, Nguyen, K. C. Q. Q., et al. (2002). PRC17, a novel oncogene encoding a Rab GTPase-activating protein, is amplified in prostate cancer. *Cancer Res.* 62, 5420–5424. doi:10.1158/0008-5472.can-04-0328.
- Penisson, M., Ladewig, J., Belvindrah, R., and Francis, F. (2019). Genes and Mechanisms Involved in the Generation and Amplification of Basal Radial Glial Cells. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 1–21. doi:10.3389/fncel.2019.00381.
- Perlman, R. L. (2016). Mouse Models of Human Disease: An Evolutionary Perspective. *Evol. Med. Public Heal.* doi:10.1093/emph/eow014.
- Perucca, P., and Perucca, E. (2019). Identifying mutations in epilepsy genes: Impact on treatment selection. *Epilepsy Res.* 152, 18–30. doi:10.1016/j.epilepsyres.2019.03.001.
- Péterfy, M., Gyuris, T., Basu, R., and Takács, L. (1994). Lissencephaly-1 is one of the most conserved proteins between mouse and human: a single amino-acid difference in 410 residues. *Gene.* doi:10.1016/0378-1119(94)90468-5.
- Philbert, M., Maillard, C., Cavallin, M., Goldenberg, A., Masson, C., Boddaert, N., et al. (2017). A novel recurrent LIS1 splice site mutation in classic lissencephaly. *Am. J. Med. Genet. Part A* 173, 561–564. doi:10.1002/ajmg.a.38041.
- Piekny, A. J., and Glotzer, M. (2008). Anillin Is a Scaffold Protein That Links RhoA, Actin, and Myosin during Cytokinesis. *Curr. Biol.* 18, 30–36. doi:10.1016/j.cub.2007.11.068.
- Piekny, A., Werner, M., and Glotzer, M. (2005). Cytokinesis: Welcome to the Rho zone. *Trends Cell Biol.* 15, 651–658. doi:10.1016/j.tcb.2005.10.006.
- Pilaz, L. J., Patti, D., Marcy, G., Ollier, E., Pfister, S., Douglas, R. J., et al. (2009). Forced G1-phase reduction alters mode of division, neuron number, and laminar phenotype in the cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 21924–21929. doi:10.1073/pnas.0909894106.
- Pilz, D. T., Julie, K., Matsumoto, N., Bodurtha, J., Bernadi, B., Tassinari, C. A., et al. (1999). Subcortical band heterotopia in rare affected males can be caused by missense mutations in DCX(XLIS) or LIS1. *Hum. Mol. Genet.* doi:10.1093/hmg/8.9.1757.
- Pilz, D. T., Macha, M. E., Precht, K. S., Smith, A. C. M., Dobyns, W. B., and Ledbetter, D. H. (1998). Fluorescence in situ hybridization analysis with LIS1 specific probes reveals a high deletion mutation rate in isolated lissencephaly sequence. *Genet. Med.* 1, 29–33. doi:10.1097/00125817-199811000-00007.

- Pirozzi, F., Nelson, B., and Mirzaa, G. (2018). From microcephaly to megalencephaly: determinants of brain size. *Clin. Res.* doi:10.1016/S0140-6736(00)57467-4.
- Poirier, K., Lebrun, N., Broix, L., Tian, G., Saillour, Y., Boscheron, C., et al. (2013). Mutations in TUBG1, DYNC1H1, KIF5C and KIF2A cause malformations of cortical development and microcephaly. *Nat. Genet.* 45, 639–47. doi:10.1038/ng.2613.
- Pollen, A. A., Nowakowski, T. J., Chen, J., Retallack, H., Sandoval-Espinosa, C., Nicholas, C. R., et al. (2015). Molecular Identity of Human Outer Radial Glia during Cortical Development. *Cell* 163, 55–67. doi:10.1016/j.cell.2015.09.004.
- Pontious, A., Kowalczyk, T., Englund, C., and Hevner, R. F. (2007). Role of intermediate progenitor cells in cerebral cortex development. *Dev. Neurosci.* 30, 24–32. doi:10.1159/000109848.
- Poon, R. Y. C. (2016). Chapter 1 Cell Cycle Control : A System of Interlinking Oscillators. 1342, 3–19. doi:10.1007/978-1-4939-2957-3.
- Pop, A., Struys, E. A., Jansen, E. E. W., Fernandez, M. R., Kanhai, W. A., van Dooren, S. J. M., et al. (2019). D-2-hydroxyglutaric aciduria Type I: Functional analysis of D2HGDH missense variants. *Hum. Mutat.* doi:10.1002/humu.23751.
- Postiglione, M. P., Jüschke, C., Xie, Y., Haas, G. A., Charalambous, C., and Knoblich, J. A. (2011). Mouse inscuteable induces apical-basal spindle orientation to facilitate intermediate progenitor generation in the developing neocortex. *Neuron.* doi:10.1016/j.neuron.2011.09.022.
