



**Université de Liège**  
Giga-Neurosciences

# **Influence des formes mutées d'EFHC1 (ou myoclonine 1), une protéine impliquée dans l'épilepsie myoclonique juvénile, sur la corticogenèse cérébrale**



**Nathalie Wolkoff**

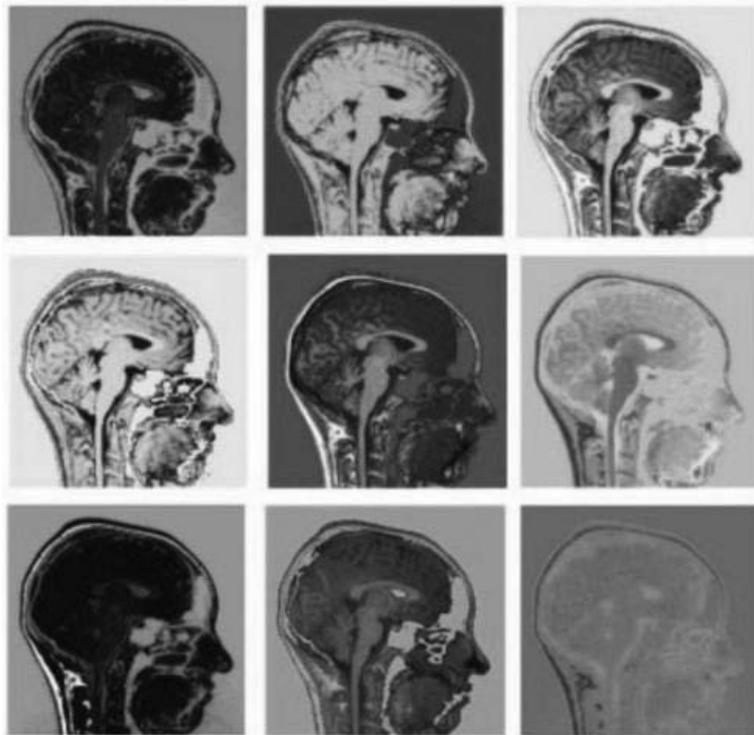
Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de  
Docteur en sciences biomédicales et pharmaceutiques

Année académique 2014-2015



**Université de Liège**  
Giga-Neurosciences

# **Influence des formes mutées d'EFHC1 (ou myoclonine 1), une protéine impliquée dans l'épilepsie myoclonique juvénile, sur la corticogenèse cérébrale**



**Nathalie Wolkoff**

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de  
Docteur en sciences biomédicales et pharmaceutiques

Année académique 2014-2015



## *Remerciements*

Je tiens tout d'abord à exprimer toutes ma gratitude au Professeur Thierry Grisar pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse dans son laboratoire. Sa passion pour la science, son enseignement et l'attention critique qu'il a porté à mes travaux m'ont permis de grandir tout au long de mon travail de chercheur.

Mes remerciements vont ensuite au Docteur Bernard Lakaye qui a été présent tout au long de ce travail. Il a toujours été disponible pour donner des conseils, pour partager son expérience de la recherche, pour écouter mes questions et il s'est toujours intéressé à l'avancé de mes travaux. Enfin, je le remercie aussi pour ses nombreuses relectures et corrections de cette thèse.

J'adresse mes plus profonds remerciements au Docteur Laurence de Nijs de m'avoir supervisée tout au long de ces quatre années de thèse. Je te remercie pour toutes les choses que tu m'as apprises non seulement au niveau scientifique telles que la rigueur, la patience, la mais beaucoup d'autres choses trop longues à énumérer. Tu m'as permis de progresser tout au long de ces années. Même dans tes « contrées lointaines », tu es toujours restée disponible en toute circonstance. Merci pour tout !

Je voudrais également remercier Laurie, Sophie Harray et encore Laurence pour avoir partagé durant ces quatre années ce bureau avec moi. Comment décrire ces quatre années avec vous : joie et bonne humeur étaient perpétuellement au programme. Nous avons partagé bien plus qu'un bureau. Je me rappelle de ces petits diners improvisés à l'Amirauté ou encore sur le village gaulois pour le plaisir de se retrouver autour d'un bon repas ou d'un bon cocktail. Laurie, ne change surtout pas. La folie qui t'anime est un peu surprenante au départ mais cela fait de toi une personne très spéciale. Je te souhaite plein de bonheur avec ton grand et petit chaton. Sophie, cette passion pour le jardinage est parfois étonnante et j'espère que tu arriveras à faire fleurir ta thèse à un moment donné. Je tiens également à remercier Arlette, Bernard C. et Gerry pour leur gentillesse, leur sympathie et leur bonne humeur.

J'attribue également une mention toute spéciale à Sophie Laguesse avec qui nous avons partagé tellement de moments particuliers de notre vie, avec des réunions au sommet qui étaient parfois plus que nécessaires. Je te remercie sincèrement pour ton soutien, ta présence, tes conseils aussi bien professionnels que personnels. J'espère que tu vas trouver le post-doc de tes rêves à l'autre bout du monde.

## *Remerciements*

Je remercie aussi les membres du « noyau dur » Benja et Béné pour avoir partagé de nombreuses fêtes improvisées. Certes, le « noyau dur » est moins actif mais ces moments étaient si spontanés avec parfois des effets un « peu dévastateur ». Merci encore à Benja pour être le grand instigateur de tous les petits verres du vendredi.

Je remercie tout particulièrement les supers techniciens Alex, PB, Alice pour leurs précieux conseils, leur aide et toutes les discussions que nous avons pu partager.

Ces années au giga-neurosciences m'auront également permis de rencontrer Niko, Neville, Nico J., my favorite little Indian Deb. J'ai été ravie de vous côtoyer pendant toutes ces années.

Je voudrais également remercier les Professeurs Bernard Rogister et Vincent Seutin ainsi que les docteurs Gaëtan Garraux Lucien Bettendorf, Laurent Nguyen, Brigitte Malgrange, Dominique Engel, Pierre Leprince et Rachelle Franzen pour leurs conseils scientifiques et leur soutien.

Je remercie également toute les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin à la réalisation et à l'amélioration de ce travail.

Je remercie également tous les membres du Giga-Neurosciences pour leur sympathie, leur gentillesse, leur bonne humeur : Aurore, Greg, Julie, Coralie, Sandra, Pierre-Paul, Lari, Laurence Delacroix, Juliette, Elise, Priscilla, Sylvia, Carla, Nico C., Catherine et à la nouvelle génération Valérie, Quentin, Angélique, Mathias.

Je ne peux évidemment pas oublier de remercier ma famille et en particulier mes parents qui m'ont soutenu durant toutes ces années et qui m'ont donné la chance de pouvoir suivre toutes ces études. Je vous promets que maintenant j'arrête. Je vous remercie sincèrement pour tout ce que vous m'apportez au quotidien. Merci de m'avoir aidé à me construire tout au long de ces années!

Finalement, je terminerai par remercier Max pour son amour, sa compréhension et son soutien durant cette année.

## **Liste des abréviations**

AAA : ATPases associated with diverse of cellular activities  
AD : autosomique dominant  
ADFLNE : “autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy “  
ADN : acide desoxyribonucléique  
ADP : adénosine diphosphate  
AMPA :  $\alpha$ -amino -3-hydroxy -5-méthyl -4-acide isoazolepropionique  
AR : autosomique récessif  
ARN : acide ribonucléique  
ARNi : ARN interférence  
ATP : adénosine triphosphate  
BLBP : “brain lipid-binding protein”  
BDNF: facteur neurotrophique dérivé du cerveau  
BRD2 : « bromodomaine containing 2 »  
BrdU : 5'-bromo-2'-déoxyuridine  
CA: corne d'ammon  
CACNB4 : sous- unité  $\beta$ 4 du canal calcium voltage-dépendant de type L  
CamKII : protéine kinase II calcium/calmoduline dépendante  
CaSR : récepteur senseur du canal calcium  
Cx-36 : connexine 36  
CACNB4 : sous-unité  $\beta$ 4 du canal calcique voltage-dépendant de type L  
CGE : éminence ganglionnaire caudale  
CRMP2 : protéine 2 médiant la réponse de la collapsine  
Cx : cortex  
DCX: double cortine  
DISC1: “Disrupted in schizophrenia 1”  
EEG : électroencephalogramme  
EFHC1 : “EF-hand containing 1”  
EGFP : “Enhanced Green Fluorescent Protein”  
EMJ : épilepsie myoclonique juvénile  
GABA : acide  $\gamma$ -aminobutyrique  
GABARD : sous-unité  $\delta$  du récepteur GABA<sub>A</sub>  
GABRA1 : la sous-unité  $\alpha$  1 du récepteur au GABA<sub>A</sub>  
GEFS+ : épilepsie généralisée avec convulsions fébriles plus  
GDP: guanosine diphosphate  
GFP : “Green Fluorescent Protein”  
GTP: guanosine triphosphate  
HEK : “Human Embryonic Kidney”  
HLA : complexe majeure d'histocompatibilité  
ILAE : « international ligue against epilepsy »  
IP : progéniteur intermédiaire  
IRM : imagerie par résonance magnétique

IZ : zone intermédiaire  
kDa : kiloDalton  
Lis1 : lissencéphalie 1  
LV : ventricule latéral  
LGE : éminence ganglionnaire latérale  
LDP : dépression à long terme  
LTP : potentialisation à long terme  
NAD<sup>+</sup> : nicotinamide adénine dinucleotide (forme oxydée)  
NADH : nicotinamide adénine dinucleotide (forme réduite)  
NDLE1 : “nuclear distribution element like 1”  
NMDA : N-méthyl-D-aspartate  
MAGUK : protéines kinases guanylate associées à la membrane  
MAP : « microtubule associated protein »  
ME2 : « malic enzyme 2 »  
MGE : éminence ganglionnaire médiane  
MTOC : centre d’organisation des microtubules  
MZ : zone marginale  
SER : réticulum endoplasmique lisse  
PGL : progéniteurs de glie radiaire  
PHH3 : phospho-Histone H3  
PMGS : sialidase ganglioside du plasma  
PP : pré-plaque  
PSD : “post synaptic density”  
Rap1 : “Ras-related protein 1”  
RFP : “red fluorescent protein”  
sh RNA : “small harpin ARN”  
siRNA : “small interfering ARN”  
SNP : polymorphisme d’un seul nucléotide  
SVZ : zone sous-ventriculaire  
SP : sous-plaque  
TEP : Tomographie par émission de positrons  
+TIPS : “plus end tracking protein”  
TRPM2 : “transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2”  
 $\gamma$ -TuRC : “ $\gamma$ -tubulin ring complex”  
VZ : zone ventriculaire

**Introduction : l'épilepsie myoclonique juvénile et le gène EFHC1**

<b>1. Les épilepsies.....</b>	<b>1</b>
1.1. Historique .....	1
1.2. Définition.....	1
1.3. Epidémiologie.....	2
1.4. Classification .....	3
1.5. Les mutations génétiques accompagnant certains syndromes épileptiques .....	5
1.5.1. Les chromosopathies .....	6
1.5.2. Les syndromes épileptiques se transmettant par un mode mendélien.....	6
1.5.3. Syndromes épileptiques se transmettant selon une hérédité plurifactorielle.....	7
<b>2. L'épilepsie myoclonique juvénile .....</b>	<b>7</b>
2.1. Historique .....	7
2.2. Définition et Epidémiologie .....	7
2.3. Présentation clinique.....	8
2.4. Les gènes de l'EMJ.....	10
2.4.1. Les SNPs associés à l'EMJ .....	10
2.4.2. Les mutations associées à l'EMJ.....	11
<b>3. EFHC1.....</b>	<b>14</b>
3.1. Les mutations d'EFHC1 associés à l'EMJ .....	15
3.2. Les domaines d'EFHC1.....	16
3.2.1. Domaine EF-hand .....	16
3.2.2. Les domaines DM10 .....	18
3.3. Les propriétés d'EFHC1 .....	18
3.3.1. EFHC1, un senseur calcique pro-apoptotique.....	19
3.3.2. EFHC1 est une protéine impliquée dans la fonction des cils.....	19
3.3.3. La souris EFHC1 KO .....	20
3.3.4. EFHC1 est une MAP requise pour la division cellulaire et la migration neuronale .....	21
<b>4. Objectif.....</b>	<b>23</b>

**Chapitre 1 et publication n°1 : l'influence des mutations d'EFHC1 sur la division et la migration des neurones dans le cortex cérébral en développement**

<b>1. Introduction</b> .....	<b>24</b>
1.1. La division cellulaire .....	24
1.2. Le centrosome.....	25
1.3. La corticogenèse .....	26
1.3.1. La migration radiaire .....	27
1.3.1.1. La neurogenèse .....	27
1.3.1.2. La mise en place des couches corticales : migration « inside-out » .....	28
1.3.2. La migration tangentielle .....	31
<b>2. Résultats (Publication n° 1)</b> .....	<b>32</b>
2.1. Les mutations d'EFHC1 étudiées .....	33
2.2. Localisation subcellulaire des formes mutées et polymorphiques d'EFHC1 .....	34
2.3. Les mutations d'EFHC1 induisent des anomalies de fuseau mitotique .....	37
2.4. Les mutations d'EFHC1 altèrent la migration radiaire des neurones de projections corticaux .....	39
2.5. Les formes mutées d'EFHC1 n'affectent pas la prolifération cellulaire et la sortie de cycle cellulaire.....	41
2.6. Les mutants d'EFHC1 affectent la morphologie de la glie radiaire et des neurones de projections .....	43
2.7. Les mutants d'EFHC1 affectent la migration tangentielle des interneurones .....	45
<b>3. Discussion et conclusions préliminaires</b> .....	<b>47</b>

**Chapitre 2 : L'influence des mutations d'EFHC1 mutée sur la différenciation terminale des neurones dans le cortex cérébral**

<b>1. Introduction</b> .....	<b>52</b>
1.1. Généralités .....	52
1.2. Le cytosquelette de microtubules neuronal .....	53
1.2.1. Les microtubules .....	53

1.2.2. La dynamique des microtubules.....	54
1.3. La polarisation neuronale .....	57
1.4. La croissance axonale .....	58
1.4.1. Le cône de croissance.....	58
1.4.2. L'extension de l'axone.....	60
1.5. Le développement des dendrites.....	60
1.6. Les épines dendritiques .....	61
1.6.1. Généralités.....	61
1.6.2. La morphologie des épines.....	62
1.6.3. Les microtubules et les épines.....	64
<b>2. Résultats .....</b>	<b>64</b>
2.1. Influence des mutations d'EFHC1 sur la migration radiaire à P5 .....	65
2.2. L'axonogenèse est ralentie en présence d'une mutation d'EFHC1 .....	66
2.3. La dendritogenèse est ralentie en présence d'une mutation d'EFHC1 .....	68
2.4. La dynamique des microtubules est altérée lors de la surexpression de la protéine mutée 74	
2.5. Les mutations d'EFHC1 altèrent la densité des épines dendritiques.....	75
<b>3. Discussion et conclusions préliminaires .....</b>	<b>77</b>
<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>81</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>87</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>97</b>



## **Introduction :**

# **L'épilepsie myoclonique juvénile et le gène EFHC1**



# **1. Les épilepsies**

## **1.1. Historique**

Les premières descriptions de l'épilepsie datent du temps des babyloniens (2000 ans ACN). Une tablette d'un manuel de médecine de cette époque décrit de façon précise un grand nombre de types de crises bien connus actuellement. Elle met également en valeur le caractère surnaturel de l'épilepsie ; chaque type de crise était associé au nom d'un esprit ou d'un dieu, généralement maléfisant. Chez les Grecs, au Vème siècle ACN, cette maladie était nommée « la maladie sacrée », dont on retrouve la description dans un célèbre traité d'Hippocrate du même nom. Le terme « épilepsie » provient d'ailleurs du verbe grec « epilambanein », qui signifie « saisir ou attaquer ». Hippocrate associait quant à lui cette pathologie non pas à une maladie sacrée mais plutôt à un dérèglement cérébral. Cependant, ce n'est qu'au XVIIIème siècle que l'épilepsie a commencé à être acceptée comme un dysfonctionnement cérébral. Avant cette période, ce sont des conceptions superstitieuses et surnaturelles qui prévalaient. Les origines de la théorie moderne de la physiopathologie de l'épilepsie remontent au XIXème siècle. En 1873, Hughlings Jackson, un neurologue anglais, a postulé que les crises étaient le résultat de décharges brutales d'énergie électrochimique dans le cerveau et que le caractère des crises était lié à l'emplacement et à la fonction du site des décharges. Par après, en 1920, le psychiatre Hans Berger découvrit l'électroencéphalogramme (EEG). En effet, l'EEG a montré la présence de décharges électriques et l'existence de plusieurs types d'ondes pouvant être reliés à différents types de crises. Grâce aux avancées technologiques, via notamment l'avènement de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et de la tomographie par émission de positrons (TEP), de nombreuses améliorations sur la compréhension et le traitement de l'épilepsie ont pu être réalisées (Wolf, 1992).

## **1.2. Définition**

Les épilepsies sont des affections chroniques du système nerveux central caractérisées par la récurrence d'épisodes cliniques paroxystiques appelés « crises d'épilepsie ». Celles-ci sont le résultat d'un dysfonctionnement transitoire d'une population de neurones plus ou

moins étendue du cortex cérébral présentant des décharges excessives (hyperexcitabilité), soudaines et hypersynchrones. On admet qu'une telle situation résulte à la fois de modifications de propriétés intrinsèques de ces neurones, avec réduction des seuils d'excitabilité, et/ou de remaniements synaptiques corticaux.

Par ailleurs, il faut distinguer le terme « crise épileptique » du terme « épilepsie ». En effet, la « crise épileptique » correspond à un état anormal ponctuel de l'activité du cerveau qui peut disparaître lorsque la cause est enlevée. Par contre, le terme « épilepsie » correspond à une condition neurologique chronique accompagnée de caractéristiques pathophysiologiques permanentes (Thomas, 2000).

Un syndrome épileptique se définit par :

- Les différents types de crises, définis par leur topographie, leur phénoménologie, leur sévérité et récurrence.
- Le contexte clinique (âge de début, antécédents familiaux et personnels, histoire clinique...).
- Les données EEG critiques et intercritiques.
- L'étiologie (génétique, lésionnelle, toxique...) aidée par l'imagerie et la génétique moléculaire.
- Le pronostic.

### **1.3. Epidémiologie**

D'après l'organisation mondiale de la santé, les épilepsies sont considérées comme un problème de santé publique important. En effet, cette maladie ne possède pas de frontières géographiques, raciales ou sociales et elle peut frapper les deux sexes à tout âge et particulièrement pendant la petite enfance, l'enfance, l'adolescence et la vieillesse. De plus, jusqu'à 5% de la population peut subir une crise unique à un moment donné dans sa vie. Néanmoins, le diagnostic d'épilepsie est attribué aux personnes qui ont au moins deux crises récurrentes ou des crises répétées. L'incidence de cette maladie, c'est-à-dire le nombre de nouveaux cas diagnostiqués pendant une période donnée, est estimé à 50 pour 100 000 pour

l'ensemble de la population, mais ce chiffre peut atteindre jusque 100 pour 100 000 dans les pays en développement (Bell and Sander, 2001). En effet, les populations de ces régions sont plus affectées par des agressions cérébrales telles que les encéphalites, les méningites, les traumatismes crâniens... Par ailleurs, la prévalence de cette maladie, c'est-à-dire la proportion de personnes souffrant de cette maladie à un moment donné, est de 8.2 cas pour 1000 personnes, ce qui signifie qu'il y a environ 58 millions d'épileptiques dans le monde (Tripathi and Jain, 2003).

#### 1.4. Classification

La classification internationale des crises d'épilepsies et des syndromes épileptiques fut adoptée en (2010) par la ligue internationale contre l'épilepsie (ILAE) (Tableau 1). En bref, la classification des crises d'épilepsies comprend un axe symptomatologique et un étiopathologique:

- Les *épilepsies généralisées* qui impliquent de façon diffuse les aires corticales et sous-corticales des deux hémisphères cérébraux simultanément. Elles sont généralement accompagnées de manifestations motrices qui sont d'emblée bilatérales et symétriques. Ces symptômes moteurs convulsifs peuvent être de différents types : la crise tonique (contraction prolongée et continue), la crise clonique ou myoclonique (secousses myocloniques brèves et répétées) et la crise tonico-clonique appelée aussi « grand mal » (succession de contractions prolongées suivies de secousses myocloniques). Dans cette catégorie se classe également des crises généralisées non convulsives appelées absence.
- Les *épilepsies focales ou partielles* dans lesquelles les crises naissent dans un secteur limité à certaines structures corticales appelé la zone épileptogène. Cette zone est constituée d'une population neuronale circonscrite à une seule partie d'un hémisphère. La propagation de la décharge peut se limiter au foyer focal ou s'étendre à tout un hémisphère ou encore se généraliser et donc embraser les deux hémisphères.

La classification s'effectue selon deux axes, à savoir un axe symptomatologique et étiopathogénique. Elle est reprise dans le tableau 1 ci-dessous.