- Pramparo, T., Youn, Y. H., Yingling, J., Hirotsune, S., and Wynshaw-Boris, A. (2010). Novel embryonic neuronal migration and proliferation defects in Dcx mutant mice are exacerbated by Lis1 reduction. *J. Neurosci.* 30, 3002–3012. doi:10.1523/JNEUROSCI.4851-09.2010.
- Pulvers, J. N., Bryk, J., Fish, J. L., Wilsch-Bräuninger, M., Arai, Y., Schreier, D., et al. (2010). Mutations in mouse Aspm ( abnormal spindle-like microcephaly associated ) cause not only microcephaly but also major defects in the germline. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 16595–16600. doi:10.1073/pnas.1010494107.
- Rakic, P. (1978). Neuronal migration and contact guidance in the primate telencephalon. *Postgrad. Med. J.*
- Rakic, P. (1990). Principles of neural cell migration. *Experientia.* doi:10.1007/BF01939380.
- Rakotomamonjy, J., Brunner, M., Jüschke, C., Zang, K., Huang, E. J., Reichardt, L. F., et al. (2017). Afadin controls cell polarization and mitotic spindle orientation in developing cortical radial glia. *Neural Dev.* 12, 1–10. doi:10.1186/s13064-017-0085-2.
- Reillo, I., De Juan Romero, C., García-Cabezas, M. Á., and Borrell, V. (2011). A Role for intermediate radial glia in the tangential expansion of the mammalian cerebral cortex. *Cereb. Cortex* 21, 1674–1694. doi:10.1093/cercor/bhq238.
- Reiner, O. (2013). LIS1 and DCX: Implications for Brain Development and Human Disease in Relation to Microtubules. *Scientifica (Cairo).* 2013, 1–17. doi:10.1155/2013/393975.
- Reiner, O., Albrecht, U., Gordon, M., Chianese, K. A., Wong, C., Gal-Gerber, O., et al. (1995). Lissencephaly gene (LIS1) expression in the CNS suggests a role in neuronal migration. *J. Neurosci.* 15, 3730–3738. doi:10.1523/jneurosci.15-05-03730.1995.
- Reiner, O., Carrozzo, R., Shen, Y., Wehnert, M., Faustinella, F., Dobyns, W. B., et al. (1993). Isolation of a Miller-Dicker lissencephaly gene containing G protein  $\beta$ -subunit-like repeats. *Nature* 364, 717–721. doi:10.1038/364717a0.
- Reiner, O., and Sapir, T. (2013). LIS1 functions in normal development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 951–956. doi:10.1016/j.conb.2013.08.001.

- Rivière, J. B., Mirzaa, G. M., O’Roak, B. J., Beddaoui, M., Alcantara, D., Conway, R. L., et al. (2012). De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat. Genet.* 44. doi:10.1038/ng.2331.
- Roberts, A. J., Kon, T., Knight, P. J., Sutoh, K., and Burgess, S. A. (2013). Functions and mechanics of dynein motor proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 713–726. doi:10.1038/nrm3667.
- Rodriguez, D. (2013). “Leukodystrophies with astrocytic dysfunction,” in *Handbook of Clinical Neurology* doi:10.1016/B978-0-444-59565-2.00030-7.
- Romaniello, R., Tonelli, A., Arrigoni, F., Baschiroto, C., Triulzi, F., Bresolin, N., et al. (2012). A novel mutation in the  $\beta$ -tubulin gene TUBB2B associated with complex malformation of cortical development and deficits in axonal guidance. *Dev. Med. Child Neurol.* doi:10.1111/j.1469-8749.2012.04316.x.
- Romero, D. M., Bahi-Buisson, N., and Francis, F. (2018). Genetics and mechanisms leading to human cortical malformations. *Semin. Cell Dev. Biol.* 76, 33–75. doi:10.1016/j.semcdb.2017.09.031.
- Rowitch, D. H., Kispert, A., and McMahon, A. P. (1999). Pax-2 regulatory sequences that direct transgene expression in the developing neural plate and external granule cell layer of the cerebellum. *Dev. Brain Res.* doi:10.1016/S0165-3806(99)00104-2.
- Saillour, Y., Carion, N., Quelin, C., Leger, P. L., Boddaert, N., Elie, C., et al. (2009). LIS1-Related Isolated Lissencephaly Spectrum of Mutations and Relationships With Malformation Severity. *Arch. Neurol.* 66, 1007–1015. doi:10.1001/archneurol.2009.149.
- Saleem, S. N. (2014). Fetal MRI: An approach to practice: A review. *J. Adv. Res.* 5, 507–523. doi:10.1016/j.jare.2013.06.001.
- Salomoni, P., and Calegari, F. (2010). Cell cycle control of mammalian neural stem cells: Putting a speed limit on G1. *Trends Cell Biol.* 20, 233–243. doi:10.1016/j.tcb.2010.01.006.
- Sansom, S. N., Griffiths, D. S., Faedo, A., Kleinjan, D. J., Ruan, Y., Smith, J., et al. (2009). The level of the transcription factor Pax6 is essential for controlling the balance between neural stem cell self-renewal and neurogenesis. *PLoS Genet.* doi:10.1371/journal.pgen.1000511.