**Tableau 1 : Classification internationale des épilepsies et syndromes épileptiques adapté de (Thomas, 2000)**

---

<b>1. Epilepsie et syndrome épileptiques focaux</b>
<i>Génétiques, liés à l'âge :</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Epilepsie bénigne de l'enfance à paroxysme rolandiques</li><li>- Epilepsie bénigne de l'enfance à paroxysme occipitaux</li><li>- Epilepsie primaire de la lecture</li></ul>
<i>Structurales/métaboliques :</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Syndrome de Kojewnikow ou épilepsie partielle continue</li><li>- Epilepsie lobaire<ul style="list-style-type: none"><li>• Epilepsie du lobe temporal</li><li>• Epilepsie du lobe frontal</li><li>• Epilepsie du lobe pariétal</li><li>• Epilepsie du lobe occipital</li></ul></li></ul>
<i>De cause inconnue</i>
<b>2. Epilepsies et syndromes épileptiques généralisés</b>
<i>Génétiques, liés à l'âge par ordre chronologique :</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Convulsion néonatale familiales bénignes</li><li>- Convulsion néonatales bénignes</li><li>- Epilepsie myoclonique bénigne de l'enfance</li><li>- Epilepsie-absence de l'enfance</li><li>- Epilepsie-absence de l'adolescence</li><li>- Epilepsie myoclonique juvénile</li><li>- Epilepsie à crises Grand Mal du réveil</li><li>- Epilepsie à crises précipitées par certaines modalités spécifiques</li></ul>
<i>De cause inconnue ou structurale/métabolique :</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Spasmes infantiles (syndrome de West)</li><li>- Syndrome de Lennox-Gastaut</li><li>- Epilepsie avec des crises myoclonico-astatiques</li><li>- Epilepsie avec absences myocloniques</li></ul>
<i>Structurales/métaboliques :</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Sans étiologie spécifique<ul style="list-style-type: none"><li>• Encéphalopathie myoclonique précoce</li><li>• Encéphalopathie infantile avec suppression de burst</li><li>• Autre</li></ul></li><li>- <i>Syndromes spécifiques</i></li></ul>
De nombreuses étiologies métaboliques ou dégénératives peuvent entrer dans ce cadre
<b>3. Epilepsie dont le caractère focal ou généralisé n'est pas déterminé</b>
<i>Association de crises généralisées et partielles :</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Crises néonatales</li><li>• Epilepsie myoclonique sévère</li><li>• Epilepsie avec pointes-ondes continues pendant le sommeil lent</li><li>• Epilepsie avec aphasia acquise (syndrome de Landau-Kleffner)</li></ul>
<b>4. Syndromes spéciaux</b>
<i>Crises occasionnelles, liées à une situation épileptogène transitoire :</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Convulsion fébriles</li><li>• Crises uniquement précipitées par un facteur toxique ou métabolique</li></ul>
<i>Crise isolée, état de mal isolé</i>

---

L'axe étiopathologique comporte trois sous-catégories (Berg et al., 2010) :

- Les *épilepsies génétiques* regroupent les maladies épileptiques avec une prédisposition génétique réelle ou présumée. Elles surviennent indépendamment de toute lésion cérébrale.
- Les *épilepsies structurales/métaboliques* définies comme des épilepsies dont la cause est liée à une anomalie structurelle ou métabolique acquise (ischémie, traumatisme, infection, tumeur, ...) ou d'origine génétique (sclérose tubéreuse, anomalies du développement cérébrale,...). Elles résultent généralement de lésions structurelles diffuses ou focales, évolutives ou fixées au niveau du système nerveux.
- Les *épilepsies dont la cause est inconnue* sont des épilepsies qui ne correspondent à aucune épilepsie génétique connue, et qui surviennent sans que les examens puissent mettre en évidence une lésion causale, qui est cependant suspectée.

### **1.5. Les mutations génétiques accompagnant certains syndromes épileptiques**

Comme nous venons de le voir, les épilepsies constituent un groupe d'affections neurologiques très variées qui partagent en commun l'existence d'anomalies de l'excitabilité corticale se manifestant par des crises cliniques. Elles résultent de la conjonction de facteurs génétiques et de facteurs acquis. Selon les cas, l'un des facteurs est prédominant.

Les épilepsies génétiques peuvent être classées en plusieurs groupes : les épilepsies associées à des syndromes caractérisés par des anomalies chromosomiques détectables par des analyses cytogénétiques (chromosopathie), les épilepsies entrant dans le cadre de syndromes complexes se transmettant par un mode mendélien et finalement les épilepsies génétiques se transmettant selon une hérédité plurifactorielle pouvant être parfois monogénique mais qui sont le plus souvent polygénique (Thomas, 2000)

### **1.5.1. Les chromosopathies**

Les anomalies chromosomiques responsables d'un retard mental sont données notamment par la trisomie 21 et le syndrome du X-fragile. Ainsi, dans la trisomie 21, la prévalence de l'épilepsie augmente avec l'âge des patients pouvant atteindre jusque 12% après 35 ans. Dans le syndrome de l'X-fragile, un quart des patients présente une épilepsie. D'autres anomalies chromosomiques s'accompagnent toujours d'une épilepsie comme le syndrome d'Angelman, la monosomie partielle 4p, la trisomie 12p (Thomas, 2000), et le syndrome du chromosome 14 en anneau.

### **1.5.2. Les syndromes épileptiques se transmettant par un mode mendélien**

Il existe plus de 150 maladies génétiques qui dans leur tableau clinique présentent des épilepsies. Le mode de transmission de ces maladies neurologiques accompagnées d'épilepsie est une hérédité mendélienne (monogénique) autosomale dominante ou récessive. Ce groupe, très hétérogène, représente moins de 1% des épilepsies. Il comprend les phacomatoses (sclérose tubéreuse de Bournonville, la maladie de Sturge-Weber,...), les épilepsies myocloniques progressives (la maladie de Lafora, la maladie d'Unverricht-lundborg,...), ainsi que de nombreuses maladies métaboliques telles que les lipidoses, la maladie du cycle de l'urée, la maladie du métabolisme des purines (Thomas, 2000).

Par ailleurs, pour de rares formes d'épilepsie généralisées ou partielles, des études de liaisons ont permis d'identifier les loci chromosomiques, le gène muté. Nous pouvons citer par exemple les convulsions néonatales familiales bénignes qui sont liées à une mutation située soit au niveau du chromosome 20 (20q13.3), qui code pour le canal potassique KCNQ2, soit au niveau du chromosome 8 (8q24), qui code pour le canal potassique KCNQ3. De plus, l'épilepsie frontale nocturne autosomale dominante résulte d'une mutation d'un gène situé sur le chromosome 20 qui code la sous-unité  $\alpha$ -4 du récepteur à l'acétylcholine. De même, certaines formes de convulsions fébriles familiales sont liées au chromosome 8, 19p et 19q. Dans ce dernier cas, le gène en cause encode un canal sodique. Ces maladies sont généralement définies comme des « canalopathies » (Thomas, 2000).

### **1.5.3. Syndromes épileptiques se transmettant selon une hérédité plurifactorielle**

Dans d'autres syndromes d'épilepsie génétique, l'hérédité est plurifactorielle, c'est-à-dire qu'elle résulte de la coopération de plusieurs gènes et de facteurs environnementaux. La détection des différents gènes s'effectue par des approches génétiques humaines variées telles que les études de concordance entre les jumeaux monozygotes et dizygotes ou la généalogie familiale associée aux techniques de liaison (Thomas, 2000).

D'autres modes de transmission sont également possibles : l'hérédité liée au sexe (Syndrome d'Aicardi, lissencéphalie,...) ou encore une hérédité liée à l'ADN mitochondrial (encéphalomyopathies mitochondriales) (Thomas, 2000).

## **2. L'épilepsie myoclonique juvénile**

### **2.1. Historique**

En 1897, Herpin observa le cas d'un adolescent de 13 ans qui développait des secousses corporelles se généralisant trois mois plus tard. Il a été ainsi le premier à décrire les caractéristiques cliniques de l'épilepsie myoclonique juvénile (EMJ). En 1957, Janz et Christian ont décrit 47 cas et ont proposé le nom de « petit mal impulsif ». En 1975, ce syndrome fut appelé « épilepsie myoclonique juvénile » par Lund. Finalement, en 1989, la l'ILAE suggère que « épilepsie myoclonique juvénile » et « petit mal impulsif » sont équivalents (Wolf, 1992).

### **2.2. Définition et Epidémiologie**

L'épilepsie myoclonique juvénile est la forme la plus fréquente d'épilepsie génétique généralisée (26,7%). Elle représente 4,1% de toutes les épilepsies (Delgado-Escueta et al.,

2013). L'EMJ est caractérisée par des secousses myocloniques, des crises tonico-cloniques généralisées et moins fréquemment des absences. L'incidence de cette maladie est de 1 pour 100 000 avec une prévalence de 0.1 à 0.2 pour 100 000 (Grunewald and Panayiotopoulos, 1993). De nouvelles études montrent qu'elle toucherait plus les femmes que les hommes puisque 60% des patients sont des femmes (Baise-Zung et al., 2006).

L'âge d'apparition des premières crises se situe entre 8 et 26 ans. Mais dans 79% des cas, les patients sont âgés de 12 à 18 ans (Wolf, 1992). Les secousses myocloniques sont présentes chez tous les patients. Elles sont associées à des crises tonico-cloniques dans 80 à 97% et dans 12 à 54% à des absences. Au sein de l'EMJ, quatre sous-syndromes (2 majeurs et 2 mineurs) peuvent être identifiés. Le premier sous-syndrome majeur (72% des cas) est l'EMJ classique (sans absence) qui se caractérise par des myoclonies matinales entre 13 et 15 ans et l'apparition de crises tonico-cloniques environ deux ans plus tard. Le deuxième sous-syndrome majeur (18% des cas) est une épilepsie absence de l'enfance qui va évoluer en EMJ. Le troisième sous-syndrome (7% des cas), mineur celui-ci, débute généralement pendant l'adolescence ou après 18 ans. Il présente des myoclonies et des crises tonico-cloniques avec absence. Finalement, le dernier sous-syndrome (3% des cas), mineur lui aussi, consiste en des crises atatiques durant l'adolescence accompagnées de crises myocloniques et tonico-cloniques (Martinez-Juarez et al., 2006).

### **2.3. Présentation clinique**

La principale caractéristique de cette maladie est la présence de secousses myocloniques. Celles-ci sont généralement bilatérales, arythmiques, rapides, pas toujours symétriques et elles peuvent être simples ou répétitives et enfin d'amplitude variable. La plupart du temps, les muscles extenseurs des membres supérieurs sont affectés. Néanmoins, certains rapports montrent que les secousses peuvent toucher les jambes, entraînant la chute des patients. Par ailleurs, ceux-ci sont généralement conscients durant les crises. Les crises sont le plus souvent présentes au début de l'endormissement ou au réveil et favorisées par le manque de sommeil, la fatigue, le stress, la consommation d'alcool et les stimulations lumineuses (Wolf, 1992).

Sur l'EEG, les secousses myocloniques se repèrent par l'apparition de bouffées bilatérales, symétriques et synchrones de poly-pointe ondes particulièrement présentes dans les régions frontales et centrales. Le nombre de décharges varie entre 5 et 20 pointes dont la fréquence est de 12 à 16 Hz. Durant la crise, l'amplitude des pointes est croissante pouvant atteindre jusque 200 à 300 mV. De plus, des ondes lentes et régulières de basse fréquence (3 - 4 Hz) et d'amplitude variable (200 à 350 mV) précèdent ou suivent les poly-pointes, réalisant un complexe de poly-pointe-onde dont la durée est comprise entre 2 et 4 secondes. Par ailleurs, ces anomalies observées sur les EEG peuvent persister après la fin de la crise. Des décharges de pointes ondes ou de poly-pointes-ondes généralisées de 4 à 6 Hz et d'ondes lentes durant 1 à 20 secondes sont observées entre les crises (Wolf, 1992).

L'imagerie de routine de l'EMJ est habituellement considérée comme normale (ILAE, 2010). Cependant, des études neuropathologiques réalisées sur certains patients atteints d'EMJ ont mis en évidence la présence de « microdysgénésies », correspondant à la présence de neurones dystopiques corticaux et sous-corticaux et d'autres anomalies structurelles microscopiques (Meencke and Janz, 1984). Ces résultats sont toutefois controversés et n'ont pas pu être reproduit par une autre étude neurohistologique (Opeskin et al., 2000).

La tomographie à émission de positron a démontré une augmentation focale du flux sanguin au niveau du thalamus chez les patients atteints d'épilepsie génétique généralisée. Ceci apporte une preuve du rôle centrale joué par le thalamus au niveau de ces maladies (Prevett et al., 1995). Par cette même technique, Swartz a démontré la présence d'une altération de la mémoire de travail dans l'EMJ (Swartz et al., 1996). D'autres études ont montré une diminution de la capture de GABA (acide  $\gamma$ -aminobutyrique) et une augmentation de l'activité de la GABA-transaminase suggérant une anomalie de la fonction GABAergique dans les cerveaux des patients atteints d'EMJ (Rainesalo et al., 2003). Il a été montré une altération du système sérotoninergique dans le cortex préfrontal, l'hippocampe et les noyaux du raphé (Meschaks et al., 2005) et également du système dopaminergique dans le striatum et le lobe frontal des patients souffrant d'EMJ (Ciumas et al., 2008).

L'imagerie par résonance magnétique quantitative apporte des informations supplémentaires dans la recherche des anomalies neuropathologiques. Ces études ont montré la présence d'une atrophie du thalamus (Deppe et al., 2008; Kim et al., 2007), du corps calleux, de l'hippocampe (Tae et al., 2006) ainsi qu'une augmentation de la substance grise

dans les régions mésio-frontales et fronto-basales due probablement à la présence de microdysgénésies (Betting et al., 2006; Tae et al., 2006; Woermann et al., 1999).

Enfin, des études par spectroscopie par résonance magnétique ont montré une diminution du niveau du N-acétylaspartate dans le lobe préfrontal (Savic et al., 2004; Simister et al., 2003) et dans le thalamus ainsi qu'une élévation de la glutamine et du glutamate dans le lobe frontal (Simister et al., 2003).

## 2.4. Les gènes de l'EMJ

Les facteurs génétiques jouent un rôle important dans l'étiologie de l'EMJ. En effet, différents modes de transmission génétique de la maladie ont été rapportés : autosomique dominant (AD), autosomique récessif (AR) et hérédité complexe impliquant l'interaction de différents gènes et de facteurs environnementaux (Alfradique and Vasconcelos, 2007).

A ce jour, 22 loci chromosomiques ont été associés à l'EMJ par des études de liaison (Tableau 2). Parmi ceux-ci, il y a cinq gènes mutés dont *CACNB4* (la sous unité  $\beta 4$  des canaux calcium voltage-dépendant), *CaSR* (le récepteur senseur du canal calcium), *GABRA1* (la sous-unité  $\alpha 1$  du récepteur au GABA<sub>A</sub>), *GABARD* (la sous-unité  $\delta$  du récepteur GABA<sub>A</sub>) et *myoclonine1/EFHC1* (myoclonine1/EF-hand containing one) ; et trois gènes présentant des SNPs à savoir *BRD2* (bromodomaine containing 2), *Cx-36* (connexine 36) et *ME2* (malic enzyme 2). Tous ceux-ci sont des gènes majeurs de susceptibilité qui contribuent à la génétique complexe de l'EMJ (Delgado-Escueta et al., 2013).

### 2.4.1. Les SNPs associés à l'EMJ

Des études effectuées sur des familles provenant de New-York et d'Arabie Saoudite ont montré une association du locus 6p21.3 avec l'EMJ. Celui-ci est situé à l'intérieur du complexe majeur d'histocompatibilité (HLA), entre les loci HLA-DQ et HLA-DP, et contient le gène *BRD2*. Dans la région promotrice de ce gène, deux SNPs ont été associés à l'EMJ (Pal et al., 2003). *BRD2* est un membre de la famille des bromodomains et extraterminal

domaines. De nombreuses fonctions ont été associées à cette protéine, incluant la transactivation du promoteur de plusieurs gènes régulateurs du cycle cellulaire, la fixation aux chromosomes mitotiques et l'interaction avec la lysine-12 acétylée dans les histones (Pal et al., 2003). Il a également été montré que les souris hétérozygote *Brd2*<sup>+/-</sup> sont viables. Par contre, les souris invalidées pour ce gène (*Brd2*<sup>-/-</sup>) meurent après 11 jours de vie embryonnaire et montrent des anomalies structurelles au niveau du cerveau. Ces observations suggèrent que *Brd2* est essentiel pour le développement neuronal (Velisek et al., 2011).

En 2004, un SNP de susceptibilité à l'EMJ localisé sur le chromosome 15q14 a été découvert. Il se situe dans le gène de la *Connexine-36* (*Cx-36*) (Mas et al., 2004). La *Cx-36* est fortement exprimée dans les cellules neuronales de mammifères et est un composant des jonctions communicantes. Ces dernières sont des structures formant des canaux entre les membranes de deux cellules adjacentes. La *Cx-36* est impliquée dans l'excitabilité neuronale par le contrôle de la synchronisation des oscillations calciques et pourrait ainsi contribuer aux crises d'épilepsie (Nakase and Naus, 2004).

L'équipe de Greenberg a identifié 9 SNPs présents sur le gène *ME2* qui augmenterait le risque d'épilepsie génétique généralisée. Ce gène est situé sur le chromosome 18q21. En effet, *ME2* (enzyme malique 2) est une enzyme mitochondriale présente dans le cerveau. Sa fonction première est la décarboxylation oxydative du malate en pyruvate et en CO<sub>2</sub>. Cette réaction met également en jeu du NAD<sup>+</sup> qui sera transformé en NADH. Par ailleurs, *ME2* est aussi indirectement impliquée dans la synthèse de GABA en fournissant le pyruvate nécessaire à cette synthèse. Cette équipe a montré que les perturbations dans la synthèse du GABA change le seuil d'excitabilité corticale, en permettant le déclenchement de crises spécifiques induites par un mauvais fonctionnement d'autres gènes. Ceci pourrait donc expliquer la variété des syndromes d'épilepsie génétique généralisée observée, avec le chevauchement de leurs symptômes et la multitude de leurs types de crises au sein d'une même famille (Greenberg et al., 2005).

#### **2.4.2. Les mutations associées à l'EMJ**

En 2004, des études menées sur des familles australiennes ont montré la présence de deux mutations dans le gène *GABARD* localisé au niveau du chromosome 1p36.33. En effet,

la mutation E177A contribue aux épilepsies généralisées accompagnées de convulsions fébriles plus (GEFS+) et la mutation R220H contribue aux épilepsies génétiques généralisées et probablement à d'autres épilepsies polygéniques. En comparaison avec le récepteur sauvage, ces mutations induisent une diminution des amplitudes des courants du récepteur GABA<sub>A</sub>. Comme les récepteurs GABA<sub>A</sub> agissent au niveau de l'inhibition neuronale, la réduction des courants associés à ces deux variants induit une augmentation de l'excitabilité neuronale ce qui suggère que l'altération de ce processus pourrait contribuer aux épilepsies généralisées (Dibbens et al., 2004).

En 2002, Cossette et ses collaborateurs ont identifié une mutation faux-sens (A332D) dans le gène *GABRA1* dans une famille canadienne atteinte d'EMJ. Ce gène code la sous-unité  $\alpha 1$  du récepteur GABA<sub>A</sub>. La mutation induit une diminution de l'amplitude des courants GABA *in vitro*. Le résultat total sera une forte diminution de l'amplitude des courants inhibiteurs post-synaptiques conduisant à une hyperexcitabilité neuronale responsable de l'EMJ (Cossette et al., 2002).

Escayg et ses collaborateurs ont découvert une mutation localisée au niveau du chromosome 2q22-23 sur le gène *CACNB4*. Ce gène code la sous-unité  $\beta 4$  du canal calcique voltage-dépendant de type L. Ces canaux sont constitués de plusieurs sous-unités différentes ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ). L'interaction entre la sous-unité  $\alpha_1$  et  $\beta$  contribue à la diversité des courants calciques par la modulation de l'amplitude de ceux-ci, la dépendance au voltage et la cinétique d'activation et d'inactivation. Par ailleurs, la mutation (R482X) produit une forme de la protéine tronquée de ses 38 derniers acides aminés ce qui altère son interaction avec la sous-unité  $\alpha_1$ . La conséquence de cette mutation serait d'augmenter le temps d'inactivation du canal et donc de réduire le flux d'ions calciques dans le neurone activé (Escayg et al., 2000).

Des études de liaison génétique menées dans des familles indiennes ont identifié un nouveau gène sur le chromosome 3q13.3-q21. Ils ont trouvé une mutation rare faux-sens R898Q au niveau du récepteur senseur du calcium extracellulaire (*CaSR*), un gène appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Celui-ci joue un rôle dans la régulation de l'homéostasie du calcium, l'excitabilité membranaire, la différenciation cellulaire, l'apoptose et l'expression des gènes (Kapoor et al., 2008).

Des études menées au sein de famille de Belize, de Los Angeles, du Mexique, du Honduras, du Japon, d'Italie, du Brésil, de Tennessee et d'Autriche ont mis en évidence un locus chromosomique situé en 6p11-12 dans la région dénommée EJM1 (Annesi et al., 2007; Jara-Prado et al., 2012; Mas et al., 2004; Medina et al., 2008; Stogmann et al., 2006; Suzuki et al., 2004). Au niveau de ce locus se situe le gène *EFHC1*, qui ne code pas un canal ionique et dont la fonction n'est pas encore connue.

**Tableau 2 : Loci chromosomiques et gènes identifiés dans l'EMJ (Delgado-Escueta et al., 2013).**

Chromosome locus	HGNC gene symbol <sup>a</sup> or phenotype	Gene/encoded protein	Country/ethnic group/ancestral origin	Mode of inheritance
1p36.22	Absence and JME	<i>Suggestive linkage</i>	Europe (Germany, Netherlands, UK, France, Italy, and Greece)	AD/oligogenic: meta analysis of 235 absence families and 118 JME families
1p36.33	<b>EJM7</b>	<b>GABRD<sup>b</sup></b>	Australian families incl GEFS+	AD
2q23.3	<b>EJM6</b>	<b>CACNB4<sup>b</sup></b>	One family (father and son with absences and tonic-clonic) from Germany; one woman with JME and a daughter with 3-Hz spike waves	AD
2q34	JME	Unknown	Europe (Germany, Netherlands, UK, France, Italy, and Greece)	AD/oligogenic: meta analysis of 118 JME families
2q23.3 and 2q24.1	JME	Unknown	Tunisia – one large consanguineous family	AR
2q33–36	<b>EJM9</b>	Unknown	India – one large 4 generation family	AD
3p14.2	JME/absence	<i>Suggestive linkage</i>	Europe (Germany, Netherlands, UK, France, Italy, and Greece)	AD/oligogenic: meta analysis of 235 absence families and 118 JME families
3q21.1	JME	<b>CASR (calcium sensor receptor gene)<sup>b</sup></b>	One large Indian family; 5 of 96 unrelated JME patients from Bangalore, India	AD
5q12–14	<b>EJM4</b>	Unknown	India	AD
5q35.3	JME with PPR (photosensitivity)	Unknown	Netherlands	AD
5q34	<b>EJM5</b>	<b>GABRA1<sup>b</sup></b>	French Canadian (Quebec, Canada) – one family; one absence patient from Germany; one absence patient from France	AD
5q34	(Absence and JME)	Unknown	Europe – Germany, Netherlands, UK, France, Italy, and Greece	AD/oligogenic: meta analysis of 235 absence families and 118 JME families
6p12	<b>EJM1</b>	<b>Myoclonin1/EFHC1<sup>b</sup></b>	Hispanics [LA, California] Hispanics [Belize] Hispanics [Mexico <sup>c</sup> ] Hispanics [Honduras and Mexico] Japan Italy and Brazil Tennessee Austria Netherlands	AD
6p12	JME	Unknown	Netherlands	AD
6p21.3	<b>EJM3</b>	<b>BRD2<sup>c</sup></b> (bromodomain-containing gene)	European descent [Los Angeles, California] European descent [NY <sup>c</sup> ]; Germany	AD/oligogenic
6p20	JME	–	Germany	AD
6p21.2	JME	–	Germany	AR
6q24	JME	–	Saudi Arabia	AR
7q32	Photoparoxysmal response 3 (PPR3), with or without myoclonic epilepsy	Unknown	Netherlands 16 multiplex families	AD
8q21.13	JME with PPR (photosensitivity)	JRK, glutamate receptor GRIN2A are suspected	Netherlands	AD
10q25–q26	JME with PPR	–	India (New Delhi), 5 families	AD
13q13	JME with PPR (photosensitivity)	–	Netherlands	AD
13q31.3	CAE	–	Europe and Australia (Germany, Netherlands, UK, France, Italy and Greece)	AR/meta analysis of 235 absence families
13q31	JME with PPR (photosensitivity)	–	Netherlands, United Kingdom, Denmark, France, Greece, Portugal, Sweden European descent (New York)	AD
15q14		<b>Cx36<sup>c</sup></b> (connexin36) or a gap junction protein2 or GJP2 CHRNA7 is candidate gene	UK, Sweden families	AR
15q14	<b>EJM2</b>	<b>ME2<sup>c</sup></b> (malic enzyme2)	European descent (New York)	Association studies with JME
18q21	JME	<b>SCN1B</b>	Europe and Australia (Germany, Netherlands, UK, France, Italy, and Greece)	Meta analysis of 235 absence and 118 JME families
19q13	Generalized epilepsy with febrile seizures plus, including JME (GEFS + 1)			AR
Xp11.4–11.3	JME	<b>EFHC2</b>	Germany, 81 patients	Association study with JME

<sup>a</sup> Human Genome Nomenclature Committee gene symbol in bold letters.

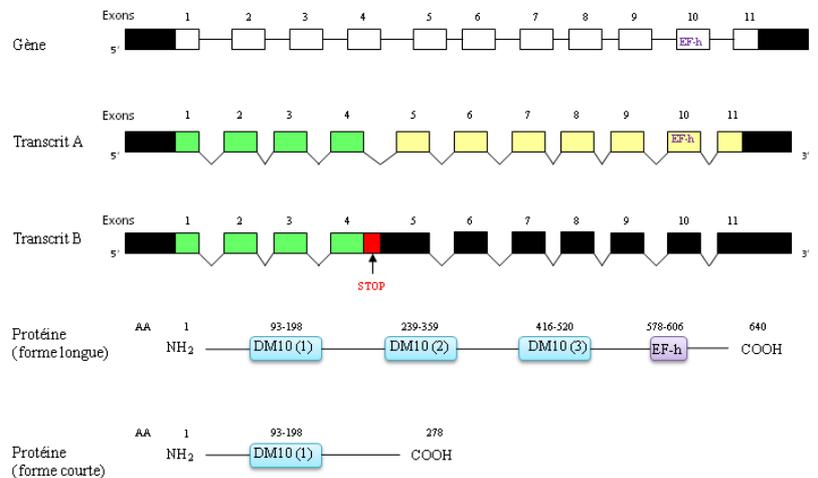
<sup>b</sup> Mutation segregate with epilepsy affected members across 2 to 4 generation families or in singletons.

<sup>c</sup> SNP-associated variants of BRD2, Cx36 and ME2; AD, autosomal dominant; AR, autosomal recessive; JME, juvenile myoclonic epilepsy; and pCAE, pyknoleptic childhood absence epilepsy.

### 3. EFHC1

Le gène *EFHC1* se situe en 6p11-12 et plus particulièrement entre les marqueurs D6S1960 et DS6S1024. Il contient 11 exons et a une taille d'environ 72kb. Ce gène code une protéine de 640 acides aminés comportant trois domaines DM10 de fonction inconnue et un motif EF-hand, caractérisé comme un motif de liaison au calcium (Figure 1). L'acronyme EFHC1 signifie « EF-hand containing 1 ». Les domaines DM10 comportent une centaine d'acides aminés et sont situés dans les régions allant de 93 à 198, de 239 à 359 et de 416 à 520. Le motif EF-hand est quant à lui codé au niveau de l'exon 10. Il se situe dans la portion C-terminale de la protéine entre les acides aminés 578 et 606 (Figure 1).

L'ARN messager d'EFHC1 peut subir un épissage alternatif de l'exon 4 et produire ainsi une protéine tronquée de 278 acides aminés ne comportant que l'extrémité N-terminale et le premier domaine DM10, les deux autres domaines ainsi que le motif EF-hand étant éliminés (Figure 1).



**Figure 1 : Schémas représentant le gène, les deux transcrits et les deux formes protéiques d'EFHC1.** **Gène :** *EFHC1* est constitué de 11 exons dont le 10<sup>ème</sup> encode pour le domaine EF-hand. **Transcrits :** le transcrit A code pour la forme longue de la protéine, tandis que le transcrit B subit un épissage alternatif au niveau de son exon 4 et code une protéine plus courte excisée de son extrémité N-terminale. *En noir :* les séquences non codantes. *En vert :* séquences communes aux deux transcrits. *En jaune :* séquences codantes spécifiques. *En rouge :* séquence « stop ». EF-h : séquence codant le domaine EF-hand situé au niveau de l'exon 10. **Protéine :** la forme longue est constituée de 640 acides aminés (AA), de trois domaines DM10 (bleu) et un domaine EF-hand (EF-h). La forme courte comprend 278AA et un seul domaine DM10.

### 3.1. Les mutations d'*EFHC1* associés à l'EMJ

Les mutations dans le gène *EFHC1* sont les plus fréquemment associées à l'EMJ. En effet, selon les estimations, elles représenteraient environ 3-9% des cas (Delgado-Escueta, 2007). Des mutations faux-sens, non-sens, décalage du cadre de lecture et délétion ont été identifiées par différentes équipes.

En 2004, Suzuki et ses collaborateurs ont analysé 44 familles atteintes d'EMJ (31 de Mexico, 1 de Belize et 12 de Los Angeles). Dans six familles non apparentées, ils ont observé la présence de 5 mutations faux-sens. Celles-ci incluent 3 mutations hétérozygotes (F229L, D210N et D253Y) et une double mutation hétérozygote (P77T et R221H). Ces mutations agiraient de façon dominante puisqu'elles exercent leur effet à l'état hétérozygote. Par ailleurs, cette équipe a également montré la présence de trois polymorphismes codant, retrouvés aussi bien chez les personnes saines que chez les personnes malades, résultant de substitutions des acides aminés R159W, R182H et I619L (Suzuki et al., 2004).

Ma et ses collaborateurs ont étudié 54 familles caucasiennes provenant du Tennessee. Ils ont confirmé la présence de la mutation hétérozygote R221H chez deux enfants issus d'une même famille (Ma et al., 2006).

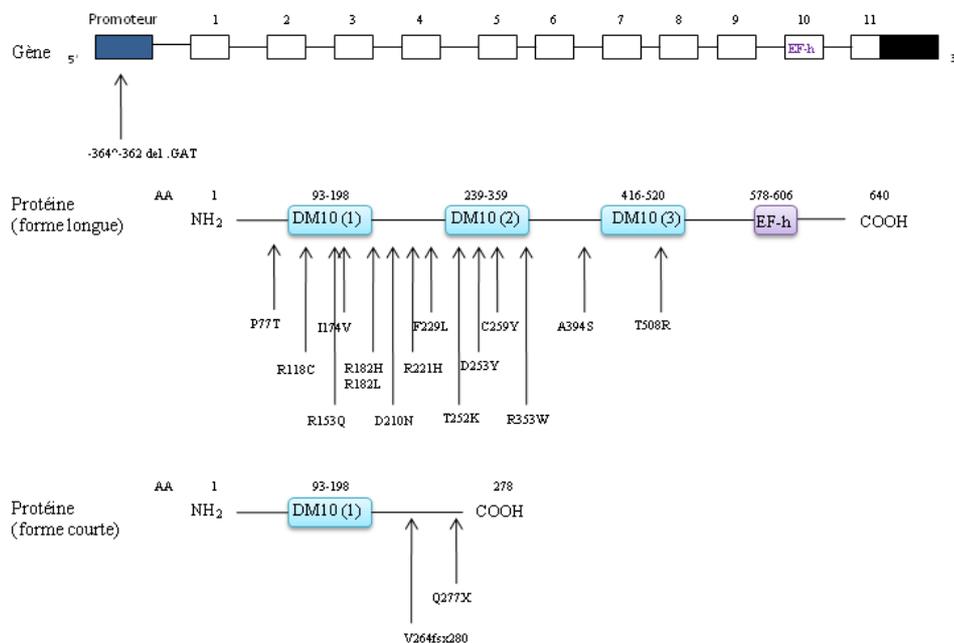
D'autres recherches ont été menées sur 61 patients autrichiens atteints d'EMJ et d'autres formes d'épilepsie génétique généralisée et également sur 372 malades souffrant d'épilepsie du lobe temporal. Ils ont mis en évidence trois autres mutations hétérozygotes faux-sens (I174V, C259Y et A394S). Les mutations I174V et C259Y ont été retrouvées chez deux patients présentant une épilepsie d'absence juvénile et la mutation A394S est présente chez un patient atteint d'une épilepsie génétique généralisée (Stogmann et al., 2006).

Par ailleurs, des études effectuées sur 27 familles italiennes atteintes d'EMJ ont démontré la présence de 2 mutations hétérozygotes faux-sens, une découverte antérieurement (R221H) et une nouvelle mutation (R353W) dans 3 familles (Annesi et al., 2007).

En outre, les travaux menés par Medina sur 44 familles de Mexico et du Honduras et en plus 47 familles japonaises atteintes d'EMJ ont montré 2 nouvelles mutations

hétérozygotes faux-sens (T252K et T508R) dans la forme longue de la protéine et également une mutation non-sens (Q277X) ainsi qu'une mutation induisant un décalage du cadre de lecture (V264fsx280) dans la forme courte. Cette équipe a également mis en évidence une délétion de trois bases dans la région promotrice du gène *EFHC1* (-364<sup>^</sup>-362del.GAT) (Medina et al., 2008).

Finalement, la dernière étude menée sur une cohorte de 41 patients mexicains a mis en évidence 3 nouvelles mutations hétérozygotes faux-sens. Toutes se situent dans le premier domaine DM10 (R118C, R182L et R153Q) (Jara-Prado et al., 2012).



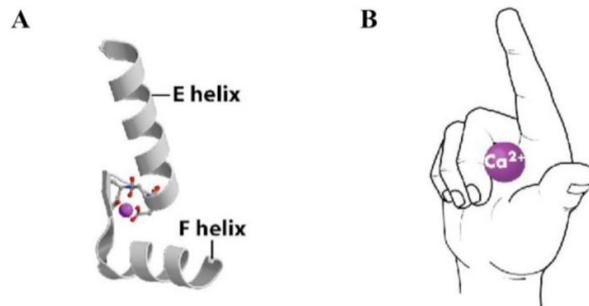
**Figure 2 : Schéma représentant la localisation des différentes mutations d'EFHC1 associées à l'EMJ identifiées à ce jour.**

## 3.2. Les domaines d'EFHC1

### 3.2.1. Domaine EF-hand

En 1973, Krestinger et Nockolds ont décrit pour la première fois le domaine EF-hand suite à l'étude de cristaux de parovalbumine (Krestinger and Nockolds, 1973). Il correspond à

un motif hélice-boucle-hélice. La boucle, constituée de 12 acides aminés, est capable de fixer le  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette dernière relie perpendiculairement deux hélices alpha appelée E et F. Le nom EF-hand provient du fait que ce motif peut être représenté symboliquement par la main droite ou l'hélice E correspondrait à l'index et l'hélice F au pouce (Figure 3) (Lewit-Bentley and Rety, 2000).



**Figure 3: Domaine EF-hand.** A : représentation schématique d'un domaine EF-hand constitué des deux hélices E et F placées perpendiculairement et reliées par une boucle de 12 acides aminés liant le  $\text{Ca}^{2+}$ . B : représentation symbolique du motif EF-hand sous la forme d'une main droite dans laquelle l'hélice E correspond à l'index et l'hélice F au pouce (Gifford et al., 2007)

La famille des protéines à EF-hand comprend plus de 1000 membres qui peuvent être classifiés dans 66 sous-familles sur base des alignements de séquences. Ces protéines peuvent être séparées en deux grandes familles selon leurs propriétés cellulaires. D'une part, il y a les protéines tampon impliquées dans le transport et la régulation de la concentration en calcium intracellulaire telles que la calbindine et la calretinine. D'autre part, les senseurs calciques qui transmettent l'information provenant des influx de calcium à différentes cibles responsables de la réponse cellulaire tels que la calmoduline ou la troponine C (Ikura, 1996).

La plupart des protéines à domaine EF-hand comprennent des paires, simples ou multiples, de motifs hélice-boucle-hélice. Cette configuration se retrouve principalement dans les formes globulaires et sont responsables d'une liaison coopérative du  $\text{Ca}^{2+}$  entre les deux motifs, augmentant ainsi l'affinité de la protéine pour le  $\text{Ca}^{2+}$  (Cates et al., 2002).

La protéine EFHC1 ne comporte qu'un seul motif EF-hand. De plus, il a été démontré que l'EF-hand d'EFHC1 est capable de lier un ion divalent ( $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ ) en condition réductrice, tandis qu'en condition oxydante, la dimérisation d'EFHC1 bloque la liaison à ces ions (Murai et al., 2008).

### 3.2.2. Les domaines DM10

Les domaines DM10 contiennent approximativement 105 résidus et leur fonction est toujours méconnue. Ces domaines ont été retrouvés dans des protéines présentes chez les mammifères, les poissons, les insectes, les amphibiens, les protistes et chez les nématodes. Ce motif n'est retrouvé que dans deux types de protéines (King, 2006). Les premières sont les kinases nucléosides diphosphates de type 7 (NDK7) constituées d'un seul domaine DM10 N-terminal et deux motifs catalytiques NDK. Ce dernier catalyse le transfert du gamma-phosphate de l'adénosine triphosphate sur le guanosine diphosphate pour former le guanosine triphosphate et une adénosine diphosphate. Ces protéines jouent un rôle important dans la prolifération cellulaire, la différenciation, le développement et la progression des tumeurs (Roymans et al., 2000).

La seconde famille comprend des protéines constituées de plusieurs domaines DM10 et d'un motif EF-hand. Cette catégorie regroupe par exemple EFHC1 et son paralogue EFHC2, les orthologues Rib72 de *Chlamydomonas* ainsi que CG8959 et CG11048 de la drosophile. Contrairement à celles de la première famille, ces protéines n'ont pas d'activité enzymatique connue mais leurs propriétés ne sont pas encore totalement élucidées. De plus, l'analyse phylogénique de ces protéines montre que chacun des trois domaines sont plus conservés entre les différentes protéines qu'au sein d'une même protéine (King, 2006).

Chez *Chlamydomonas*, les protéines contenant les domaines DM10 sont particulièrement liées à l'axonème du flagelle (Ikeda et al., 2003; Patel-King et al., 2002). Ceci suggère que ces domaines pourraient agir soit comme des régulateurs des NDK flagellaires soit comme des unités spécifiquement impliquées dans l'assemblage de l'axonème ou la localisation de ces protéines au niveau des structures (King, 2006).

### 3.3. Les propriétés d'EFHC1

S'il semble clair qu'EFHC1 joue un rôle important dans l'épilepsie myoclonique juvénile, ses propriétés cellulaires restent controversées. Plusieurs rôles lui sont attribués, et bien que très différents ils ne sont pas pour autant mutuellement exclusifs.

### 3.3.1. EFHC1, un senseur calcique pro-apoptotique

L'équipe de Suzuki a démontré que la surexpression d'EFHC1 dans les neurones d'hippocampe *in vitro* induit la mort cellulaire par apoptose. Cet effet résulterait d'une augmentation des courants calciques au travers des canaux calciques voltage-dépendant de type R induite par EFHC1. Les mutations réduisent cet effet apoptotique tandis que les polymorphismes n'affectent pas considérablement la mort cellulaire. Les auteurs proposent qu'EFHC1 induise la mort cellulaire en provoquant l'élimination des neurones durant le développement cérébral, ainsi l'effet des mutations engendrait une augmentation de la densité des neurones avec une homéostasie précaire, conduisant dès lors à l'hyperexcitabilité responsable de l'EMJ (Suzuki et al., 2004).

Plus récemment, il a été démontré que TRPM2, un canal perméable au calcium, interagit avec le motif EF-hand d'EFHC1. En effet, EFHC1 potentialiserait l'activité de TRPM2. Ce dernier interviendrait notamment lors de la mort cellulaire et des processus biologiques tels que la migration des cellules inflammatoires et la sécrétion de l'insuline (Katano et al., 2012).

Toutes ces données suggèrent qu'EFHC1 pourrait jouer un rôle dans les mécanismes apoptotiques utilisés pour éliminer les neurones inutiles durant le développement. La diminution de l'apoptose induite par les mutations d'EFHC1 pourrait diminuer la densité neuronale menant à l'hyperexcitabilité responsable de l'EMJ (Suzuki et al., 2004).

### 3.3.2. EFHC1 est une protéine impliquée dans la fonction des cils

Rib-72, orthologue d'EFHC1 chez *Chlamydomonas*, est un composant du ribbon de l'axonème flagellaire, une structure stable constituée de protofilaments de tubuline. Cette protéine est distribuée le long de l'axonème mais est absente du corps basal. Elle serait impliquée dans la régulation calcium-dépendante de la motilité des flagelles (Patel-King et al., 2002).

De plus, les homologues de Rib-72 sont également retrouvés dans des organismes qui contiennent des cils motiles, des flagelles comme chez l'homme, la souris, l'oursin ou encore

la drosophile (Ikeda et al., 2005; Suzuki et al., 2008). Par ailleurs, chez la souris, *EFHC1* est abondamment exprimée dans les tissus de souris possédant des cils motiles ou des flagelles tels que les poumons, les testicules ou les cellules épendymaires (Ikeda et al., 2005; Leon et al., 2010; Suzuki et al., 2008). Tous ces résultats suggèrent qu'*EFHC1* est une protéine impliquée dans la fonction des cils motiles. Cela a été confirmé par des travaux sur des souris déficientes pour le gène *EFHC1* qui présentent un ventricule élargi et une fréquence de battement des cils de l'épendyme diminuée (Suzuki et al., 2009).

Dans le cerveau, les cellules épendymaires qui bordent les ventricules latéraux sont hautement ciliées et sont responsables du mouvement du liquide céphalo-rachidien. Dans le cerveau de souris adulte, ce mouvement est nécessaire à la migration des neuroblastes vers le bulbe olfactif afin de répartir de façon homogène les molécules chémorépulsantes produites par le plexus choroïde (Sawamoto et al., 2006). Cela suggère qu'*EFHC1*, en contrôlant le battement des cellules ciliaires pourrait affecter le développement neuronal.

### **3.3.3. La souris *EFHC1* KO**

L'équipe de Suzuki a développé une souris knock-out pour le gène *EFHC1*. L'apparence de ces souris est normale et les deux sexes sont fertiles. Cependant, les chercheurs ont observé une augmentation significative de la taille des ventricules et une atrophie de l'hippocampe chez les souris KO adultes mais pas chez les animaux hétérozygotes. Une diminution de la fréquence de battement des cils de l'épendyme est également observée mais uniquement chez les souris KO, et est très probablement responsable de l'augmentation du volume des ventricules. De plus, à l'âge adulte, les souris KO et hétérozygotes présentent des myoclonies spontanées avec une baisse du seuil épiléptogène induit par la PTZ. Ces observations suggèrent que la diminution ou la perte de fonction d'*EFHC1* pourrait être la base moléculaire de l'EMJ causée par les mutations de cette protéine (Suzuki et al., 2009). Néanmoins, il semble peu probable que les cils soient responsables de l'apparition de la maladie vu que les souris hétérozygotes pour le gène *EFHC1* présentent également des myoclonies spontanées mais pas une diminution de la fréquence de battement de cils.

### 3.3.4. EFHC1 est une MAP requise pour la division cellulaire et la migration neuronale

Notre équipe a démontré qu'EFHC1 se localise dans une cellule interphase au niveau du cytoplasme, du noyau (à l'exception des nucléoles) et du centrosome. Par contre, dans une cellule en division, EFHC1 s'associe au niveau des pôles du fuseau mitotique et du corps intermédiaire lors de la cytokinèse (de Nijs et al., 2006). Des études supplémentaires ont permis de montrer que cette association s'effectue via les 45 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale (de Nijs et al., 2006). De plus, nous avons démontré *in vitro* qu'EFHC1 interagit directement avec les microtubules purifiés, ce qui suggère qu'EFHC1 est une MAP (Microtubule Associated Protein) (de Nijs et al., 2009).

Ces résultats ont été confirmés ultérieurement par l'équipe de Rossetto qui s'est intéressée plus particulièrement à un homologue d'EFHC1 chez la *Drosophila*, appelé *Defhc1.1*. En effet, ils ont démontré que cette protéine co-sédimente avec les microtubules polymérisés *in vitro* ou *in vivo*, et qu'au niveau de la jonction neuromusculaire, elle co-localise avec les microtubules présents dans les axones et les boutons synaptiques (Rossetto et al., 2011).

Dans un modèle *in vitro*, des études menées au laboratoire ont montré qu'EFHC1 joue un rôle important dans la régulation de la division cellulaire. En effet, la surexpression d'une forme dominant-négatif d'EFHC1 et la diminution d'expression d'EFHC1 par des shRNAs induit une augmentation du nombre de fuseaux mitotiques anormaux. Plusieurs types ont pu être mis en évidence tels que les fuseaux unipolaires où les chromosomes sont disposés autour des centrosomes indiquant un défaut de séparation des centrosomes et de formation d'un fuseau bipolaire. Le deuxième type est des fuseaux bipolaires présentant un mauvais alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale qui est le résultat d'une mauvaise condensation des chromosomes au niveau de la plaque équatoriale pendant la métaphase (de Nijs et al., 2009).

D'autre part, il a été montré que l'expression du transcrit d'EFHC1 dans le cerveau de souris est plus important durant l'embryogenèse, c'est-à-dire au moment où la majorité des divisions ont lieu dans le cerveau (Conte et al., 2009). Tous ces résultats suggèrent qu'EFHC1 pourrait être impliqué dans la corticogenèse cérébrale.

Ainsi, nous avons décidé d'investiguer le rôle d'EFHC1 durant le développement cortical. Au laboratoire, nous avons démontré que l'inactivation d'EFHC1 (shARNs et dominants-négatifs) dans le néocortex de rat en développement au moyen des techniques d'électroporation *ex vivo* et *in utero* conduit à un défaut de migration neuronale radiaire. Nous avons montré que celui-ci résultait d'une diminution de sortie de cycle cellulaire des cellules progénitrices neuronales conduisant à une accumulation de celles-ci, d'une altération de l'architecture des prolongements de la glie radiaire, d'une augmentation de la mort cellulaire par apoptose et d'un défaut de locomotion des neurones post-mitotiques (de Nijs et al., 2009).