- Sapir, T., Eisenstein, M., Burgess, H. A., Horesh, D., Cahana, A., Aoki, J., et al. (1999). Analysis of lissencephaly-causing LIS1 mutations. *Eur. J. Biochem.* 266, 1011–1020. doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00942.x.
- Sasaki, S., Mori, D., Toyo-oka, K., Chen, A., Garrett-Beal, L., Muramatsu, M., et al. (2005). Complete Loss of Ndel1 Results in Neuronal Migration Defects and Early Embryonic Lethality. *Mol. Cell Biol.* 25, 7812–7827. doi:10.1128/mcb.25.17.7812-7827.2005.
- Sasaki, S., Shionoya, A., Ishida, M., Gambello, M. J., Yingling, J., Wynshaw-Boris, A., et al. (2000). A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system. *Neuron.* doi:10.1016/S0896-6273(00)00146-X.
- Sauer, B. (1998). Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods A Companion to Methods Enzymol.* doi:10.1006/meth.1998.0593.
- Sauer, F. C. (1935). Mitosis in the neural tube. *J. Comp. Neurol.* 62, 377–405. doi:10.1002/cne.900620207.
- Sauerland, C., Menzies, B. R., Glatzle, M., Seeger, J., Renfree, M. B., and Fietz, S. A. (2018). The basal radial glia occurs in marsupials and underlies the evolution of an expanded neocortex in therian mammals. *Cereb. Cortex* 28, 145–157. doi:10.1093/cercor/bhw360.
- Scatliff, J. H., and Johnston, S. (2014). Andreas Vesalius and Thomas Willis: Their anatomic brain illustrations and illustrators. *Am. J. Neuroradiol.* 35. doi:10.3174/ajnr.A3766.

- Schaar, B. T., and McConnell, S. K. (2005). Cytoskeletal coordination during neuronal migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.0506008102.
- Scheffer, L. K., Xu, C. S., Januszewski, M., Lu, Z., Takemura, S., Hayworth, K. J., et al. (2020). A Connectome and Analysis of the Adult Drosophila Central Brain. *bioRxiv*. doi:10.1101/2020.04.07.030213.
- Schiavo, G., Greensmith, L., Hafezparast, M., and Fisher, E. M. C. (2013). Cytoplasmic dynein heavy chain: The servant of many masters. *Trends Neurosci.* 36, 641–651. doi:10.1016/j.tins.2013.08.001.
- Schubert, D., Kötter, R., Zilles, K., Luhmann, H. J., and Staiger, J. F. (2003). Cell type-specific circuits of cortical layer IV spiny neurons. *J. Neurosci.* 23, 2961–2970. doi:10.1523/jneurosci.23-07-02961.2003.
- Seeley, W. W., Crawford, R. K., Zhou, J., Miller, B. L., and Greicius, M. D. (2009). Neurodegenerative Diseases Target Large-Scale Human Brain Networks. *Neuron* 62, 42–52. doi:10.1016/j.neuron.2009.03.024.
- Sekine, K., Kubo, K. I., and Nakajima, K. (2014). How does Reelin control neuronal migration and layer formation in the developing mammalian neocortex? *Neurosci. Res.* 86, 50–58. doi:10.1016/j.neures.2014.06.004.
- Sessa, A., Mao, C. an, Hadjantonakis, A. K., Klein, W. H., and Broccoli, V. (2008). Tbr2 Directs Conversion of Radial Glia into Basal Precursors and Guides Neuronal Amplification by Indirect Neurogenesis in the Developing Neocortex. *Neuron* 60, 56–69. doi:10.1016/j.neuron.2008.09.028.
- Shao, W., Yang, J., He, M., Yu, X. Y., Lee, C. H., Yang, Z., et al. (2020). Centrosome anchoring regulates progenitor properties and cortical formation. *Nature*. doi:10.1038/s41586-020-2139-6.
- Shea, S. E. (2012). Intellectual disability (mental retardation). *Pediatr. Rev.* 33, 110–121. doi:10.1542/pir.33-3-110.
- Sheen, V. L. (2001). Mutations in the X-linked filamin 1 gene cause periventricular nodular heterotopia in males as well as in females. *Hum. Mol. Genet.* doi:10.1093/hmg/10.17.1775.
- Sheen, V. L., Ganesh, V. S., Topcu, M., Sebire, G., Bodell, A., Hill, R. S., et al. (2004). Mutations in ARFGEF2 implicate vesicle trafficking in neural progenitor proliferation and migration in the human cerebral cortex. *Nat. Genet.* doi:10.1038/ng1276.
- Sheen, V. L., Wheless, J. W., Bodell, A., Braverman, E., Cotter, P. D., Rauen, K. A., et al. (2003). Periventricular heterotopia associated with chromosome 5p anomalies. *Neurology*. doi:10.1212/01.WNL.0000052689.03214.61.