Donc, EFHC1 est une MAP intervenant dans la régulation de la division cellulaire et dans la migration radiaire durant le développement cortical. Nos résultats suggèrent que les microdysgénésies trouvées chez les patients souffrant d'EMJ pourraient résulter de défauts durant la migration neuronale radiaire. Durant la maturation corticale, ces défauts pourraient mener à une circuiterie épileptogène anormale qui pourrait être responsable de l'EMJ au début de l'adolescence.

## 4. Objectif

L'objectif de ce travail est de mieux comprendre l'effet des mutations pathologiques sur les propriétés fonctionnelles d'EFHC1, une protéine altérée dans l'épilepsie myoclonique juvénile. Contrairement aux protéines mutées généralement associées à l'épilepsie, la protéine EFHC1 a la particularité de ne pas coder un canal ionique mais une protéine à domaine EF-hand. Des études précédentes menées au laboratoire ont permis de montrer que cette protéine est une MAP qui s'associe au centrosome et au fuseau mitotique via les 45 premiers acides aminés de son extrémité N-terminale et qu'elle joue un rôle dans la division cellulaire et la migration tangentielle et radiaire des progéniteurs neuronaux au cours du développement fœtal.

Dans ce travail, nous avons étudié l'influence des quatre premières mutations associées à cette pathologie ainsi que deux polymorphismes sur localisation subcellulaire de la protéine. Nous avons montré que la protéine mutée est toujours capable de s'associer au centrosome et aux pôles du fuseau mitotique. Nous avons également pu démontrer que les mutations d'EFHC1 induisent un retard au niveau de la migration radiaire dans le cortex cérébral, de l'axonogenèse et de la dendritogenèse ainsi qu'une altération de la densité des épines dendritiques.

Nous présenterons donc successivement les résultats de l'étude de la localisation subcellulaire de la protéine EFHC1 mutée *in vitro*, l'étude du rôle d'EFHC1 dans la division cellulaire et dans la migration radiaire et tangentielle dans le cortex en développement (Chapitre 1 résultats et discussion, Publication n°1). Ensuite, nous exposerons les résultats de l'effet de la protéine mutée sur l'axonogenèse, la dendritogenèse et sur les épines dendritiques (Chapitre 2, résultats et discussion). Chaque chapitre débutera systématiquement par un rappel du contexte scientifique, des objectifs poursuivis, des résultats obtenus et de leurs discussions. Finalement, nous clôturerons ce travail par une conclusion générale. Les publications seront présentées en annexes à la fin du manuscrit.



## **Chapitre 1 et publication n°1 :**

**L'influence des mutations d'EFHC1  
sur la division et la migration des  
neurones dans le cortex cérébral en  
développement**

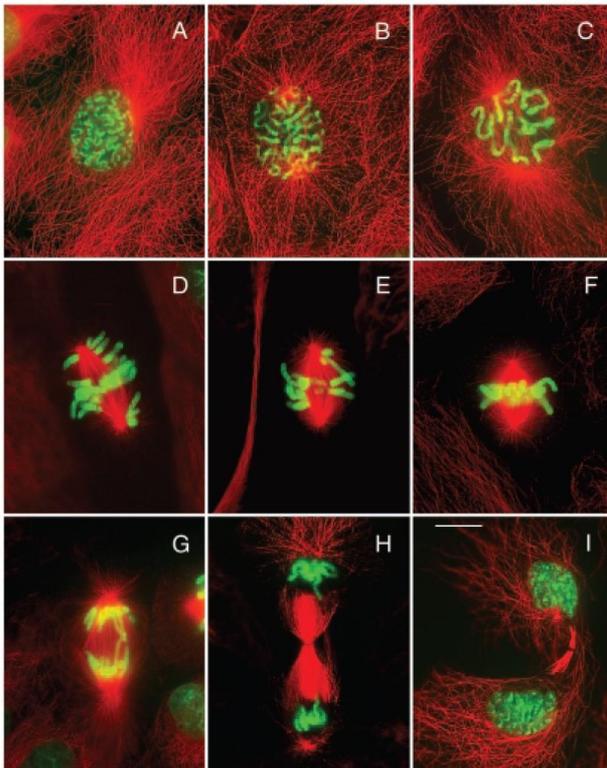


## 1. Introduction

L'objectif de la première partie de ce travail est d'étudier l'effet des formes mutées de la protéine EFHC1 sur ses propriétés fonctionnelles au cours de la division cellulaire et du développement du cortex cérébral. Pour mieux comprendre les résultats, nous allons rappeler quelques notions sur la division cellulaire, le centrosome et le développement du cortex cérébral.

### 1.1. La division cellulaire

La division cellulaire est un processus fondamental au cours duquel une cellule-mère donne naissance à deux cellules-filles identiques entre elles et à la cellule dont elles dérivent. La division cellulaire comprend la mitose et la cytokinèse (Figure 4).



**Figure 4 : Les événements morphologiques de la mitose.** Cellules PtK1 fixées à divers stades de la mitose. Les microtubules apparaissent en rouge et l'ADN en vert. Barre d'échelle 10  $\mu\text{m}$ . **(A) Début de prophase** : un centrosome proéminent accolé au noyau, dans un abondant réseau de microtubules en organisation interphasique. **(B) Fin de prophase** : les centrosomes sont répliqués et se sont répartis de part et d'autres du noyau. L'enveloppe nucléaire est encore intacte. **(C) Rupture de l'enveloppe nucléaire et début de la pro-métaphase** : les chromosomes commencent à interagir avec les centrosomes pour former un fuseau. **(D) Pro-métaphase** dans une cellule dont tous les chromosomes ne sont pas encore correctement orientés. Le fuseau est encore très allongé. **(E) Fin de pro-métaphase** : un dernier chromosome n'est pas encore aligné. **(F) Métaphase** : tous les chromosomes sont bien orientés et alignés sur la plaque équatoriale. **(G) Anaphase** : les chromosomes se séparent vers les pôles du fuseau. Ils apparaissent jaunes car ils sont entourés d'un réseau microtubulaire dense. **(H) Télaphase** : les chromosomes ont atteint les pôles du fuseau. Le corps intermédiaire se forme à mi-chemin entre les deux lots de chromosomes. Une constriction marque le site de la cytokinèse. **(I) Fin de la mitose** : les deux cellules filles produites par une division récente sont encore reliées par une structure microtubulaire (Meijer, 2003).

La mitose se divise en cinq étapes : prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase. Pendant la prophase, les chromosomes se condensent, les deux centrosomes dupliqués durant l'interphase migrent vers les pôles opposés sous l'action d'Eg5. En prométaphase, après la rupture de l'enveloppe nucléaire, le fuseau mitotique se forme et les chromosomes commencent à se fixer sur les microtubules. Durant la métaphase, les chromosomes s'alignent de la plaque équatoriale. Cet alignement nommé « congression » implique plusieurs protéines dont celles appartenant à la famille de la kinésine-7 telles que CENP-E et le complexe dynéine. Lors de la prométaphase, un point de contrôle est mis en place et activé jusqu'à ce que tous les chromosomes soient correctement alignés sur la plaque équatoriale. La quatrième étape appelée anaphase se caractérise par la disjonction des chromosomes qui peut s'effectuer grâce à la cohésine, complexe protéique qui maintient les chromatides associés, qui est phosphorylée par Plk1. Cette cohésine devient sensible à la dégradation protéique et est détruite par la séparase (une caspase), elle-même phosphorylée. Cela permet ainsi la séparation des chromatides. Avant le passage à la télophase, il existe également un point de contrôle dont le but est de vérifier l'orientation correcte du fuseau. Si l'orientation n'est pas bonne, la cellule reste bloquée en anaphase. Enfin, la télophase est caractérisée par le mouvement des chromosomes vers les pôles, la disparition du fuseau, la décondensation des chromosomes et l'apparition à nouveau de l'enveloppe nucléaire. En même temps, un anneau de myosine et d'actine induit la formation d'un sillon de division au niveau équatorial du fuseau mitotique, qui se resserre jusqu'à former un corps intermédiaire. Ce dernier est une structure formant un passage étroit entre les deux cellules filles et qui contient les restes du fuseau mitotique. Le recrutement des membranes au niveau de ce pont cytoplasmique conduit à la séparation des cellules filles. Ce phénomène est appelé cytokinèse (Meijer, 2003).

## 1.2. Le centrosome

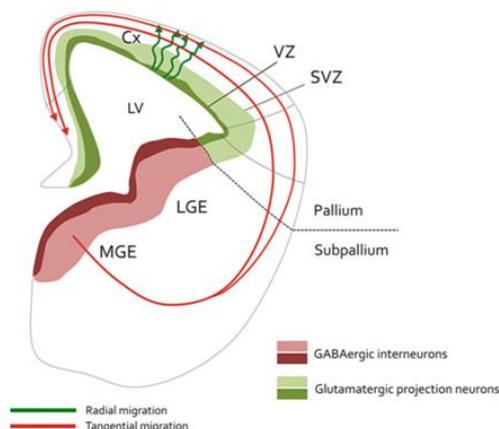
Le centrosome est un organite cellulaire d'environ  $1 \mu\text{m}^3$ . Il est localisé à proximité du noyau en interphase et il sert de centre d'organisation des microtubules. Au niveau structural, il se compose d'une paire de centrioles disposés perpendiculairement l'un par rapport à l'autre et entourés de matériel péricentriolaire. Chaque centriole est constitué de neuf triplets de microtubules ; ce matériel péricentriolaire est un treillis fibreux capable de fixer une grande variété de protéines telles que la ninéine, la centrioline, la dynactine impliquées dans

l'attachement des microtubules ou encore la  $\gamma$ -tubuline qui assure la nucléation des microtubules en formant un complexe nommé  $\gamma$ -TuRC ( $\gamma$ -tubulin ring complex) avec d'autres protéines telles que la péricentrine ou encore aurora (Stearns, 2001).

Parallèlement à la réplication de son génome, la cellule doit assurer la duplication de son centrosome. Le cycle de division du centrosome est parallèle au cycle cellulaire. La réplication du centrosome passe par plusieurs phases: duplication, élongation, maturation, séparation, ségrégation (Stearns, 2001).

### 1.3. La corticogénèse

Le cortex cérébral est la plus large structure du cerveau humain. La cytoarchitecture corticale mature est composée de six couches moléculairement distinctes. Il est composé d'un réseau sophistiqué constitué de milliards de neurones de projection excitateurs et d'interneurones inhibiteurs. Leur mise en place fait appel à la migration des neurones de projection et des interneurones depuis leur lieu de naissance respectif jusque leur destination finale (Figure 5).



**Figure 5: La migration neuronale dans le cortex cérébral en développement.** Schéma représentant une hémisection du télencéphale d'embryon de souris à E14.5. Les neurones de projection glutamatergique prennent naissance à proximité du ventricule latéral (LV) dans la zone ventriculaire (VZ, vert foncé) et dans la zone sous-ventriculaire (SVZ, vert clair). Les neurones de projection migrent radialement (flèches vertes foncées tortueuses) pour intégrer la plaque corticale du cortex (Cx). Les interneurones GABAergiques proviennent des éminences ganglionnaires médiales (MGE) et caudales (CGE). Ils proviennent des cellules progénitrices localisées dans la VZ (rouge foncé) et la SVZ (rouge clair). Ces neurones migrent tangentiellement le long de différents chemins pour atteindre le cortex (Godin and Nguyen, 2014).

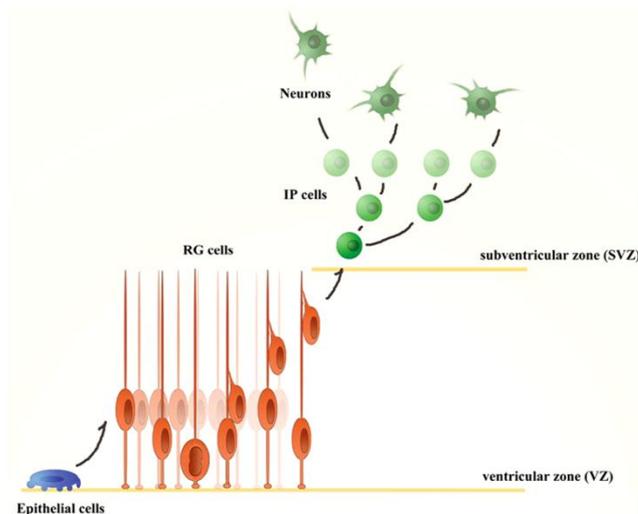
Les interneurones corticaux naissent dans les éminences ganglionnaires situées dans le télencéphale ventral et migrent tangentiellement le long de routes pour atteindre le cortex

(Faux et al., 2012; Marin, 2013). Les neurones corticaux de projection, quant à eux, sont générés dans la zone ventriculaire (VZ) et sous-ventriculaire (SVZ) du télencéphale dorsal et migrent de façon radiaire pour rejoindre leur position ultime (Ayala et al., 2007; Marin et al., 2010).

### 1.3.1. La migration radiaire

#### 1.3.1.1. La neurogenèse

Au début de la neurogenèse chez les rongeurs, les cellules neuroépithéliales deviennent des progéniteurs de glie radiaire (PGL) (Figure 6). Ces cellules représentent la population la plus importante des cellules localisées dans la VZ (Miyata et al., 2004; Noctor et al., 2001). Elles commencent à se diviser de manière asymétrique afin de produire des cellules progénitrices qui s'auto-renouvellent et des neurones post-mitotiques (Gotz and Huttner, 2005). Morphologiquement, elles possèdent des prolongements qui permettent de maintenir le contact à la fois avec les surfaces ventriculaire et piale durant leur cycle de division mitotique (Noctor et al., 2001; Noctor et al., 2008). Les noyaux migrent également selon les phases de cycle cellulaire caractérisées par des mouvements intercinétiques.



**Figure 6: Prolifération des cellules neuronales et les mouvements intercinétiques des noyaux.**

Epithelial cells : cellules épithéliales ;  
RG : glie radiaire ; IP : progéniteur intermédiaire ; VZ : zone ventriculaire ;  
SVZ : zone sous-ventriculaire (Wu et al., 2014).

Au début de la mitose, les cellules s'arrondissent pour se diviser mais elles conservent leurs prolongements basaux et apicaux qui deviennent très minces (Noctor et al., 2008). Les noyaux de celles-ci migrent dans la partie supérieure de la VZ durant la phase S, et ensuite ils redescendent dans la partie apicale de la VZ. Ainsi, après la cytokinèse, les cellules produites restent soit des PGLs qui entament un nouveau cycle cellulaire (division symétrique), soit l'une perdue comme un PGL et l'autre quitte le cycle cellulaire pour se transformer en neurone post-mitotique qui entame son processus de différenciation neuronale (division asymétrique) (Gotz and Huttner, 2005).

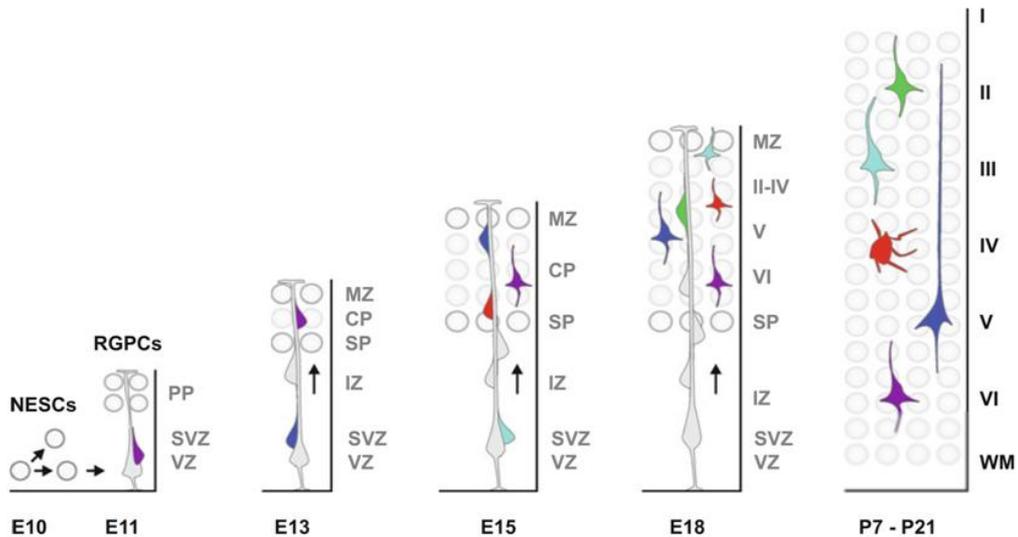
Après le début de la neurogenèse, les cellules de glie radiaire génèrent également un autre type de cellule spécialisée appelée progéniteurs intermédiaires (IP) (Franco and Muller, 2013; Noctor et al., 2004). Celles-ci résident au départ de la neurogenèse dans la zone ventriculaire et se divisent souvent de façon asymétrique pour produire deux neurones (Noctor et al., 2008). A des stades plus tardifs de la neurogenèse, les IPs migrent dans une zone de prolifération adjacente à la VZ appelée SVZ. Au contraire des PGRs, ces cellules ne présentent ni de prolongement apical ou ni basal (Gotz and Huttner, 2005).

#### *1.3.1.2. La mise en place des couches corticales : migration « inside-out »*

Les neurones de projection prennent naissance dans la VZ/SVZ et migrent à travers la zone intermédiaire (IZ) pour atteindre la plaque corticale (CP) afin de construire les six couches du cortex. La mise en place de ces neurones s'effectue de manière « inside-out », c'est-à-dire que les premiers neurones vont peupler les couches profondes alors que les derniers occuperont les couches superficielles (Figure 7) (Angevine and Sidman, 1961; McConnell, 1995; Polleux et al., 1997). De plus, les enregistrements vidéo en temps réel ont montré que les neurones en migration radiaire procèdent en plusieurs phases différentes en changeant leur morphologie le long du trajet et ajustant leur mode de migration (Nadarajah et al., 2001; Noctor et al., 2004; Sekine et al., 2011; Tsai and Gleeson, 2005).

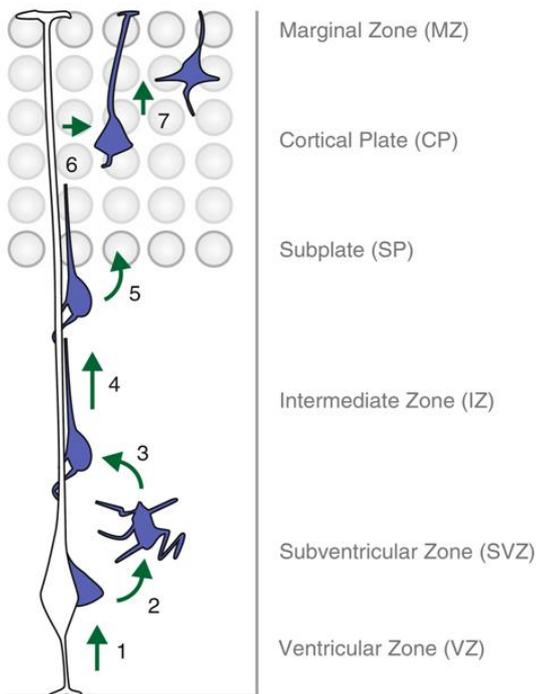
Au début de la corticogenèse, les distances de migration pour les nouveaux neurones sont assez courtes et plus le développement cortical s'effectue plus les distances à parcourir sont importantes. Les modes de migration sont donc différents entre le début et la fin de la corticogenèse (Nadarajah et al., 2001). Les premiers neurones postmitotiques se déplacent par

translocation somale pour former la préplaque (PP) transitoire. Ceux-ci émettent un long prolongement qui est attaché à la surface piaie et le corps cellulaire remonte à l'aide de leur processus radial qui se raccourcit en maintenant son contact piaie jusqu'à son arrivée dans la couche corticale. Ce type de migration est fréquent lorsque l'épaisseur corticale est encore faible (Nadarajah et al., 2001; Price et al., 1997; Super et al., 1998). Lorsque la deuxième vague de neurones post mitotiques migrent jusque la surface piaie, ils scindent la PP en une zone marginale (MZ) et une sous-plaque (SP), et la CP s'étend progressivement verticalement grâce aux vagues consécutives de neurones qui viennent peupler cette zone par le mécanisme « inside-out » (McConnell, 1995; Polleux et al., 1997; Rakic, 1972). Le mode de migration dans ce cas est la locomotion. Elle se caractérise par la migration de cellules le long des fibres de la glie radiaire qu'elles utilisent comme guide (Figure 7).



**Figure 7 : Séquence développementale de l'assemblage des couches corticales par le mécanisme « inside-out ».** Durant la formation des couches corticales, les premiers neurones occupent les couches les plus profondes et les nouveaux les couches superficielles. Dans le cortex en développement, les NESCs se divisent symétriquement dans la VZ pour étendre le pool de cellules progénitrices. Les premières divisions asymétriques produisent des cellules qui vont occuper la PP. Par après, les premiers neurones (mauve, future couche IV) forment la CP qui se scinde en la SP et MZ. La vague suivante de neurones (bleu foncé, couche V), migrent de la VZ/SVZ à travers la IZ et se positionnent au-dessus des neurones précédemment générés (mauve, couche VI). Cette séquence est répétée pour le neurone rouge (couche IV), cyan (couche III) et vert (couche II) jusqu'à ce que toutes les couches corticales soient établies. Durant les trois premières semaines en post-natal, une phase de consolidation a lieu où les neurones corticaux finissent la genèse de l'axone et des dendrites et forment les connections synaptiques. Abréviations : VZ : zone ventriculaire, SVZ : zone sous-ventriculaire, PP : préplaque, SP : sous-plaque, MZ : zone marginale, IZ : zone intermédiaire, CP : plaque corticale, WM : matière blanche, NESCs : cellules souches neuroépithéliales, RGPCs : cellules progénitrices de glie radiaire (Hippenmeyer, 2014).

Pendant l'établissement de la plaque corticale, les nouveaux neurones de projection générés dans la VZ suivent des étapes très spécifiques avant d'atteindre la CP (Figure 8). Tout d'abord, les progéniteurs neuronaux se détachent du neuroépithélium de la surface ventriculaire et se déplacent le long de la glie radiaire jusque la SVZ (Itoh et al., 2013). Les neurones séjournent dans cette zone environ 24h et parfois un peu plus longtemps. Ils adoptent une morphologie multipolaire, étendant et rétractant tous leurs processus dans différentes directions (Noctor et al., 2004; Tabata and Nakajima, 2003). Durant cette même phase, les neurones multipolaires migrent tangentiellement de façon hasardeuse (Noctor et al., 2004), et le futur axone est également déterminé (Barnes and Polleux, 2009). Une partie des neurones migrent de façon antérograde vers la VZ avant de changer leur forme. Ces neurones adoptent ensuite une morphologie bipolaire et migrent le long de la glie radiaire (Noctor et al., 2004).



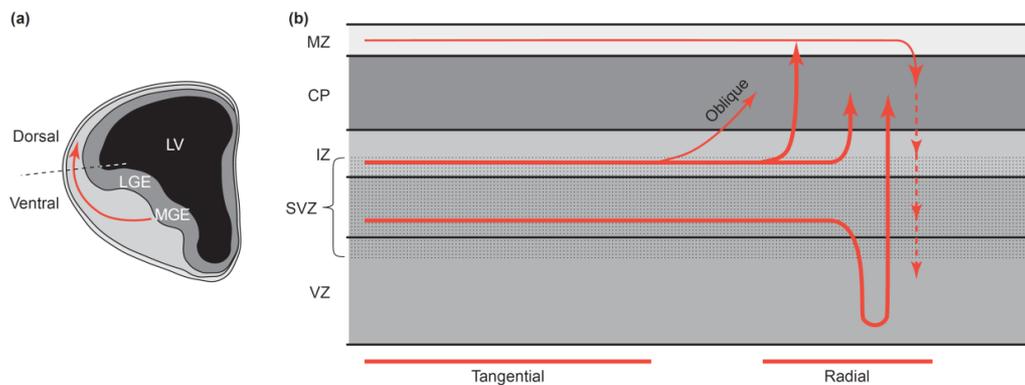
**Figure 8 : Les étapes de la migration des neurones corticaux de projection.** (1) Le neurone nouvellement né se détache de la surface ventriculaire dans la VZ et se déplace dans la SVZ où il adopte une morphologie multipolaire (2). Après la transition multipolaire à bipolaire (3), le neurone se déplace le long de la glie radiaire (4) jusqu'à ce qu'il atteigne la SP, et entre dans la CP (5). Quand le neurone a atteint la plus haute position de la CP, il se détache de la glie radiaire (6) et exécute une translocation somale terminale (7) pour conclure la migration radiaire et se positionner correctement (Hippenmeyer, 2014).

Le mouvement de migration par locomotion le long des fibres de glie radiaire est un mouvement saltatoire constitué de différentes étapes : (1) rapide extension rapide du processus antérieur ; (2) formation d'un gonflement à un endroit de la membrane du processus antérieur ; (3) avancement du centrosome jusque ce gonflement de membrane ; (4)

déplacement vers l'avant du soma (phénomène appelé nucleokinèse); (5) rétraction du processus postérieur. Ces étapes sont répétées jusqu'à ce que le neurone atteigne sa destination dans la CP (Schaar and McConnell, 2005; Tsai and Gleeson, 2005; Vallee et al., 2009).

### 1.3.2. La migration tangentielle

La migration tangentielle permet de mettre en place les interneurones. Les interneurones proviennent des éminences ganglionnaires médiales, latérales ou caudales (respectivement MGE, LGE et CGE) du télencéphale ventral. La MGE fournit la majorité des interneurones présents dans tout le cortex (65-70%), la CGE donne naissance aux interneurones qui sont présents dans les couches superficielles. La LGE et CGE ne fournissent que 35-30% des interneurones (Anderson et al., 2001; Lavdas et al., 1999). Par ailleurs, les interneurones de la MGE peuplent également l'hippocampe tandis que ceux provenant de LGE migrent aussi dans le bulbe olfactif (Ayala et al., 2007).



**Figure 9: Origine des interneurones et leurs modes de migration.** (a) Origine des interneurones dans le télencéphale ventral. La plupart des interneurones corticaux sont générés dans l'éminence ganglionnaire médiane (MGE) du télencéphale ventrale et migre à travers la jonction striato-corticale (ligne pointillée) pour entrer dans le télencéphale dorsal. (b) Phase de migration des interneurones dans le télencéphale dorsal. Les interneurones corticaux provenant du télencéphale ventral migrent tangentiellement dans le cortex, et ensuite changent leur direction pour entrer dans la plaque corticale en suivant une voie radiaire ou oblique. La ligne en pointillée indique que quelques interneurones descendent de façon radiaire dans la CP. Abréviations : LGE : éminence ganglionnaire latérale, MGE : éminence ganglionnaire médiane, LV : ventricule latéral (Kriegstein and Noctor, 2004).

Tous les interneurons corticaux quittant la MGE migrent tangentiellement pour atteindre le cortex. Néanmoins leur mode de migration varie au cours du développement (Figure 9). Au début de la neurogenèse chez les rongeurs, les cellules exprimant le GABA migrent à travers la IZ et se dispersent dans toutes les couches corticales. Par contre les cellules nées plus tard, migrent jusque la VZ et la SVZ pour seulement ensuite entrer dans le cortex. Dans le cortex en développement, les bandes initiales des interneurons migrant tangentiellement sont dans le bas de la IZ et de la SVZ et également dans la zone marginale (Anderson et al., 2001; Ang et al., 2003; Lavdas et al., 1999; Tanaka et al., 2003; Wichterle et al., 2001).

Une fois arrivés dans le cortex cérébral, les interneurons se dispersent tangentiellement et ensuite entrent dans la CP en tournant et en migrant de façon radiaire afin d'atteindre leur destination (Anderson et al., 2001; Polleux et al., 2002; Wichterle et al., 2001). La plupart de ceux-ci vont donc utiliser la voie la plus rapide. Par exemple, les cellules migrant tangentiellement dans la IZ-SVZ tournent, migrent soit de façon radiaire soit de façon oblique pour entrer dans le cortex par la bas; tandis que ceux présents dans la MZ pénètrent dans le cortex par le haut (Anderson et al., 2001; Ang et al., 2003; Tanaka et al., 2003). La phase radiaire poursuivie par les interneurons s'effectue soit le long des fibres de glie radiaire soit en suivant des forces d'attraction.

## **2. Résultats (Publication n° 1)**

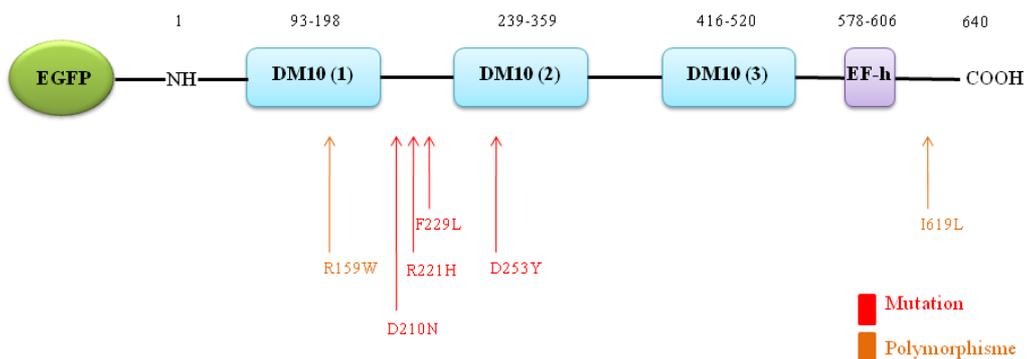
Afin de pouvoir étudier la localisation subcellulaire des protéines EFHC1 mutées, nous avons construit des protéines de fusion. Les protéines d'intérêt ont été couplées à une molécule fluorescente. Dans notre cas, nous avons utilisé l'EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein). Cette dernière correspond à une variante de la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) dans laquelle des résidus spécifiques ont été mutés afin d'augmenter la fluorescence de la protéine.

Les protéines de fusion possèdent de nombreux avantages. Tout d'abord, la GFP peut être observée directement dans les cellules sans immunomarquage préalable, ce qui permet d'étudier le caractère dynamique d'une protéine. De plus, cette protéine n'est pas toxique et sa fluorescence est compatible avec de nombreux fixateurs et permet de réaliser simultanément de nombreux marquages à l'aide de divers anticorps. Cependant, aucun modèle n'étant

parfait, celui-ci possède également des inconvénients : la surexpression d'une protéine peut altérer les propriétés physiologiques de celle-ci, notamment en induisant un mauvais adressage, en perturbant les fonctions et les interactions de la protéine. De plus, une trop grande expression de la protéine de fusion peut parfois entraîner des difficultés de visualisation ou la formation d'agrégats, cela pouvant rendre l'interprétation des résultats difficile (Tsien, 1998).

## 2.1. Les mutations d'EFHC1 étudiées

Comme nous l'avons signalé précédemment, de nombreuses mutations faux-sens associées à EFHC1 ont été découvertes dans diverses populations souffrant d'EMJ. Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur les quatre premières mutations découvertes par Suzuki (D210N, R221H, F229L, D253Y) et également sur deux polymorphismes de nucléotide simple (SNPs) (R159W et I619L) (Suzuki, 2004) (Figure 10). Les mutations faux-sens agiraient de façon dominante car elles exercent leur influence à l'état d'hétérozygote. Les SNPs, quant à eux, sont retrouvés également chez les personnes saines. Ils vont donc être utilisés comme contrôle afin de vérifier que les observations obtenues sont dues à la présence des protéines mutées.



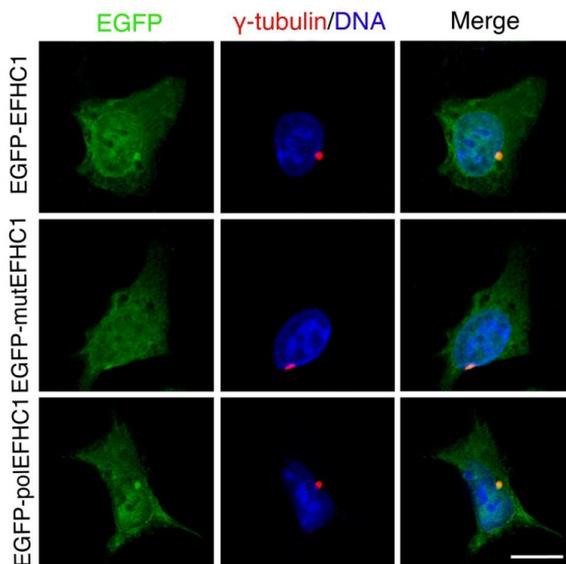
**Figure 10 :** Schéma de la protéine EFHC1 humaine fusionnée à l'EGFP au niveau de son extrémité N-terminale et localisation des mutations et polymorphismes étudiés.

Les mutations et les polymorphismes étudiés ont été introduits dans la protéine de fusion par mutagenèse dirigée. La protéine EGFP est présente à l'extrémité N-terminale. Il est important de noter que la présence de l'EGFP en N-terminal ou en C-terminal ne semble pas affecter la distribution de la protéine EFHC1 (de Nijs et al., 2006).

## 2.2. Localisation subcellulaire des formes mutées et polymorphiques d'EFHC1

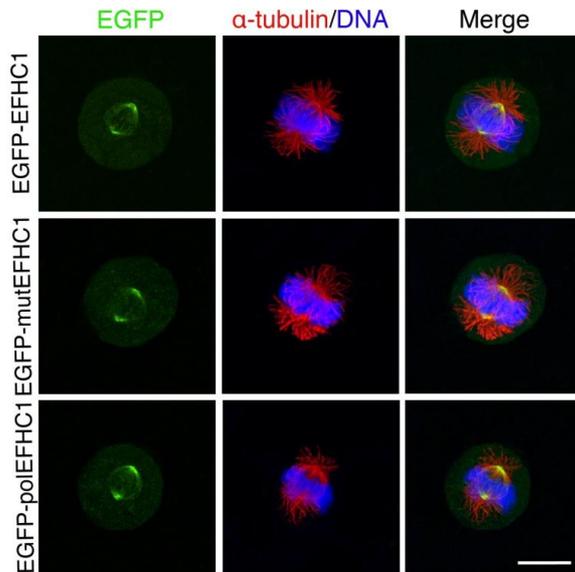
Au laboratoire, nous avons précédemment montré que, dans une cellule HEK293 (Human Embryonic Kidney) en interphase, la protéine EFHC1 se localise dans le cytoplasme, le noyau à l'exception des nucléoles et au niveau du centrosome. Nous avons dès lors examiné la distribution subcellulaire des mutants dans ces cellules HEK293 transfectées de façon transitoire avec les différentes constructions.

Dans une cellule en interphase, la protéine est observée dans tout le cytoplasme, le noyau à l'exception des nucléoles. Les protéines mutées et les polymorphismes co-localisent avec le centrosome. En effet, les immunomarquages au moyen d'un anticorps anti- $\gamma$ -tubuline, marqueur centrosomal, montrent une co-localisation avec la  $\gamma$ - tubuline (Figure 11).



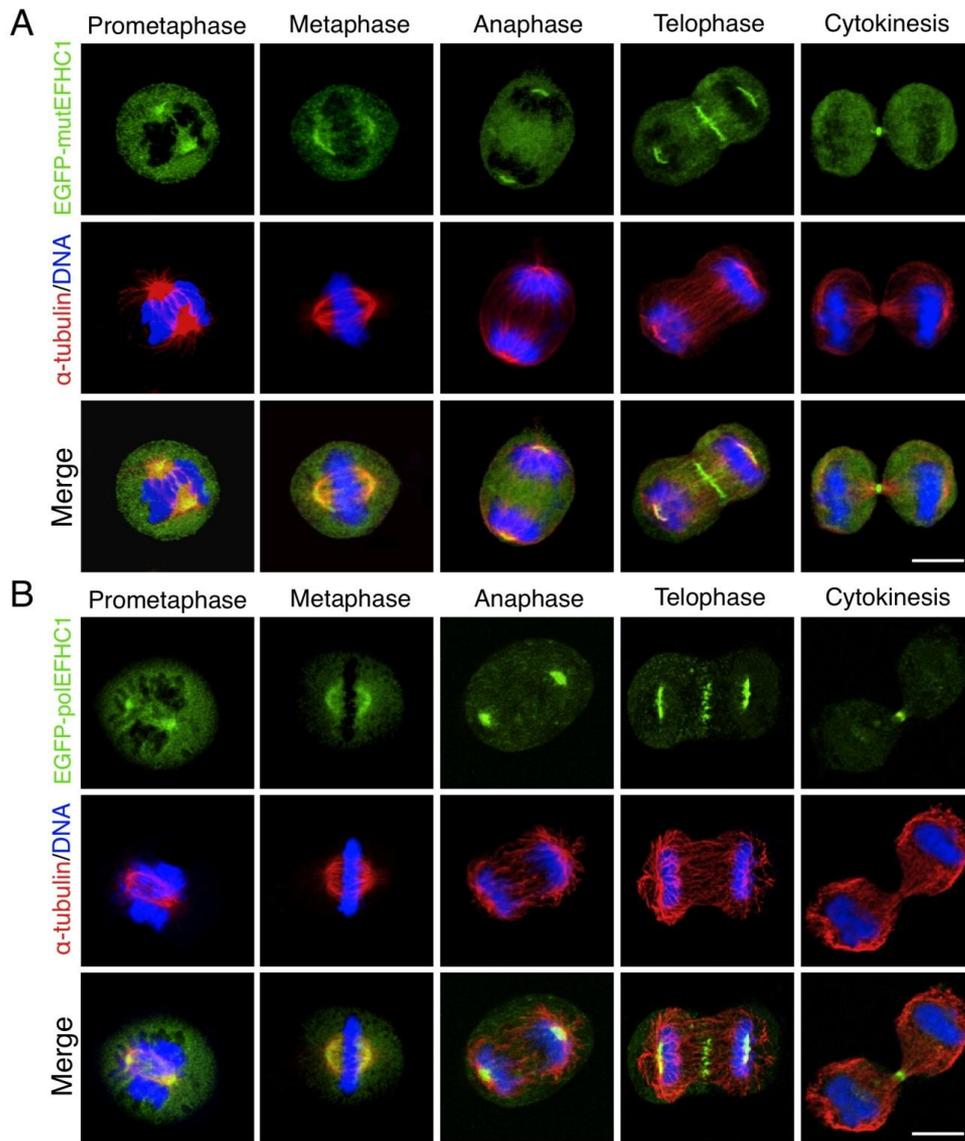
**Figure 11: Localisation subcellulaire des formes mutées et polymorphiques d'EFHC1 dans des cellules en interphase.** Cellules HEK293 exprimant les protéines EGFP-EFHC1, EGFP-mutEFHC1 ou EGFP-polEFHC1 (vert). Les images d'EGFP-mutEFHC1 et EGFP-polEFHC1 sont représentatives respectivement des mutants et des polymorphismes. Les cellules en interphase sont marquées avec la  $\gamma$ -tubuline (rouge) pour visualiser les centrosomes. L'ADN apparaît en bleu. Le panneau correspondant à la superposition montre la colocalisation avec le centrosome de toutes les protéines fusionnées avec l'EGFP. Barre d'échelle 20  $\mu$ m. (de Nijs et al., 2012)

Durant la mitose, les protéines mutées et polymorphiques conservent la même localisation subcellulaire que la protéine sauvage, à savoir une concentration au niveau des pôles du fuseau mitotique. En effet, grâce à un marquage immunologique à l'aide d'un anticorps anti- $\alpha$ -tubuline, marqueur spécifique du fuseau mitotique, nous observons que les différents types de protéine de fusion se localisent aux pôles du fuseau mitotique (Figures 12-13). Par la suite, nous avons vérifié nos résultats dans la lignée cellulaire HEK Flp-In T-Rex 293. Celle-ci est dérivée de la lignée continue de cellules HEK293. Ces cellules sont utilisées pour exprimer de façon stable un gène d'intérêt sous la dépendance d'un promoteur inductible à la tétracycline. Ce système a permis de confirmer les résultats obtenus précédemment aussi bien dans des cellules en interphase que dans des cellules en mitose (données non illustrées; (Wolkoff et al., 2012)).



**Figure 12: Localisation subcellulaire des protéines EFHC1 mutées et polymorphiques dans des cellules en mitose.** Cellules HEK293 exprimant les protéines EGFP-EFHC1, EGFP-mutEFHC1 ou EGFP-polEFHC1 (vert). Les images d'EGFP-mutEFHC1 et EGFP-polEFHC1 sont représentatives respectivement des mutants et des polymorphismes. Les cellules en mitose sont marquées avec l' $\alpha$ -tubuline pour visualiser les microtubules (rouge). L'ADN apparaît en bleu. Le panneau de superposition montre que les protéines fusionnées avec l'EGFP s'associent avec les pôles du fuseau mitotique. La barre d'échelle représente 20  $\mu$ m. (de Nijs et al., 2012)

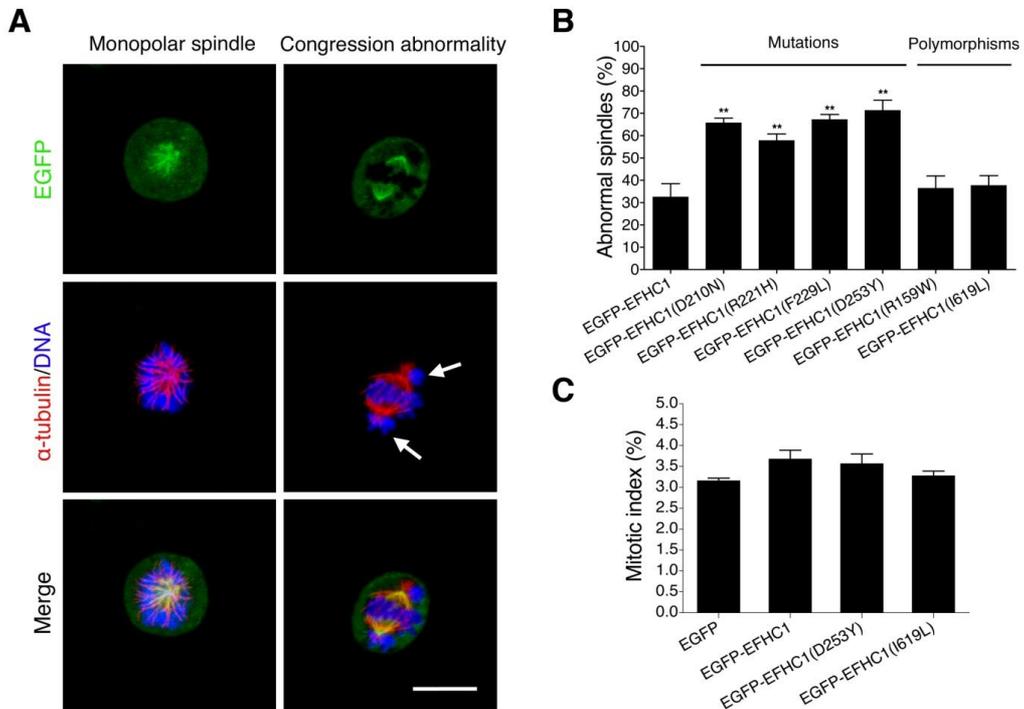
Ces résultats montrent clairement que la localisation subcellulaire des formes mutées de la protéine et des polymorphismes est identique à celle de la protéine sauvage. Ceci n'est pas surprenant si l'on se rappelle que les quatre mutations pathologiques se situent en dehors du domaine d'association aux microtubules, à savoir les 45 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale (de Nijs et al., 2006).



**Figure 13: Localisation subcellulaire des protéines EFHC1 mutées et polymorphiques dans des cellules durant les différentes phases de la mitose.** Cellules HEK293 exprimant une forme mutée (A) ou un polymorphisme d'EFHC1 (B) fusionnées avec l'EGFP (vert). Les images d'EGFP-mutEFHC1 et EGFP-polEFHC1 sont représentatives respectivement du mutant et du polymorphisme. Les cellules durant les différentes phases de la mitose (prométaphase, métaphase, anaphase, télophase et cytokinèse) sont marquées avec l' $\alpha$ -tubuline pour visualiser les microtubules (rouge). L'ADN apparaît en bleu. Le panneau de superposition montre que les protéines fusionnées avec l'EGFP s'associent avec le fuseau mitotique. La barre d'échelle représente 20  $\mu$ m. (de Nijs et al., 2012)

### 2.3. Les mutations d'EFHC1 induisent des anomalies de fuseau mitotique

Dans la suite de ce travail, nous avons voulu vérifier si les mutations d'EFHC1 induisaient des anomalies de fuseaux mitotiques semblables à celles produites en l'absence d'EFHC1 (de Nijs et al., 2009). Dans ce but, nous avons analysé la morphologie des fuseaux mitotiques dans des cellules HEK293 transfectées de façon transitoire avec soit la protéine sauvage, soit les mutants ou soit les polymorphismes d'EGFP-EFHC1 (Figure 14).