- Shitamukai, A., Konno, D., and Matsuzaki, F. (2011). Oblique Radial Glial Divisions in the Developing Mouse Neocortex Induce Self-Renewing Progenitors outside the Germinal Zone That Resemble Primate Outer Subventricular Zone Progenitors. *J. Neurosci.* 31, 3683–3695. doi:10.1523/JNEUROSCI.4773-10.2011.
- Shu, T., Ayala, R., Nguyen, M. D., Xie, Z., Gleeson, J. G., and Tsai, L. H. (2004). Ndel1 operates in a common pathway with LIS1 and cytoplasmic dynein to regulate cortical neuronal positioning. *Neuron* 44, 263–277. doi:10.1016/j.neuron.2004.09.030.
- Sidman, R. L., and Rakic, P. (1973). Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res.* doi:10.1016/0006-8993(73)90617-3.
- Silfeler, I., Arica, V., Davran, R., Tutanc, M., and Basarslan, F. (2012). Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Pakistan J. Med. Sci.* doi:10.12669/pjms.283.946.
- Siller, K. H., and Doe, C. Q. (2008). Lis1/dynactin regulates metaphase spindle orientation in

- Drosophila* neuroblasts. *Dev. Biol.* 319, 1–9. doi:10.1016/j.ydbio.2008.03.018.
- Siller, K. H., Serr, M., Steward, R., Hays, T. S., and Doe, C. Q. (2005). Live imaging of *Drosophila* brain neuroblasts reveals a role for Lis1/dynactin in spindle assembly and mitotic checkpoint control. *Mol. Biol. Cell.* doi:10.1091/mbc.E05-04-0338.
- Singh, A. M., and Dalton, S. (2009). The Cell Cycle and Myc Intersect with Mechanisms that Regulate Pluripotency and Reprogramming. *Cell Stem Cell* 5, 141–149. doi:10.1016/j.stem.2009.07.003.
- Singh, S., and Solecki, D. J. (2015). Polarity transitions during neurogenesis and germinal zone exit in the developing central nervous system. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 1–8. doi:10.3389/fncel.2015.00062.
- Smith, D. S., Niethammer, M., Ayala, R., Zhou, Y., Gambello, M. J., Wynshaw-Boris, A., et al. (2000). Regulation of cytoplasmic dynein behaviour and microtubule organization by mammalian Lis1. *Nat. Cell Biol.* doi:10.1038/35041000.
- Sonigo, P. C., Rypens, F. F., Carteret, M., Delezoide, A. L., and Brunelle, F. O. (1998). MR imaging of fetal cerebral anomalies. *Pediatr. Radiol.* 28, 212–222. doi:10.1007/s002470050335.
- Soriano, E., and Del Río, J. A. (2005). The cells of cajal-retzius: Still a mystery one century after. *Neuron.* doi:10.1016/j.neuron.2005.04.019.
- Sousa, V. H., Miyoshi, G., Hjerling-Leffler, J., Karayannis, T., and Fishell, G. (2009). Characterization of Nkx6-2-derived neocortical interneuron lineages. *Cereb. Cortex* 19, 1–10. doi:10.1093/cercor/bhp038.
- Spear, P. C., and Erickson, C. A. (2012). Interkinetic nuclear migration: A mysterious process in search of a function. *Dev. Growth Differ.* 54, 306–316. doi:10.1111/j.1440-169X.2012.01342.x.
- Splinter, D., Razafsky, D. S., Schlager, M. A., Serra-Marques, A., Grigoriev, I., Demmers, J., et al. (2012). BICD2, dynactin, and LIS1 cooperate in regulating dynein recruitment to cellular structures. *Mol. Biol. Cell* 23, 4226–4241. doi:10.1091/mbc.E12-03-0210.
- Stahl, R., Walcher, T., De Juan Romero, C., Pilz, G. A., Cappello, S., Irmeler, M., et al. (2013). Trnp1 Regulates Expansion and Folding of the Mammalian Cerebral Cortex by Control of Radial Glial Fate. *Cell* 153, 535–549. doi:10.1016/j.cell.2013.03.027.
- Steenweg, M. E., Jakobs, C., Errami, A., van Dooren, S. J. M., Adeva Bartolomé, M. T., Aerssens, P., et al. (2010). An overview of L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase gene (L2HGDH) variants: a genotype-phenotype study. *Hum. Mutat.* 31, 380–390. doi:10.1002/humu.21197.
- Stengel-Rutkowski, S., Balg, S., and Kohler, A. (1994). MILLER-DIEKER-SYNDROM. *Medizinische Genet.* 6, 386–388.
- Stirnemann, C. U., Petsalaki, E., Russell, R. B., and Müller, C. W. (2010). WD40 proteins propel cellular networks. *Trends Biochem. Sci.* doi:10.1016/j.tibs.2010.04.003.
- Stocker, A. M., and Chenn, A. (2015). The role of adherens junctions in the developing neocortex. *Cell Adhes. Migr.* 9, 167–174. doi:10.1080/19336918.2015.1027478.
- Stratton, R. F., Dobyns, W. B., Airhart, S. D., and Ledbetter, D. H. (1984). New chromosomal syndrome: Miller-Dieker syndrome and monosomy 17p13. *Hum. Genet.* 67, 193–200. doi:10.1007/BF00273000.