**Figure 14 : Les mutations d'EFHC1 induisent des anomalies de fuseaux mitotiques.** (A) Images représentatives des défauts de fuseau mitotique observés dans des cellules HEK293 exprimant les mutants d'EFHC1 (vert). Les fuseaux unipolaires et le mauvais alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale (anomalies de congession) sont montrés. Les cellules sont marquées avec l' $\alpha$ -tubuline (rouge) et l'ADN est en bleu. La barre d'échelle représente 20 $\mu$ m. (B) Quantification des fuseaux anormaux dans des cultures deux jours après transfection avec l'EGFP fusionnée avec la protéine sauvage, les mutants ou les polymorphismes d'EFHC1. (C) Quantification de l'index mitotique deux jours après la transfection avec EGFP, EGFP-EFHC1, le mutant EGFP-EFHC1(D253Y) ou le polymorphisme EGFP-EFHC1(I619L). La barre d'erreur représente les SEM. \*\*P<0.01 (de Nijs et al., 2012)

Nous avons observé deux types particuliers d'anomalies de fuseaux. Tout d'abord, les fuseaux unipolaires dans lesquels les chromosomes sont dispersés de manière sphérique autour d'un seul pôle. Ensuite, nous retrouvons les anomalies de congression correspondant à un mauvais alignement de certains chromosomes sur la plaque équatoriale (Figure 14A).

La quantification du nombre de fuseaux anormaux dans des cultures exprimant les différentes formes de la protéine de fusion (mutations, polymorphismes) montrent que le pourcentage de fuseaux anormaux augmente de façon significative en présence des protéines mutées ( $65,7 \pm 2,2\%$  pour D210N ;  $57,8 \pm 2,9\%$  pour R221H ;  $67,2 \pm 2,3\%$  pour F229L et  $71,3 \pm 4,6\%$  pour D253Y) comparé à la protéine sauvage ( $32,5 \pm 5,9\%$ ) ou aux polymorphismes ( $36,4 \pm 5,6\%$  pour R159W et  $37,7 \pm 4,5\%$  pour I619L) (Figure 14B). Par ailleurs, comme pour la localisation subcellulaire, nous avons confirmé ses résultats dans la lignée HEK Flp-In T-Rex-293.

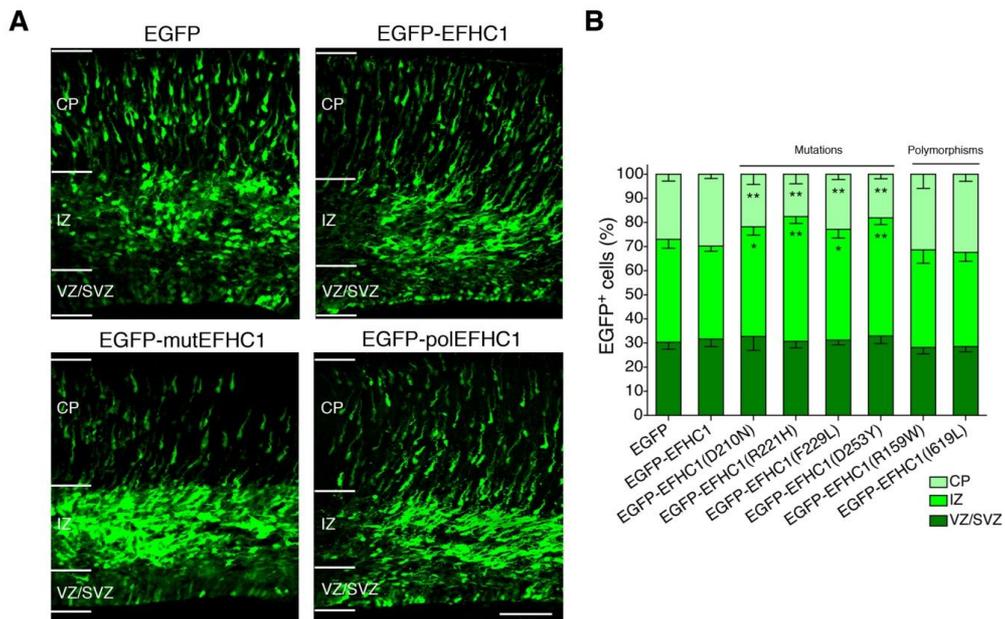
Nous avons précédemment démontré que l'absence d'EFHC1 augmente le pourcentage de cellules en mitose (de Nijs et al., 2009). C'est pourquoi, nous avons quantifié l'index mitotique, c'est-à-dire le nombre de cellules en mitose dans les cultures exprimant EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1(D253Y) ou (EGFP-EFHC1(I619L)) (Figure 14C). Nos résultats indiquent que la mutation EGFP-EFHC1(D253Y) (mutation induisant le plus de d'anomalies de fuseaux) ou le polymorphisme (EGFP-EFHC1(I619L)) n'accroissent pas le pourcentage de cellules en mitose. Aucune différence statistiquement significative n'est obtenue entre les différentes conditions.

Des résultats antérieurs ont montré que la forme tronquée de la protéine de fusion EGFP-hN45, protéine constituée des 45 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale, qui s'associe au fuseau mitotique mais qui induit une forte augmentation du nombre de fuseaux anormaux, déplace la protéine endogène de ses sites de liaison au fuseau mitotique, et agit, dès lors, comme un dominant négatif (de Nijs et al., 2009). Les résultats obtenus avec les protéines mutées sont semblables à ceux obtenus avec la forme EGFP-hN45. Nous émettons dès lors l'hypothèse que les mutations agissent de la même manière, à savoir comme un dominant négatif et perturbent la fonction de la protéine endogène.

## 2.4. Les mutations d'EFHC1 altèrent la migration radiaire des neurones de projections corticaux

Notre laboratoire a préalablement montré par électroporation *ex vivo* chez le rat qu'en présence d'un shARN dirigé contre rEFHC1, la plupart des cellules reste localisé dans la zone VZ/SVZ et ne migre pas dans la CP. Ces résultats suggèrent que l'altération de la fonction d'EFHC1 agit directement sur la migration radiaire des neurones de projection excitateurs (de Nijs et al., 2009).

Suite à ce résultat, nous avons étudié l'impact des mutations de la protéine EFHC1 sur la migration radiaire. Pour ce faire, nous avons introduit dans les cellules progénitrices neuronales par électroporation *in utero* chez la souris à E14.5 nos protéines d'intérêt à savoir la protéine sauvage, les protéines mutées et les polymorphismes couplées à l'EGFP. Trois jours après électroporation, nous avons analysé la distribution des cellules EGFP<sup>+</sup> dans VZ/SVZ, IZ et CP.

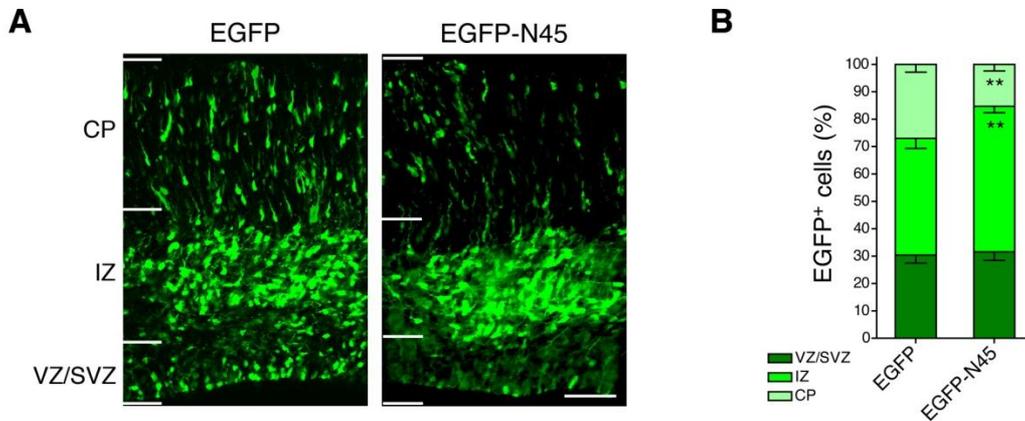


**Figure 15: La surexpression des mutations d'EFHC1 altère la migration radiaire des neurones de projection dans le cortex cérébral.** (A) Distribution des cellules EGFP<sup>+</sup> dans les différentes régions corticales (VZ/SVZ, IZ et CP) trois jours après électroporation *in utero* à E14.5 de l' EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1(D253Y) ou EGFP-EFHC1(I619L) (vert). Les images d'EGFP-EFHC1(D253Y) ou EGFP-EFHC1(I619L) sont représentatives respectivement des mutants et des polymorphismes. Le panneau se rapportant à l'EGFP-EFHC1(D253Y) montre un défaut de migration radiaire dans la plaque corticale. La barre d'échelle représente 100µm. (B) Quantification des cellules EGFP<sup>+</sup> dans les différentes régions corticales (VZ/SVZ, IZ et CP) trois jours après électroporation *in utero* à E14.5. Les barres d'erreur montrent les SEM. \*P<0.05, \*\*P<0.01. (de Nijs et al., 2012).

La quantification du nombre de cellules EGFP<sup>+</sup> dans les différentes couches montre qu'en présence des polymorphismes la distribution de celles-ci est semblable à celle de la protéine sauvage ou de l'EGFP (Figure 15).

Par contre, les mutations induisent une stagnation de cellules électroporées dans la zone intermédiaire et par conséquent une diminution du pourcentage de cellules EGFP<sup>+</sup> dans la plaque corticale. Elles altèrent donc la migration radiaire des neurones de projection et agiraient comme des protéines à effet dominant négatif.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons vérifié l'effet de la forme tronquée appelée EGFP-N45 sur la migration radiaire. Elle ne comporte plus aucun des domaines identifiés sur la protéine complète, excepté le domaine de liaison aux microtubules, permettant la liaison au fuseau mitotique et au centrosome. Les résultats obtenus sont semblables à ceux observés en présence des protéines mutées, à savoir les cellules migrent jusque la IZ pour y stagner (Figure 16).



**Figure 16: La surexpression de la forme tronquée dominant-négatif d'EFHC1, ne comportant que les 45 premiers acides aminés, altère la migration radiaire des neurones de projection dans le cortex cérébral.** (A) Distribution des cellules EGFP<sup>+</sup> dans les différentes régions corticales (VZ/SVZ, IZ et CP) trois jours après électroporation *in utero* à E14.5 de l'EGFP ou EGFP-N45 (vert). Le panneau se rapportant à l'EGFP-N45 montre un défaut de migration radiaire dans la plaque corticale. La barre d'échelle représente 100µm. (B) Quantification des cellules EGFP<sup>+</sup> dans les différentes régions corticales (VZ/SVZ, IZ et CP) trois jours après électroporation *in utero* à E14.5. Les barres d'erreur montrent les SEM. \*\*P<0.01 (de Nijs et al., 2012).

## 2.5. Les formes mutées d'EFHC1 n'affectent pas la prolifération cellulaire et la sortie de cycle cellulaire

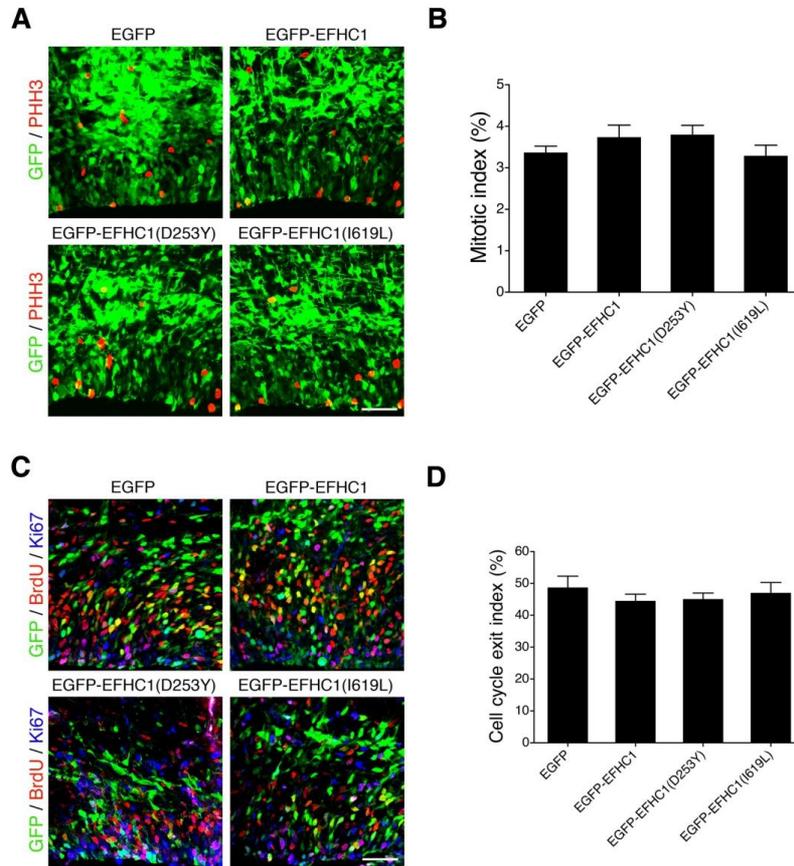
Avant d'entrer en migration, les progéniteurs neuronaux se divisent intensivement. Nous avons dès lors voulu examiner l'effet des mutations d'EFHC1 sur la mitose, la prolifération et la sortie de cycle cellulaire des progéniteurs corticaux par électroporation *in utero* à E14.5. Comme l'altération de la migration radiaire est semblable chez tous les mutants et les polymorphismes, nous avons sélectionné le mutant qui induit l'altération de la migration la plus drastique, à savoir EGFP-EFHC1(D253Y) et un des polymorphismes EGFP-EFHC1(I619L).

Tout d'abord, nous avons effectué, sur des cerveaux collectés deux jours après électroporation, des immunomarquages à l'aide d'un anticorps anti-phospho-Histone H3 (PHH3), un marqueur spécifique de cellules en mitose (Figure 17A). Tout comme les résultats obtenus *in vitro*, les mutations ne modifient pas l'index mitotique (Figure 17B).

Ensuite, nous avons vérifié si les mutations d'EFHC1 perturbaient le taux de sortie de cycle cellulaire des progéniteurs corticaux. Après électroporation à E14.5 comme précédemment décrit, une injection de BrdU a été administrée aux mères gestantes à E15.5 et les embryons à E16.5 ont été sacrifiés. Nous avons effectué un triple immun marquage avec des anticorps dirigés contre la protéine fluorescente verte (GFP), BrdU (5'-bromo-2'-deoxyuridine) et Ki67, marqueur de prolifération. Le BrdU est un analogue de la thymidine qui s'incorpore dans l'ADN durant la phase S de la mitose. Il marque donc les cellules qui étaient en cycle 24h avant la fixation, tandis que Ki67 indique les cellules qui sont toujours en cycle au moment de la fixation (Figure 17 C).

L'index de sortie de cycle cellulaire correspond donc au pourcentage de cellules EGFP<sup>+</sup> qui sont sorties de cycle cellulaire (EGFP<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup>/Ki-67) sur le nombre total de cellules EGFP<sup>+</sup> qui ont incorporé le BrdU (EGFP<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup>). Il nous renseigne sur le pourcentage de cellules progénitrices qui ont quitté le cycle cellulaire pour devenir des neurones post-mitotiques. Comme nous pouvons l'observer dans la figure 17D, les mutations n'influencent pas la sortie de cycle cellulaire.

Les résultats obtenus dans cette section montrent que ni la prolifération, ni la sortie de cycle cellulaire des progéniteurs corticaux ne sont influencés par les mutations d'EFHC1.



**Figure 17: Les mutants d'EFHC1 n'influencent pas la prolifération et la sortie de cycle des progéniteurs corticaux.** (A) Les cellules de la zone VZ/SVZ sont marquées avec PHH3 (rouge), un marqueur mitotique. Ce marquage s'effectue sur des cerveaux après électroporation *in utero* à E14.5 de l'EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1(D253Y) ou EGFP-EFHC1(I619L) (vert). (B) Quantification de l'index mitotique pour les différentes conditions décrites ci-dessus. (C). Immunomarquages BrdU (rouge) et Ki67 (bleu) de cellules de la VZ/SVZ dans des cortex deux jours après électroporation *in utero* à E14.5 de l'EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1(D253Y) ou EGFP-EFHC1(I619L) (vert). (D) Quantification de la sortie de cycle cellulaire pour les différentes conditions décrites. La barre d'échelle représente 50µm. Les barres d'erreur montrent les SEM. (de Nijs et al., 2012)

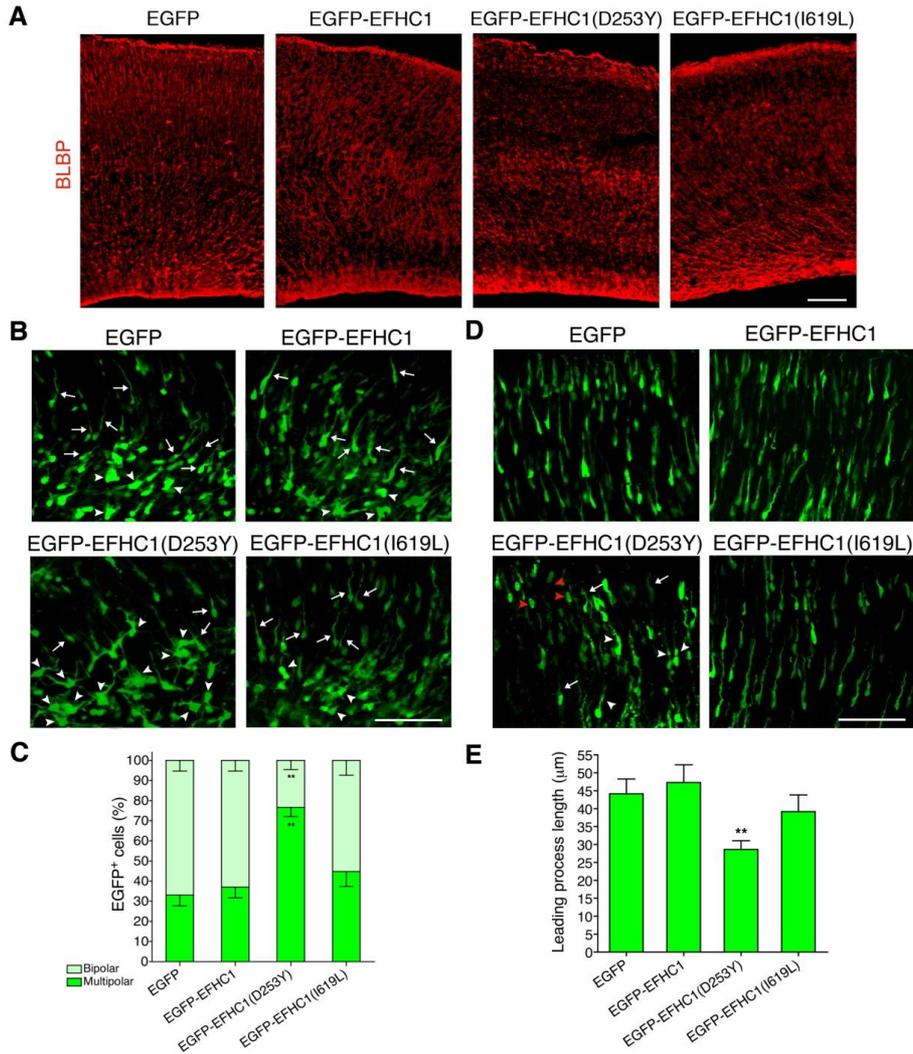
## 2.6. Les mutants d'EFHC1 affectent la morphologie de la glie radiaire et des neurones de projections

Afin de mieux comprendre les défauts observés des mutants sur la migration radiaire et l'accumulation des cellules dans la IZ, nous nous sommes intéressés à la morphologie de la glie radiaire et des cellules en migration dans la IZ et la CP. Nous avons, dès lors, effectué des immunomarquages à l'aide d'un anticorps anti- BLBP, un marqueur de glie radiaire. Dans les cortex contrôles (EGFP, EFHC1 et EFHC1(I619L)), les fibres de la glie radiaire sont bien parallèles avec une surface piaie très marquée, correspondant à la présence de nombreux pieds piaux (Figure 18A). Par contre, les cortex électroporés avec EGFP-EFHC1(D253Y) montrent une réduction importante de l'étendue et du nombre de fibres radiaire avec très peu de pieds piaux. Les mutations induisent donc une altération importante de la glie radiaire.

Par après, nous nous sommes focalisés sur la IZ, et nous avons quantifié plus particulièrement le nombre de cellules présentant la morphologie multipolaire (Figure 18B, tête de flèche) ou bipolaire (Figure 18B, flèche). Nous avons montré que l'expression de la protéine mutée EGFP-EFHC1(D253Y) conduit à une accumulation du nombre de cellules multipolaires (Figure 18C,  $76,7 \pm 4,54$  %) par rapport aux contrôles EGFP ( $33,1 \pm 5,4\%$ ), EGFP-EHFC1 ( $37,1 \pm 5,3\%$ ), EGFP-EFHC1(I619L) ( $44,7 \pm 7,4\%$ ). Ceci suggère qu'il y a un défaut dans la transition multipolaire-bipolaire.

Finalement dans la plaque corticale, nous nous sommes intéressés à la longueur et à l'orientation du processus antérieur. Dans les cerveaux électroporés avec EGFP, EGFP-EFHC1 et EGFP-EFHC1(I619L), les cellules marquées sont bien de forme bipolaire et présentent un corps cellulaire allongé et des processus antérieurs orientés approximativement dans la même direction (Figure 18D).

Par contre, en présence de la mutation EGFP-EFHC1(D253Y) le processus antérieur semble plus court et enroulé sur lui-même ou encore montre des gonflements (Figure 18D, flèche blanche). De plus, des cellules arrondies sans processus antérieur sont également observées (Figure 18D, flèche rouge).