- Stutterd, C. A., and Leventer, R. J. (2014). Polymicrogyria: A common and heterogeneous malformation of cortical development. *Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet.* 166, 227–239. doi:10.1002/ajmg.c.31399.
- Stutterd, C., McGillivray, G., Stark, Z., Messazos, B., Cameron, F., White, S., et al. (2018).

- Polymicrogyria in association with hypoglycemia points to mutation in the mTOR pathway. *Eur. J. Med. Genet.* doi:10.1016/j.ejmg.2018.06.002.
- Subramanian, L., Calcagnotto, M. E., and Paredes, M. F. (2020). Cortical Malformations : Lessons in Human Brain Development. *13*, 1–17. doi:10.3389/fncel.2019.00576.
- Sun, Y., Liu, W., Liu, T., Feng, X., Yang, N., and Zhou, H. (2015). Signaling pathway of MAPK / ERK in cell proliferation , differentiation , migration , senescence and apoptosis. 9893. doi:10.3109/10799893.2015.1030412.
- Sweeney, K. J., Clark, G. D., Prokscha, A., Dobyns, W. B., and Eichele, G. (2000). Lissencephaly associated mutations suggest a requirement for the PAFAH1B heterotrimeric complex in brain development. *Mech. Dev.* 92, 263–271. doi:10.1016/S0925-4773(00)00242-2.
- Tabata, H., and Nakajima, K. (2003). Multipolar Migration: The Third Mode of Radial Neuronal Migration in the Developing Cerebral Cortex. *J. Neurosci.* 23, 9996–10001. doi:10.1523/jneurosci.23-31-09996.2003.
- Tajbakhsh, S. (2009). Stem cell: what’s in a name? *Nat. Reports Stem Cells.* doi:10.1038/stemcells.2009.90.
- Takahashi, T. (1995). The Cell Cycle of the Pseudostratified Embryonic Murine Cerebral Wall. *J. Neurosci.* 15, 6046–6057.
- Tallinen, T., Chung, J. Y., Rousseau, F., Girard, N., Lefèvre, J., and Mahadevan, L. (2016). On the growth and form of cortical convolutions. *Nat. Phys.* 12, 588–593. doi:10.1038/nphys3632.
- Tan, A. P., Chong, W. K., and Mankad, K. (2018). Comprehensive genotype-phenotype correlation in lissencephaly. *Quant. Imaging Med. Surg.* 8, 673–693. doi:10.21037/qims.2018.08.08.
- Tanaka, D., Nakaya, Y., Yanagawa, Y., Obata, K., and Murakami, F. (2003). Multimodal tangential migration of neocortical GABAergic neurons independent of GPI-anchored proteins. *Development* 130, 5803–5813. doi:10.1242/dev.00825.
- Tanaka, T., and Gleeson, J. G. (2007). Subcortical laminar (band) heterotopia. *Handb. Clin. Neurol.* 87, 191–204. doi:10.1016/S0072-9752(07)87012-6.
- Tarricone, C., Perrina, F., Monzani, S., Massimiliano, L., Kim, M. H., Derewenda, Z. S., et al. (2004). Coupling PAF signaling to dynein regulation: Structure of LIS1 in complex with PAF-acetylhydrolase. *Neuron* 44, 809–821. doi:10.1016/j.neuron.2004.11.019.
- Tatton-Brown, K., Hanks, S., Ruark, E., Zachariou, A., Duarte, S. D. V., Ramsay, E., et al. (2011). Germline mutations in the oncogene EZH2 cause Weaver syndrome and increased human height. *Oncotarget* 2, 1127–1133. doi:10.18632/oncotarget.385.
- Tatton-Brown, K., Murray, A., Hanks, S., Douglas, J., Armstrong, R., Banka, S., et al. (2013). Weaver syndrome and EZH2 mutations: Clarifying the clinical phenotype. *Am. J. Med. Genet. Part A* 161, 2972–2980. doi:10.1002/ajmg.a.36229.
- Tatton-Brown, K., and Rahman, N. (2007). Sotos syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* doi:10.1038/sj.ejhg.5201686.
- Tavano, S., Taverna, E., Kalebic, N., Haffner, C., Namba, T., Dahl, A., et al. (2018). Insm1 Induces Neural Progenitor Delamination in Developing Neocortex via Downregulation of the Adherens Junction Belt-Specific Protein Plekha7. *Neuron*, 1–16. doi:10.1016/j.neuron.2018.01.052.
- Taverna, E., Götz, M., and Huttner, W. B. (2014). *The Cell Biology of Neurogenesis: Toward an Understanding of the Development and Evolution of the Neocortex.* doi:10.1146/annurev-cellbio-101011-155801.
- Telley, L., and Jabaudon, D. (2018). A mixed model of neuronal diversity. *Nature* 555, 452–454.

doi:10.1038/d41586-018-02539-4.