**Figure 18 : Les mutants d’EFHC1 affectent la morphologie de la glie radiaire et des neurones post-mitotiques.** (A) Immunomarquages effectués à l’aide de l’anticorps anti-BLBP, marqueur de glie radiaire, dans des cortex trois jours après électroporation *in utero* à E14.5 avec EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1(D253Y), EGFP-EFHC1(I619L). Le mutant EGFP-EFHC1(D253Y) montre une modification de la glie radiaire. La barre d’échelle représente 100μm. (B) La morphologie des cellules dans la IZ de cerveaux trois jours après électroporation *in utero* à E 14.5 avec EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1(D253Y), EGFP-EFHC1(I619L) (vert). Les cellules exprimant EGFP, EGFP-EFHC1 ou EGFP-EFHC1(I619L) sont majoritairement bipolaires (flèche blanche) alors que celles électroporées avec le mutant EGFP-EFHC1(D253Y) restent en grande partie sous la forme multipolaire (tête de flèche blanche). (C) Quantification du nombre de cellules multipolaires ou bipolaires dans la IZ pour chacune des conditions. (D) Morphologie des cellules dans la CP dans des cerveaux 3 jours après électroporation *in utero* à E14.5 avec EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1(D253Y), EGFP-EFHC1(I619L) (vert). Les cellules électroporées avec EGFP, EGFP-EFHC1 ou EGFP-EFHC1(I619L) présentent un long processus antérieur tandis que celles avec la mutation EGFP-EFHC1(D253Y) montrent un processus anormal : court, enroulé (flèche blanche) et présentant plusieurs gonflements (tête de flèche blanche) ou encore des cellules de forme arrondie sans processus antérieur (flèche rouge). (E) Quantification de la longueur du processus antérieur des cellules en migration dans la plaque corticale pour les différentes conditions. Les barres d’échelle représentent 100 μm. Les barres d’erreur montrent les SEM. \*P<0,05 et \*\*P<0,01. (de Nijs et al., 2012)

La quantification montre que la longueur du processus antérieur des neurones en migration dans la plaque corticale est raccourcie en présence de la protéine mutée (Figure 18E : EGFP :  $44,1 \pm 4,1 \mu\text{m}$  ; EGFP-EFHC1 :  $47,3 \pm 4,9 \mu\text{m}$  ; EGFP-EFHC1(D253Y) :  $28,6 \pm 2,4 \mu\text{m}$  et EGFP-EFHC1(I619L) :  $39,2 \pm 4,7 \mu\text{m}$ ). Ces résultats montrent que la présence de mutation d'EFHC1 altère l'extension du processus antérieur et perturbe la nucleokinèse des neurones en migration.

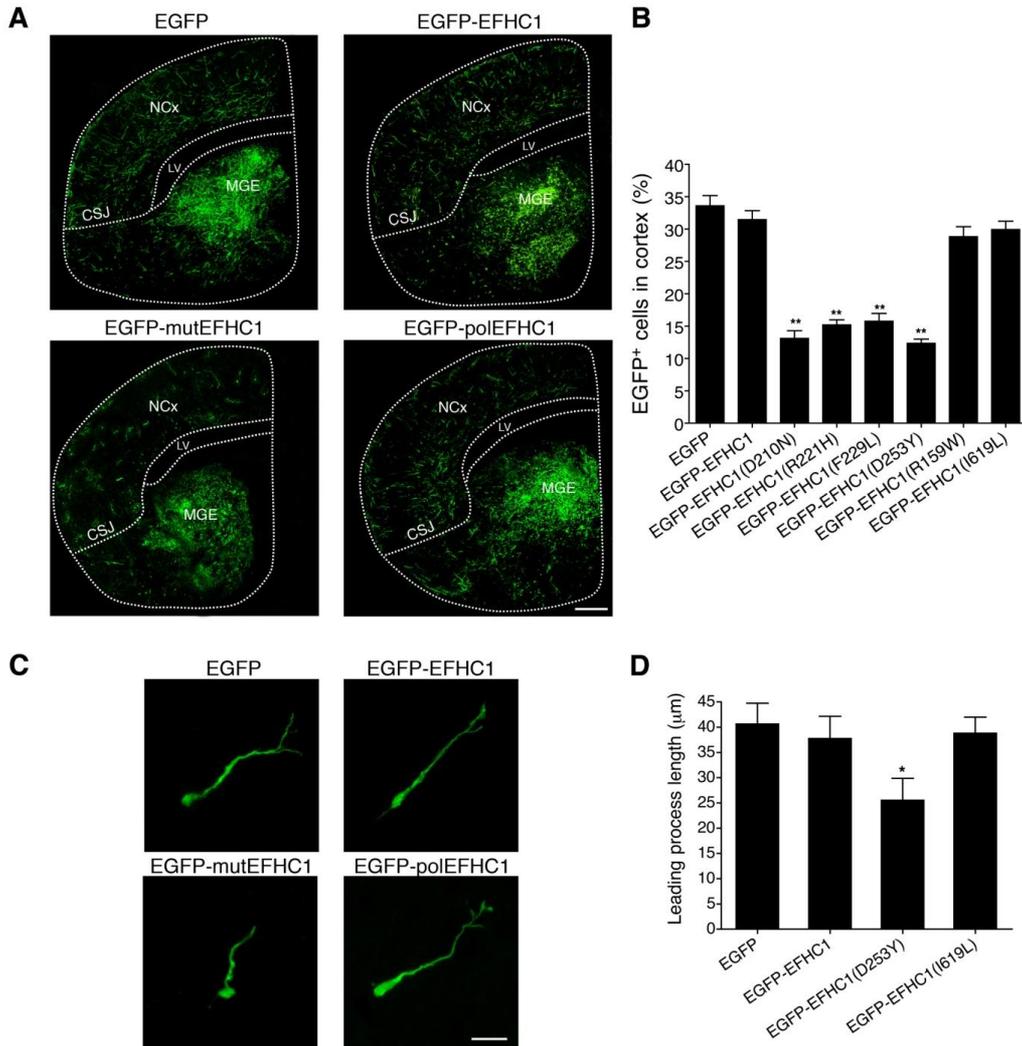
Les résultats obtenus dans cette partie suggèrent que les mutants d'EFHC1 modifient la morphologie de la glie radiaire et des neurones de projection à différentes étapes de la migration radiaire, conduisant ainsi leur accumulation dans la zone intermédiaire et affectant leur migration correcte jusqu'à la plaque corticale.

## **2.7. Les mutants d'EFHC1 affectent la migration tangentielle des interneurones**

Pendant le développement cortical, les migrations radiaire et tangentielle mettent en place différents types de neurones qui contrôlent l'équilibre entre l'excitation et l'inhibition synaptique. Cet équilibre pourrait être altéré dans certains phénomènes épileptiques (Wong and Guo, 2013). Comme nous l'avons montré dans la section précédente, les mutations d'EFHC1 perturbent la migration radiaire, nous avons dès lors étudié l'impact de celles-ci sur la migration tangentielle des interneurones.

Pour ce faire, l'éminence ganglionnaire médiane de culture organotypique de tranches de cerveaux de rat à E17 a été électroporé de manière focale (électroporation focale). Trois jours après électroporation des différentes conditions (EGFP, protéine sauvage, mutations et polymorphismes d'EFHC1), la position des neurones a été analysée et nous avons quantifié la proportion de cellules EGFP<sup>+</sup> qui ont traversé la jonction striato-corticale (CSJ) pour rejoindre le néocortex (NCx) (Figure 19A).

Le pourcentage de cellules EGFP-EFHC1 n'est pas statistiquement différent de celui de l'EGFP (Figure 19B). Cela indique que la surexpression d'EFHC1 n'affecte pas la migration tangentielle des interneurones dans le cortex cérébral en développement.



**Figure 19 : L'expression des mutants d'EFHC1 interfère avec la migration tangentielle des interneurons et leur morphologie.** (A) Distribution des cellules EGFP<sup>+</sup> dans une tranche coronale de cerveau de rat trois jours après électroporation focale à E17 de l'EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1 (D253Y) ou EGFP-EFHC1(I619L) (vert). Les images EGFP-EFHC1(D253Y) et EGFP-EFHC1(I619L) sont représentatives des mutants et polymorphismes, respectivement. Barre d'échelle 200 µm. (B) Quantification de cellules EGFP<sup>+</sup> dans le cortex 3 jours après électroporation focale à E17. Les barres d'erreur montrent les SEM. \*\*P<0.01. (C) Morphologie des interneurons en migration dans des tranches de cerveaux trois jours après électroporation focale des conditions EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1 (D253Y) ou EGFP-EFHC1(I619L) (vert). La plupart des cellules exprimant EGFP-EFHC1 (D253Y) apparaissent avec un processus antérieur plus court et enroulé. La barre d'échelle représente 20µm. (D) Quantification de la longueur du processus antérieur des cellules en migration dans le cortex. Les barres d'erreur montrent les SEM. \*P<0.05. (de Nijs et al., 2012)

Par contre, l'expression des mutants induit une diminution du pourcentage de cellules EGFP<sup>+</sup> qui ont atteint le cortex comparée avec l'EGFP, la protéine sauvage et les

polymorphismes (Figure 19B,  $13,1 \pm 3,6\%$  pour D210N ;  $15,2 \pm 2,9\%$  pour R221H ;  $15,8 \pm 4,5 \%$  pour F229L et  $12,3 \pm 2,4\%$  pour D253Y).

Nous avons ensuite examiné la morphologie des cellules qui ont migré dans le cortex (Figure 19C). Nous avons montré que, tout comme pour les neurones de projection, la plupart des interneurons exprimant une protéine mutée d'EFHC1 ont un processus antérieur plus court et également enroulé (Figure 19D,  $40,6 \pm 4,1\mu\text{m}$  pour EGFP ;  $37,7 \pm 4,5\mu\text{m}$  pour EFHC1 ;  $38,8 \pm 4,4 \mu\text{m}$  pour EGFP-EFHC1(I619L) contre  $25,5 \pm 4,3\mu\text{m}$  pour EGFP-EFHC1(D253Y)).

Tous ces résultats montrent qu'EFHC1 est nécessaire aussi bien pour la migration radiaire que pour la migration tangentielle des interneurons, et pourrait réguler la morphologie des cellules et la formation des processus durant la migration.

### **3. Discussion et conclusions préliminaires**

Des précédents travaux menés au laboratoire ont permis de montrer qu'EFHC1 est une nouvelle protéine associée aux microtubules (MAP) jouant un rôle clé dans le contrôle de la mitose et surtout au cours de la migration des neuroblastes au cours de la corticogenèse chez l'embryon (de Nijs et al., 2006; de Nijs et al., 2009).

Dans cette première partie, nous avons dès lors voulu étudier l'impact de quatre mutations pathologiques associées à l'EMJ (D210N, R221H, F229L, D253Y) et de deux polymorphismes (R159W et I619L) sur les propriétés d'EFHC1 tant au niveau de sa localisation subcellulaire qu'au cours du développement du cortex cérébral. L'introduction des mutations faux-sens dans la séquence de la protéine EFHC1 nous permet de nous rapprocher des conditions rencontrées chez les patients atteints de cette maladie.

Nous avons tout d'abord montré que, dans les cellules HEK293 transfectées transitoirement et les cellules HEK Flp-In T-Rex-293 transfectées de façon stable, les protéines mutées et les polymorphismes présentent la même localisation subcellulaire que la protéine sauvage. Elles s'associent au fuseau mitotique et au centrosome. Ces résultats ne sont

pas surprenant vu que les mutations sont situées en dehors du domaine d'association aux microtubules d'EFHC1 (45 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale). Cependant, les protéines mutées augmentent le nombre de fuseaux anormaux (fuseaux unipolaires et anomalies de congression) (Figure 14). Des résultats similaires ont été obtenus lors de la surexpression d'EGFP-N45, une forme tronquée présentant des effets dominants négatifs. En effet, elle ne comporte plus aucun des domaines identifiés sur la protéine complète, excepté le domaine de liaison aux microtubules, permettant la liaison au fuseau mitotique. De Nijs et collaborateurs ont montré que cette forme tronquée remplace la forme endogène au niveau des pôles des fuseaux mitotiques anormaux dans les lignées cellulaires, suggérant qu'elle peut s'associer aux mêmes structures que la forme complète mais pas remplir ses fonctions (de Nijs et al., 2009). Ces données suggèrent que les protéines mutées semblent perturber les fonctions de la protéine endogène EFHC1 en agissant comme des dominants-négatifs.

Dans le cortex en développement, nous avons montré que la surexpression des mutants d'EFHC1 perturbe à la fois la migration radiaire et tangentielle en affectant différentes étapes de la corticogenèse cérébrale : l'extension de la glie radiaire (Figure 18), la transition multipolaire-bipolaire dans la IZ (Figure 18) et la formation du processus antérieur des cellules durant la migration radiaire et tangentielle (Figures 18-19).

Dans une étude précédente, nous avons montré que la diminution de fonction d'EFHC1 induite par la forme dominant-négatif EGFP-N45 et par interférence d'ARN conduisait également à une altération de la migration radiaire. Le tableau 2 résume les données obtenues par les 2 approches différentes, à savoir d'une part la surexpression de formes mutées ou tronquées de la protéine et d'autre part l'interférence d'ARN tant sur la division cellulaire que sur le développement cérébral *in utero*.

**Tableau 3 : L'effet d'une mutation ponctuelle, de la forme tronquée et d'ARN interférence sur la division cellulaire, la migration radiaire et tangentielle.**

	Mutation ponctuelle	Forme tronquée	Interférence d'ARN
<b>Cellules en culture</b>			
- Anomalies de fuseaux	↑	↑	↑
- Index mitotique	≡	↑	↑

<b>Migration radiaire</b>			
- Espèce	Souris	Rat / souris	Rat
- Electroporation	<i>In utéro</i>	<i>Ex vivo / In utéro</i>	<i>Ex vivo</i>
- % cellules dans VZ/SVZ-IZ-CP	≡ - ↑ - ↓	≡ - ↑ - ↓	↑ - ↓ - ↓
- Apoptose	nd	↑ (rat)	↑
- Index mitotique	≡	↑ (rat)	↑
- Sortie de cycle cellulaire	≡	↑ (rat)	↑
- Locomotion	nd	↓ (rat)	↓
- Morphologie cellules VZ/SVZ	≡	↑ rondes	↑ rondes
- Morphologie cellules IZ	↑ multipolaires	nd	nd
- Morphologie cellules CP	↓ longueur processus antérieur	nd	nd
- Morphologie glie radiaire	↓ extension	↓ extension	↓ extension
<b>Migration tangentielle</b>			
- Espèce	Rat	nd	Rat
- Electroporation	Focale	nd	Focale
- Migration cortex	↓	nd	↓
- Apoptose	nd	nd	≡
- Morphologie cellules	↓ longueur processus antérieur	nd	↓ longueur processus antérieur

**Légende :** ↓ : diminution ; ↑ : augmentation ; ≡ : inchangé ; nd : non déterminé.

Comme nous pouvons le voir, les deux approches produisent des effets semblables. La seule différence concerne la migration radiaire puisque dans ce cas, il y a accumulation des cellules dans la VZ/SVZ avec le shARN mais pas lorsque les formes mutées ou tronquée sont surexprimées. Une explication possible pourrait résider dans d'éventuels effets « off-targets » du shARN utilisé. Baek et collaborateurs ont démontré que les shARN dirigés contre les ARNm codant la DCX ou Dclk1 induisent des anomalies de migration aussi importantes chez les souris sauvages que knock-out pour les gènes étudiés. Ils ont ensuite démontré que les cellules en migration expriment un ensemble de miARN spécifique et que les shARN utilisés dérégulent l'expression de certains de ces miARN (Baek et al., 2014). Nous pourrions donc imaginer que les cellules situées dans la SVZ expriment un ensemble particulier de miARN dont certains seraient ciblés de façon involontaire par notre shARN ce qui induirait de la sorte

un phénotype particulier que nous ne rencontrons pas lorsque nous surexprimons les formes mutées ou tronquées d'EFHC1.

Signalons cependant que les shARN utilisés chez le rat ont été testés chez la souris EFHC1 KO. Chez les souris sauvages, la proportion de cellules atteignant la CP en présence du shARN contrôle est de 18% contre 8% en présence du shARN dirigé contre EFHC1. Par contre, chez la souris EFHC1-KO la proportion de cellules atteignant la CP est d'environ 18% quelque soit le shARN utilisé (de Nijs, données non publiées). Si l'amplitude de l'effet du shRNA est moindre chez la souris que le rat, il n'en demeure pas moins qu'il est spécifique puisque absent chez la souris EFHC1-KO.

Concernant les effets produits par les mutants ponctuels, ils sont relativement comparables, quoique moins drastiques que ceux produits par la forme tronquée d'EFHC1 ne comprenant plus que les 45 premiers résidus. En effet, les mutants n'induisent pas, par exemple, d'apoptose ou d'augmentation de l'index mitotique. Ils agiraient donc plutôt comme des « dominants-négatifs modérés ». Cela peut s'expliquer par le fait que les mutations sont localisées entre les domaines fonctionnels mais aussi parce que ces domaines sont répétés.

Au cours de nos expériences sur la migration neuronale, nous avons étudié plus en détail la morphologie des cellules transfectées par les formes mutées d'EFHC1. Nous avons observé des altérations de l'extension de la glie radiaire (Figure 18), de la transition multipolaire-bipolaire dans la IZ (Figure 18) et de la formation du processus antérieur des cellules durant la migration radiaire et tangentielle (Figures 18-19). Ceci diffère nettement de la morphologie des cellules exprimant la forme tronquée d'EFHC1 ou le shARN puisque dans ce cas une grande proportion des cellules de la VZ/SVZ et de la IZ présentent une morphologie arrondie, et les quelques cellules présentent dans la CP montrent un raccourcissement drastique ou manquent de processus antérieur, confirmant en quelque sorte l'effet « modéré » des mutations.

Les différentes phases de la migration touchées par les mutations ou la perte de fonction d'EFHC1 impliquent le remodelage de la forme des cellules. Ce dernier dépend grandement du réarrangement des microtubules (Ayala et al., 2007; Jaglin and Chelly, 2009; Kriegstein and Noctor, 2004; Schaar and McConnell, 2005). Plusieurs MAPs connues pour avoir la même distribution cellulaire, telles que LIS1 et DCX, régulent de façon directe la

dynamique des microtubules en induisant des changements morphologiques important pour le développement cortical (LoTurco and Bai, 2006; Tsai and Gleeson, 2005; Valiente and Marin, 2010). Tout comme les autres MAPs, EFHC1 semble être impliquée dans la régulation des changements morphologiques nécessaires pour les différentes étapes de la migration neuronale. Ces nouveaux résultats renforcent notre hypothèse qu'EFHC1 jouerait un rôle dans la dynamique des microtubules. Le mécanisme précis par lequel EFHC1 est impliqué dans la migration radiaire et tangentielle reste encore à élucider.

## **Chapitre 2:**

**L'influence des mutations d'EFHC1  
mutée sur la différenciation terminale  
des neurones dans le cortex cérébral**



## 1. Introduction

Dans le premier chapitre, nous avons étudié l'impact des mutations d'EFHC1 sur les premières étapes du développement du cortex cérébral. Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés aux dernières étapes du développement cortical, à savoir la mise en place des axones, des dendrites et des épines dendritiques. Afin de faciliter la compréhension des résultats, nous allons vous rappeler quelques notions qui traitent du cytosquelette, des microtubules, de la croissance axonale et dendritique et des épines dendritiques.

### 1.1. Généralités

La fonction du système nerveux dépend de l'architecture complexe du réseau de neurones élaboré durant le développement. Durant leur morphogenèse, les neurones deviennent polarisés et ils construisent deux compartiments structurellement et fonctionnellement distincts : l'axone et les dendrites. L'axone correspond à un long et mince processus qui conduit l'influx nerveux sur de longue distance et délivre le signal aux autres cellules. Les dendrites, quant à elles, reçoivent et intègrent l'information au niveau de leurs épines qui correspondent à de minces protubérances localisées sur celles-ci. En se développant, les dendrites se ramifient pour former des dendrites à chaque fois de plus en plus petites. Les dendrites qui se développent directement à partir du soma sont appelées dendrites primaires. Ces dernières se subdivisent en dendrites secondaires qui elles-mêmes se subdivisent en dendrites tertiaires plus petites (Poulain and Sobel, 2010).

Par ailleurs, l'architecture de l'axone et des dendrites varie en fonction de son type, de son environnement, de sa fonction et également selon les espèces. Par exemple, les invertébrés ont principalement des neurones unipolaires tandis que la majorité des neurones des vertébrés sont multipolaires (Grueber et al., 2005).

A la fois chez les vertébrés et les invertébrés, la morphogenèse neuronale s'effectue en plusieurs étapes successives : la formation de l'axone précède généralement le développement des dendrites. Au départ, le neurone possède plusieurs courts processus morphologiquement identiques. Ensuite, un des neurites va croître plus rapidement et se développer en axone

tandis que les autres ralentissent leur croissance. Ces modifications morphologiques permettent au neurone d'acquies sa polarité. Finalement, la maturation dendritique s'achève avec la formation des synapses (Poulain and Sobel, 2010).

La mise en place de ces processus (axonogenèse, dendritogenèse et synaptogenèse) nécessite la modulation du cytosquelette d'actine et de microtubules. Actuellement, les microtubules sont considérés comme des régulateurs importants de la morphogenèse neuronale. Ils ne fournissent pas uniquement un support pour le transport actif de membranes, d'organelles et de macromolécules requis pour le développement. Mais ils participent également au contrôle de la modification de la forme grâce à leur dynamique (Neukirchen and Bradke, 2011). Etant donné que nous avons montré qu'EFHC1 est une protéine associée aux microtubules (de Nijis et al., 2009), nous nous focaliserons sur ceux-ci.

## **1.2. Le cytosquelette de microtubules neuronal**

### **1.2.1. Les microtubules**

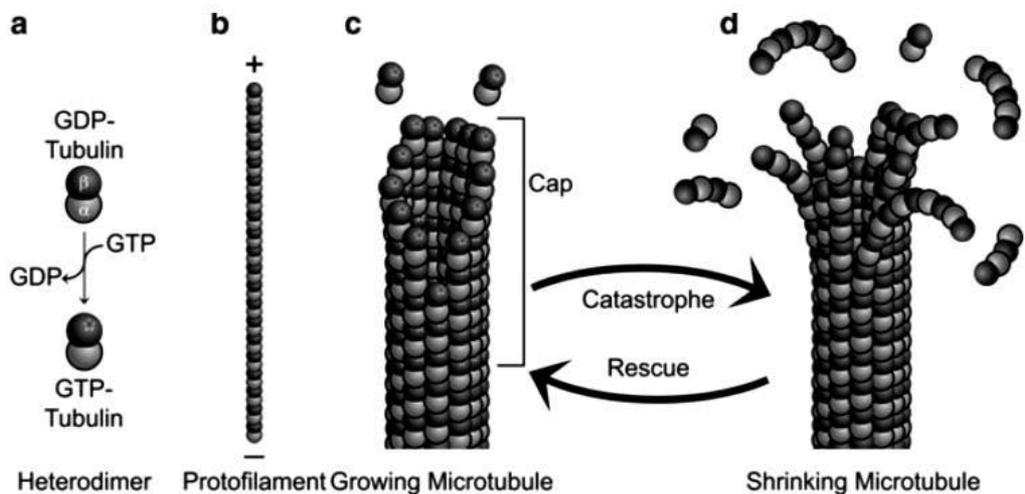
Les microtubules sont constitués de monomères de tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  qui s'associent en hétérodimères (Figure 20). Ces derniers se lient de façon « tête à queue » pour former des protofilaments linéaires. Généralement, le microtubule est formé de treize protofilaments qui s'associent latéralement et parallèlement, pour former un cylindre creux de 25 nm de diamètre (Evans et al., 1985). Ainsi, la formation d'un microtubule s'effectue en deux phases : une phase initiale (lente) limitante nommée nucléation, suivie d'une phase d'élongation (rapide). L'ajout des dimères de tubuline peut se dérouler aux deux extrémités. L'orientation régulière des dimères confère une polarité aux microtubules.