- Tesio, M., and Trumpp, A. (2011). Breaking the cell cycle of HSCs by p57 and friends. *Cell Stem Cell*. doi:10.1016/j.stem.2011.08.005.
- Toropova, K., Zou, S., Roberts, A. J., Redwine, W. B., Goodman, B. S., Reck-Peterson, S. L., et al. (2014). Lis1 regulates dynein by sterically blocking its mechanochemical cycle. *Elife*. doi:10.7554/eLife.03372.
- Toufektchan, E., and Toledo, F. (2018). The guardian of the genome revisited: P53 downregulates genes required for telomere maintenance, DNA repair, and centromere structure. *Cancers (Basel)*. doi:10.3390/cancers10050135.
- Toves, M. M. J. (2009). The role of lis1 in dynein-based transport. *Diss. Abstr. Int. Sect. B Sci. Eng.*
- Toyo-oka, K., Shionoya, A., Gambello, M. J., Cardoso, C., Leventer, R., Ward, H. L., et al. (2003). 14-3-3 $\epsilon$  is important for neuronal migration by binding to NUDEL: a molecular explanation for Miller–Dieker syndrome. *Nat. Genet.* 34.
- Trimborn, M., Bell, S. M., Felix, C., Rashid, Y., Jafri, H., Griffiths, P. D., et al. (2004). Mutations in microcephalin cause aberrant regulation of chromosome condensation. *Am. J. Hum. Genet.* doi:10.1086/422855.
- Tsai, J. W., Bremner, K. H., and Vallee, R. B. (2007). Dual subcellular roles for LIS1 and dynein in radial neuronal migration in live brain tissue. *Nat. Neurosci.* 10, 970–979. doi:10.1038/nn1934.
- Tsai, J. W., Chen, Y., Kriegstein, A. R., and Vallee, R. B. (2005). LIS1 RNA interference blocks neural stem cell division, morphogenesis, and motility at multiple stages. *J. Cell Biol.* 170, 935–945. doi:10.1083/jcb.200505166.
- Tsai, J. W., Lian, W. N., Kemal, S., Kriegstein, A. R., and Vallee, R. B. (2010). Kinesin 3 and cytoplasmic dynein mediate interkinetic nuclear migration in neural stem cells. *Nat. Neurosci.* 13, 1463–1472. doi:10.1038/nn.2665.
- Tsai, L. H., and Gleeson, J. G. (2005). Nucleokinesis in neuronal migration. *Neuron* 46, 383–388. doi:10.1016/j.neuron.2005.04.013.
- Tucker, M. E., Garringer, H. J., and Weaver, D. D. (2007). Phenotypic spectrum of mosaic trisomy 18: Two new patients, a literature review, and counseling issues. *Am. J. Med. Genet. Part A* 143, 505–517. doi:10.1002/ajmg.a.31535.
- Turnbull, J., Lohi, H., Kearney, J. A., Rouleau, G. A., Delgado-Escueta, A. V., Meisler, M. H., et al. (2005). Sacred disease secrets revealed: The genetics of human epilepsy. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2491–2500. doi:10.1093/hmg/ddi250.
- Tuuli, M. G., and Odibo, A. O. (2017). *Walker-warburg syndrome*. Second Edi. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-323-44548-1.00038-3.
- Twelvetrees, A. E. E., Pernigo, S., Sanger, A., Guedes-Dias, P., Schiavo, G., Steiner, R. A. A., et al. (2016). The Dynamic Localization of Cytoplasmic Dynein in Neurons Is Driven by Kinesin-1. *Neuron* 90, 1000–1015. doi:10.1016/j.neuron.2016.04.046.
- Usrey, W. M., and Sherman, S. M. (2019). Corticofugal circuits: Communication lines from the cortex to the rest of the brain. *J. Comp. Neurol.* 527, 640–650. doi:10.1002/cne.24423.
- Uyanik, G., Morris-Rosendahl, D. J., Stiegler, J., Klappecki, J., Gross, C., Berman, Y., et al. (2007). Location and type of mutation in the LIS1 gene do not predict phenotypic severity. *Neurology* 69, 442–447. doi:10.1212/01.wnl.0000266629.98503.d0.
- Uzquiano, A., Gladwyn-Ng, I., Nguyen, L., Reiner, O., Götz, M., Matsuzaki, F., et al. (2018). Cortical progenitor biology: key features mediating proliferation versus differentiation. *J. Neurochem.*



- 146, 500–525. doi:10.1111/jnc.14338.
- Vaid, S., Camp, J. G., Hersemann, L., Oegema, C. E., Heninger, A., Winkler, S., et al. (2018). A novel population of Hopx-dependent basal radial glial cells in the developing mouse neocortex. *Development* 145. doi:10.1242/dev.169276.
- Vajsar, J., and Schachter, H. (2006). Walker-Warburg syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.* 1, 1–5. doi:10.1186/1750-1172-1-29.
- Vazquez, L., and Misra, G. (2019). “Nuclear magnetic resonance,” in *Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources* (Elsevier), 53–76. doi:10.1016/B978-0-12-816548-5.00005-8.
- Vecchione, A., Baldassarre, G., Ishii, H., Nicoloso, M. S., Belletti, B., Petrocca, F., et al. (2007). Fez1/Lzts1 Absence Impairs Cdk1/Cdc25C Interaction during Mitosis and Predisposes Mice to Cancer Development. *Cancer Cell* 11, 275–289. doi:10.1016/j.ccr.2007.01.014.
- Veeraval, L., O’Leary, C. J., and Cooper, H. M. (2020). Adherens Junctions: Guardians of Cortical Development. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 1–17. doi:10.3389/fcell.2020.00006.
- Vousden, K. H., and Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137, 413–431. doi:10.1016/j.cell.2009.04.037.
- Wajuihian, S. . (2016). Down syndrome : An overview An overview of Down syndrome of chromosomal anomalies in. *African Visionand Eye Heal.*, 1–6.
- Wang, L., Hou, S., and Han, Y. G. (2016a). Hedgehog signaling promotes basal progenitor expansion and the growth and folding of the neocortex. *Nat. Neurosci.* 19, 888–896. doi:10.1038/nn.4307.
- Wang, L., Zhou, K., Fu, Z., Yu, D., Huang, H., Zang, X., et al. (2016b). Brain Development and Akt Signaling: the Crossroads of Signaling Pathway and Neurodevelopmental Diseases. *J. Mol. Neurosci.* 61, 379–384. doi:10.1007/s12031-016-0872-y.
- Wang, P. L. (2000). Creating hybrid genes by homologous recombination. *Dis. Markers* 16, 3–13. doi:10.1155/2000/596468.
- Wang, S., Ketcham, S. A., Schon, A., Goodman, B., Wang, Y., Yates, J., et al. (2013a). Nudel/NudE and Lis1 promote dynein and dynactin interaction in the context of spindle morphogenesis. *Mol. Biol. Cell* 24, 3522–3533. doi:10.1091/mbc.E13-05-0283.
- Wang, S., Ketcham, S. A., Schön, A., Goodman, B., Wang, Y., Yates, J., et al. (2013b). Nudel/NudE and Lis1 promote dynein and dynactin interaction in the context of spindle morphogenesis. *Mol. Biol. Cell* 24, 3522–3533. doi:10.1091/mbc.E13-05-0283.
- Wang, X., Tsai, J.-W., LaMonica, B., and Kriegstein, A. R. (2011). A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex. *Nat. Neurosci.* 14, 555–561. doi:10.1038/nn.2807.
- Wickstead, B., and Gull, K. (2007). Dyneins across eukaryotes: A comparative genomic analysis. *Traffic* 8, 1708–1721. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00646.x.
- Wijdicks, E. F. M. (2018). The First CT Scan of the Brain: Entering the Neurologic Information Age. *Neurocrit. Care* 28, 273–275. doi:10.1007/s12028-017-0495-3.
- Wilson, G. R., Sim, J. C. H., McLean, C., Giannandrea, M., Galea, C. A., Riseley, J. R., et al. (2014). Mutations in RAB39B cause X-linked intellectual disability and early-onset parkinson disease with  $\alpha$ -synuclein pathology. *Am. J. Hum. Genet.* doi:10.1016/j.ajhg.2014.10.015.
- Wilson, S. I., and Edlund, T. (2001). Neural induction: Toward a unifying mechanism. *Nat. Neurosci.* 4, 1161–1168. doi:10.1038/n747.
- Winden, K. D., Yuskaitis, C. J., and Poduri, A. (2015). Megalencephaly and macrocephaly. *Semin. Neurol.* 35, 277–287. doi:10.1055/s-0035-1552622.

- Wong, F. K., Fei, J. F., Mora-Bermúdez, F., Taverna, E., Haffner, C., Fu, J., et al. (2015). Sustained pax6 expression generates primate-like basal radial glia in developing mouse neocortex. *PLoS Biol.* 13. doi:10.1371/journal.pbio.1002217.
- Wong, M., and Roper, S. N. (2016). Genetic animal models of malformations of cortical development and epilepsy. *J. Neurosci. Methods* 260, 73–82. doi:10.1016/j.jneumeth.2015.04.007.
- Woodbury-Smith, M., Deneault, E., Yuen, R. K. C., Walker, S., Zarrei, M., Pellicchia, G., et al. (2017). Mutations in RAB39B in individuals with intellectual disability, autism spectrum disorder, and macrocephaly. *Mol. Autism.* doi:10.1186/s13229-017-0175-3.
- Wynshaw-Boris, A., and Gambello, M. J. (2001). LIS1 and dynein motor function in neuronal migration and development. *Genes Dev.* 15, 639–651. doi:10.1101/gad.886801.
- Xu, C., and Min, J. (2011). Structure and function of WD40 domain proteins. *Protein Cell* 2, 202–214. doi:10.1007/s13238-011-1018-1.
- Xu, C. S., Januszewski, M., Lu, Z., Takemura, S., Hayworth, K., Huang, G., et al. (2020). A Connectome of the Adult *Drosophila* Central Brain. *bioRxiv*, 2020.01.21.911859. doi:10.1101/2020.01.21.911859.
- Yamada, M., Kumamoto, K., Mikuni, S., Arai, Y., Kinjo, M., Nagai, T., et al. (2013). Rab6a releases LIS1 from a dynein idling complex and activates dynein for retrograde movement. *Nat. Commun.* 4, 1–10. doi:10.1038/ncomms3033.
- Yamada, M., Toba, S., Yoshida, Y., Haratani, K., Mori, D., Yano, Y., et al. (2008). LIS1 and NDEL1 coordinate the plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein. *EMBO J.* 27, 2471–2483. doi:10.1038/emboj.2008.182.
- Yarden, Y., and Shilo, B. Z. (2007). SnapShot: EGFR Signaling Pathway. *Cell.* doi:10.1016/j.cell.2007.11.013.
- Yingling, J., Toyo-oka, K., and Wynshaw-Boris, A. (2003). Miller-Dieker Syndrome: Analysis of a Human Contiguous Gene Syndrome in the Mouse. *Am. J. Hum. Genet.* 73, 475–488. doi:10.1086/378096.
- Yingling, J., Youn, Y. H., Darling, D., Toyo-oka, K., Pramparo, T., Hirotsune, S., et al. (2008). Neuroepithelial Stem Cell Proliferation Requires LIS1 for Precise Spindle Orientation and Symmetric Division. *Cell* 132, 474–486. doi:10.1016/j.cell.2008.01.026.
- Youn, Y. H., Pramparo, T., Hirotsune, S., and Wynshaw-Boris, A. (2009). Distinct Dose-Dependent Cortical Neuronal Migration and Neurite Extension Defects in Lis1 and Ndel1 Mutant Mice. *J. Neurosci.* 29, 15520–15530. doi:10.1523/JNEUROSCI.4630-09.2009.
- Yu, M., Sun, X., Tyler, S. R., Liang, B., Swatek, A. M., Lynch, T. J., et al. (2019). Highly Efficient Transgenesis in Ferrets Using CRISPR/Cas9-Mediated Homology-Independent Insertion at the ROSA26 Locus. *Sci. Rep.* 9, 1–13. doi:10.1038/s41598-018-37192-4.
- Yu, T. W., Mochida, G. H., Tischfield, D. J., Sgaier, S. K., Flores-Sarnat, L., Sergi, C. M., et al. (2010). Mutations in WDR62, encoding a centrosome-associated protein, cause microcephaly with simplified gyri and abnormal cortical architecture. *Nat. Genet.* doi:10.1038/ng.683.
- Zaqout, S., Morris-Rosendahl, D., and Kaindl, A. M. (2017). Autosomal Recessive Primary Microcephaly (MCPH): An Update. *Neuropediatrics.* doi:10.1055/s-0037-1601448.
- Zecevic, N. (2004). Specific characteristic of radial glia in the human fetal telencephalon. *Glia* 48, 27–35. doi:10.1002/glia.20044.
- Zhang, W., Ma, L., Yang, M., Shao, Q., Xu, J., Lu, Z., et al. (2020). Cerebral organoid and mouse models reveal a RAB39b–PI3K–mTOR pathway-dependent dysregulation of cortical development leading to macrocephaly/autism phenotypes. *Genes Dev.*, 580–597.

doi:10.1101/gad.332494.119.

- Zhang, X., Huang, C. T., Chen, J., Pankratz, M. T., Xi, J., Li, J., et al. (2010). Pax6 Is a Human Neuroectoderm Cell Fate Determinant. *Stem Cell* 7, 90–100. doi:10.1016/j.stem.2010.04.017.
- Zhou, W., He, M. R., Jiao, H. L., He, L. Q., Deng, D. L., Cai, J. J., et al. (2015). The tumor-suppressor gene LZTS1 suppresses colorectal cancer proliferation through inhibition of the AKT-mTOR signaling pathway. *Cancer Lett.* doi:10.1016/j.canlet.2015.02.004.
- Zori, R. T., Marsh, D. J., Graham, G. E., Marliss, E. B., and Eng, C. (1998). Germline PTEN mutation in a family with Cowden syndrome and Bannayan-Riley-Ruvalcaba Syndrome. *Am. J. Med. Genet.* doi:10.1002/(sici)1096-8628(19981204)80:4<399::aid-ajmg18>3.3.co;2-f.
- Zou, P., Yoshihara, H., Hosokawa, K., Tai, I., Shinmyozu, K., Tsukahara, F., et al. (2011). P57 Kip2 and p27 Kip1 cooperate to maintain hematopoietic stem cell quiescence through interactions with Hsc70. *Cell Stem Cell.* doi:10.1016/j.stem.2011.07.003.
- Zytkiewicz, E., Kijańska, M., Choi, W. C., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., and Stukenberg, P. T. (2011). The N-terminal coiled-coil of Ndel1 is a regulated scaffold that recruits LIS1 to dynein. *J. Cell Biol.* 192, 433–445. doi:10.1083/jcb.201011142.