Les microtubules montrent deux fonctionnalités différentes aux deux extrémités. Une extrémité à croissance lente, appelée extrémité « moins », qui est attachée au centre organisateur de la cellule; et une extrémité à croissance rapide, nommée extrémité « plus », orienté vers la périphérie de la cellule (Mitchison and Kirschner, 1984).

Dans les neurones, les microtubules sont disposés de façon parallèle dans les axones et les dendrites. Ceux-ci sont requis pour la croissance et le maintien des neurites. Cependant, l'organisation des microtubules varie entre les axones et les dendrites. En effet, les microtubules axonaux sont tous orientés avec leur extrémité « plus » vers la partie distale de l'axone, alors que les extrémités « plus » des microtubules des dendrites sont dirigés soit vers le soma soit vers l'extrémité de la dendrite (Kwan et al., 2008).

### 1.2.2. La dynamique des microtubules

Chaque monomère de tubuline possède un site de liaison au GTP. Le GTP lié à l' $\alpha$ -tubuline est capturé à l'interface du dimère, tandis que le GTP lié à la  $\beta$ -tubuline est échangeable et hydrolysable en GDP. L'extrémité « plus » possède des sous-unités  $\beta$  porteuses de GTP qui constituent une « coiffe » stabilisatrice qui permet l'assemblage d'autres hétérodimères (Figure 20).



**Figure 20: Les microtubules.** (A) Hétérodimère de tubulines  $\alpha$  et  $\beta$ . (B) Protofilament constitué d'hétérodimères de tubuline. (C-D) Représentation schématique de l'instabilité dynamique des microtubules. Adapté de (Breuss and Keays, 2014). Explications détaillées dans le texte.

Lorsque la coiffe disparaît par hydrolyse, le microtubule se désassemble très rapidement. Le comportement dynamique des microtubules est caractérisé par des phases de croissance et des phases de désassemblage à l'extrémité « plus » (Mitchison and Kirschner,

1984). La phase de désassemblage est appelée « catastrophe » alors que la phase de la reprise de croissance est nommée « sauvetage ». (Figure 20) (Cheeseman and Desai, 2008).

La dynamique des microtubules reflète l'échange des sous-unités à l'extrémité « plus ». Plusieurs paramètres peuvent quantifier cette dynamique : les vitesses d'assemblage et de désassemblage, les transitions entre les phases de catastrophe et de sauvetage et le temps passé dans les différents états (Cassimeris et al., 1988; Sammak and Borisy, 1988; Walker et al., 1988).

La dynamique des microtubules est notamment régulée par l'association avec des MAPs. Il existe différents types de MAPs : celles qui favorisent la polymérisation et donc la stabilisation des microtubules, et d'autres qui vont induire leur dépolymérisation. Nous pouvons les classer en trois catégories : les MAPs stabilisatrices, les MAPs déstabilisatrices et les MAPs localisées à l'extrémité plus (plus end tracking protein : +TIPS) (Akhmanova and Steinmetz, 2010).

- **Les MAPs stabilisatrices :**

Les plus connues sont tau, MAP1B et MAP2. Ces protéines sont fortement exprimées dans les cellules neuronales et elles s'associent aux microtubules en se liant à deux dimères de tubulines consécutifs. Cette liaison empêche la dissociation des sous-unités et a donc comme effet d'inhiber les catastrophes et de favoriser les sauvetages (Desai and Mitchison, 1997).

- **Les MAPs déstabilisatrices :**

Les microtubules peuvent être déstabilisés par trois mécanismes différents. Le premier mécanisme se déroule par l'intermédiaire de la stathmine qui séquestre les dimères de tubuline libre. Ainsi, elle diminue la concentration effective en sous-unités de tubulines disponibles pour la polymérisation (Belmont et al., 1990). Le deuxième mécanisme, quant à lui, permet de réguler la longueur et le comportement cinétique des microtubules par cassure ou « severing ». Les protéines agissant dans ce mécanisme sont la katanine, la spastine et la fidgetine, protéines appartenant à la famille des protéases AAA (ATPases Associated with

diverse of cellular activities) (Zhang et al., 2007). Enfin, la dernière possibilité est l'intervention des kinésines 13. Ces kinésines ont la particularité d'hydrolyser l'ATP pour dépolymériser les microtubules. Elles induisent donc un changement de conformation de la tubuline insérée à l'extrémité du microtubule et conduit à la catastrophe (Ems-McClung and Walczak, 2010).

- **Les MAPs associées à l'extrémité plus des microtubules (+TIPs)**

Ces protéines s'accumulent à l'extrémité croissante du microtubule et s'associent généralement sur une courte longueur nouvellement polymérisée. Il existe plusieurs types de protéines +TIPs qui se distinguent par des éléments centraux permettant d'interagir entre-elles ou encore avec les microtubules. Par exemple, il y a les protéines EB, CAP-GLY, TOG, les protéines motrices,... (Akhmanova and Steinmetz, 2010).

Nous ne détaillerons que les protéines EB car elles représentent un outil de mesure des paramètres des microtubules. En effet, une étude a montré qu'il est possible de visualiser les protéines EB3-GFP accumulées à l'extrémité « plus » du microtubule (Stepanova et al., 2003). Ces protéines ne suivent pas l'extrémité de celui-ci de façon progressive mais s'échangent rapidement à l'extrémité « plus » par la reconnaissance notamment de la coiffe de GTP (Zanic et al., 2009). Elles sont très importantes dans la dynamique des microtubules et elles jouent un rôle central dans le recrutement de plusieurs protéines +TIPs. Elles aident également à la stabilité et à la polymérisation des microtubules soit en réduisant le taux de catastrophe soit en facilitant les événements de sauvetage (Akhmanova and Steinmetz, 2008). Les protéines EB sont au nombre de trois et se différencient par leur localisation. Les protéines EB1 et EB2 ont une distribution ubiquitaire alors qu'EB3 est principalement exprimée dans le système nerveux (Nakagawa et al., 2000).

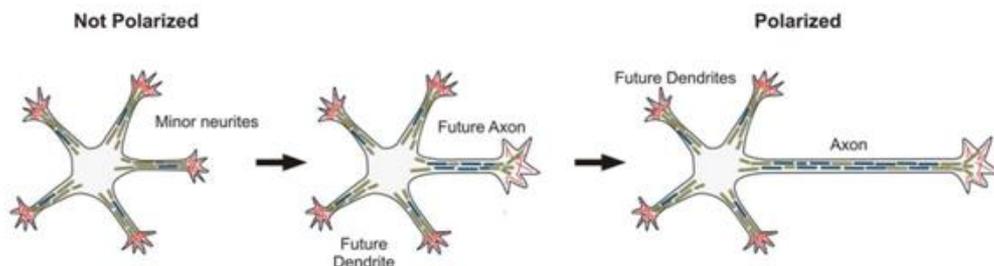
Nous pouvons également citer deux autres MAPs impliquées dans le développement cortical : LIS1 et DCX. En effet, LIS1 est impliquée dans la migration neuronale et également dans la formation des axones. L'inhibition de cette protéine n'affecte pas l'assemblage des microtubules mais il diminue la capacité des microtubules à pénétrer dans le domaine périphérique du cône de croissance et augmente le temps de pause (Ayala et al., 2007; Grabham et al., 2007; Tsai et al., 2005). La protéine DCX, quant à elle, est impliquée dans

l'assemblage des microtubules et dans la formation de l'axone et plus particulièrement dans la phase de consolidation de celui-ci (Friocourt et al., 2003; Kappeler et al., 2006).

### 1.3. La polarisation neuronale

Quand les neurones corticaux ont subi leur différenciation, ils ressemblent à des sphères rondes et non polarisées constituées de plusieurs neurites mineures (LoTurco and Bai, 2006). Durant la migration, les cellules multipolaires se polarisent et développent un axone et ultérieurement plusieurs dendrites. Après la neuritogenèse, la première étape importante dans la polarisation neuronale se déroule lorsqu'une des neurites mineures s'allonge rapidement et devient l'axone tandis que les autres neurites mineures restent courtes et se développent en dendrites. Donc, l'élongation rapide du futur axone et simultanément l'inhibition de la croissance des futures dendrites correspondent à la première étape de la polarisation des neurones. La spécification axonale est le processus fondamental qui permet au neurone d'acquérir sa physiologie et sa morphologie complexe. Les neurones sont alors constitués d'un compartiment somatodendritique et d'un compartiment axonal (Stiess and Bradke, 2011).

La spécification du futur axone est conduite par les cytosquelettes d'actine et microtubulaire (Figure 21) et le centrosome.



**Figure 21: La polarisation d'un neurone.** Explication détaillée dans le texte. Adapté de (Stiess and Bradke, 2011).

Il a été montré dans les cultures de cellules granulaires du cervelet et de neurones d'hippocampe que la position du centrosome détermine le site de formation de l'axone (de Anda et al., 2005). En effet, le centrosome et l'appareil de Golgi subissent une translocation dans les neurones multipolaires dans le cortex en développement. La position de ces organelles détermine préférentiellement la croissance d'une des neurites en axone. Ainsi, la position du centrosome et de l'appareil de Golgi pourrait donc affecter le destin de la neurite proximale car la croissance axonale nécessite la livraison continue de membrane et de microtubules dans le cône de croissance axonale (Bradke and Dotti, 1997; Jareb and Banker, 1997; Yu and Baas, 1994). De plus, comme le centrosome et l'appareil de Golgi sont les sources primaires des microtubules (Baas, 1996; Efimov et al., 2007), leur localisation pourrait être importante pour la livraison préférentielle de molécules nécessaires au futur axone permettant ainsi le maintien de la spécification et de la trajectoire de l'axone en croissance (Arimura and Kaibuchi, 2007; Wiggin et al., 2005).

Cependant, à ce jour, ce n'est pas encore clair si le centrosome contrôle directement la polarité ou si son action est indirecte (Arimura and Kaibuchi, 2007; Higginbotham et al., 2006; Witte et al., 2008). De plus, la possibilité qu'il n'ait aucune relation entre le centrosome et le futur axone est également soutenue par une étude menée sur les drosophiles. En effet, durant le développement, celles-ci perdent leur centrosome et le système nerveux se développe normalement et la direction de la croissance axonale ne semble pas être affectée (Basto et al., 2006). Cependant, le moment précis de cette perte n'est pas encore déterminé car ce dernier est présent et fonctionnel durant l'embryogenèse.

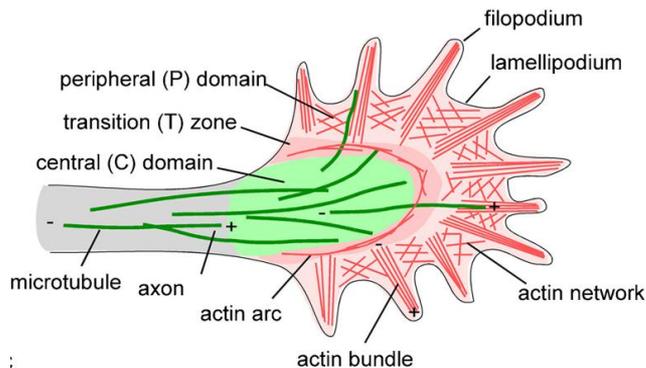
## **1.4. La croissance axonale**

### **1.4.1. Le cône de croissance**

La croissance de l'axone se déroule dans la partie la plus motile de celui-ci à savoir le cône de croissance (Lowery and Van Vactor, 2009). Cette structure est visible à l'extrémité des neurites en développement. Elle permet d'explorer l'environnement et également de générer les forces nécessaires à la progression des neurites. La croissance du cône de croissance est très dynamique et très sensible aux signaux extracellulaires (Conde and

Caceres, 2009; Lowery and Van Vactor, 2009). Ainsi, durant la période de croissance, la dynamique du cytosquelette permet la motilité et le mouvement vers l'avant du cône de croissance qui détermine la direction et l'élongation du processus. Le cytosquelette est composé de filaments d'actine qui régule la forme et la direction de la croissance du cône alors que les microtubules permettent de maintenir la structure de l'axone, essentiel à son extension (Stiess and Bradke, 2011).

Le cône de croissance est divisé en trois parties (Figure 22): un domaine périphérique (P), une zone de transition (T) et un domaine centrale (C) (Lowery and Van Vactor, 2009).

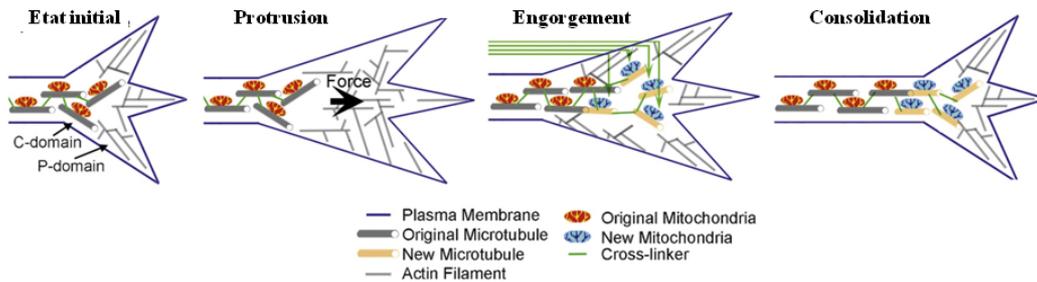


**Figure 22: Schéma des trois domaines et des structures du cytosquelette dans le cône de croissance.** L'extrémité « plus » et « moins » des microtubules ainsi que les filaments d'actines sont indiqués. Explication dans le texte. (Suter and Miller, 2011)

Le domaine P est constitué par des filaments d'actine hautement dynamiques et en constant renouvellement. Ils forment à la fois les filopodes (protubérance mince et fine constituée d'actine enroulée) et le lamellipode (extension membranaire constituée d'un réseau d'actine non filamenteuse). Le domaine C est composé de microtubules provenant de la structure de l'axone et qui se polymérisent. Les organelles et les vésicules sont transportées le long de ces microtubules dans le cône de croissance. La zone de transition est une petite bande entre les domaines C et P où les microtubules et les filaments d'actine interagissent. La dynamique entre ces deux composants du cytosquelette conduit à la croissance des neurites (Schaefer et al., 2002).

### 1.4.2. L'extension de l'axone

L'axone s'étend en stabilisant la partie distale du domaine C du cône de croissance en même temps que le cône de croissance avance. L'allongement de l'axone proprement dit va se dérouler en trois étapes qui se répètent successivement : protrusion, engorgement et consolidation (Goldberg and Burmeister, 1986) (Figure 23).



**Figure 23 : Modèle standard d'élongation de l'axone.** Ce modèle se divise en trois phases : protrusion, engorgement et consolidation. Explication dans le texte (adapté de (Suter and Miller, 2011)).

Durant la phase de protrusion, le cytosquelette d'actine est poussé vers l'avant grâce à la myosine II motrice présente au niveau de la zone T. Durant la phase d'engorgement, les filaments d'actine présents dans la zone T se désassemblent et un arc d'actine va se reformer plus loin en direction du cône de croissance. Cela crée un corridor qui est envahi par les microtubules (Schaefer et al., 2002). A partir de ce moment, les organelles et les vésicules investissent aussi le nouvel espace. Finalement, des microtubules vont venir s'ajouter à ceux déjà mis en place et ainsi allonger l'axone durant cette dernière phase de consolidation. La récurrence de ces trois étapes permet l'extension de l'axone (Lowery and Van Vactor, 2009).

### 1.5. Le développement des dendrites

Comme nous l'avons signalé précédemment, l'orientation bipolaire des microtubules dans les dendrites est une des principales caractéristiques qui les distinguent des axones. En effet, il a été proposé que cette double orientation est établie par des protéines motrices qui sont capables de transporter des microtubules avec leurs extrémités « plus » ou « moins » orientées vers la partie distale de la dendrite (Baas, 1999). C'est le cas notamment de la

protéine motrice CHO1 qui est présente au niveau des dendrites et permet l'établissement de cette double orientation (Sharp et al., 1997). Ainsi, par exemple, l'absence de cette protéine inhibe la différenciation dendritique. Les dendrites acquièrent donc des caractéristiques axonales et les microtubules ne sont plus orientés que dans un seul sens (Sharp et al., 1997; Yu et al., 2000).

Par ailleurs, des MAPs structurelles, telles que MAP2 et MAP1A, sont également impliquées dans la différenciation des dendrites. Ainsi, la protéine MAP2 s'associe le long des microtubules et elle contribue à leur stabilisation en créant des liens avec les microtubules adjacents (Farah and Leclerc, 2008). Des études ont montré que l'absence de cette protéine empêche la différenciation dendritique. De plus, les souris déficientes pour le gène codant cette protéine engendre une diminution de la longueur des dendrites dans des neurones d'hippocampe (Harada et al., 2002). D'autres études ont également suggéré que cette protéine interagirait avec d'autres protéines impliquées dans le remodelage et la plasticité synaptique. La protéine MAP1A, quant à elle, est importante pour la croissance dendritique et le remodelage dendritique. Elle est particulièrement présente dans les dendrites matures. La diminution de l'expression de ce gène n'affecte pas l'élongation des dendrites primaires mais elle inhibe le branchement de celles-ci (Szebenyi et al., 2005).

## **1.6. Les épines dendritiques**

### **1.6.1. Généralités**

En 1888, l'espagnol Ramon y Cajal découvrit à la surface des dendrites des cellules de Purkinje de poule de petites protubérances qu'il nomma comme « espinas » : épines (Ramon, 1888). Les épines dendritiques sont présentes aussi bien chez les animaux supérieurs (Gray et al., 1982) que chez les insectes (Coss and Perkel, 1985; Leiss et al., 2009). Dans le cortex et l'hippocampe, les cellules pyramidales sont généralement épineuses. De plus, les cellules de Purkinje (cellules granulaires du cervelet), les cellules du gyrus denté, les cellules granulaires du cortex et du striatum médian sont aussi des neurones épineux (Dunaevsky et al., 1999). Par contre, dans le cortex, dans les structures sous-corticales telles que l'hippocampe et le striatum et dans le cervelet, les neurones non épineux sont généralement des interneurons.

Les épines dendritiques, sont donc de petites protubérances émises par la dendrite qui possèdent un cou formant l'attache à la dendrite et une tête, renflement au bout duquel s'établit généralement la connexion synaptique. Les parties présynaptiques axonales contenant les vésicules chargées de neurotransmetteurs font face aux épines. L'épine dendritique constitue donc la partie post-synaptique. Entre ces deux structures, il y a la fente synaptique de 10 à 20 nm de large. Cet ensemble constitue donc la synapse axospineuse qui a une fonction excitatrice.

### 1.6.2. La morphologie des épines

La visualisation des épines dendritiques est aisée notamment grâce au marquage Golgi ou par l'utilisation d'anticorps spécifiques. Leur observation a permis de montrer qu'elles ont des formes et des tailles très variables. De plus, l'avènement des nouvelles technologies, et plus particulièrement grâce aux enregistrements en temps réel sur des tissus vivants, ont révélé qu'en plus d'avoir des morphologies très différentes, elles sont très motiles et plastiques (Bonhoeffer and Yuste, 2002; Segal, 2005).

Quatre types différents sont généralement décrits (Figure 24) :

*Filopode* : Les filopodes correspondent aux précurseurs des épines dendritiques. Ils sont caractérisés par une extension longue, fine, sans tête. Ils sont abondamment présents durant le développement des neurones. Néanmoins, ils peuvent être retrouvés dans le cerveau adulte mais le plus souvent après une ischémie ou durant la régénération après une altération neuronale (Maletic-Savatic et al., 1999).

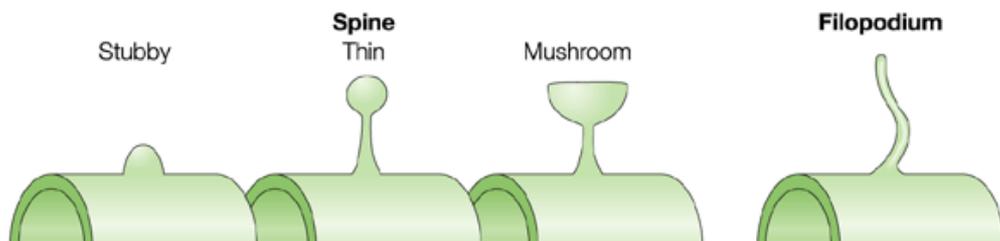
De plus, les filopodes sont des structures très motiles et flexibles avec une durée de vie assez courte pouvant aller de quelques minutes à quelques heures (Dailey and Smith, 1996; De Roo et al., 2008; Zuo et al., 2005). Comme ils sont très motiles, ce sont des structures idéales pour explorer l'espace autour des dendrites et chercher des partenaires particuliers. Les filopodes peuvent de manière répétitive créer des contacts transitoires avec des axones. Cependant, seule une partie de ses contacts seront stabilisés pendant une courte période grâce à la génération de courant transitoire de calcium (Lohmann and Bonhoeffer, 2008).

Par ailleurs, il est intéressant de noter qu'ils peuvent être morphologiquement et fonctionnellement transformés en épines (De Roo et al., 2008; Maletic-Savatic et al., 1999; Marrs et al., 2001; Trachtenberg et al., 2002; Zuo et al., 2005). Néanmoins, ce procédé n'est pas très efficace. En effet, les études d'imagerie en temps réel sur des tranches d'hippocampe montrent que seuls 10-20% des filopodes sont transformés en épines. La plupart du temps, ceux-ci disparaissent dans les jours qui suivent (De Roo et al., 2008; Zuo et al., 2005).

Les *épines fines* (« *thin spine* ») sont caractérisées par un long cou (>1µm de long) et une petite tête. Elles sont capables de changer leur forme très rapidement. En microscopie électronique, elles sont caractérisées par une faible densité post-synaptique et peu de réticulum endoplasmique lisse. De plus, la tête de ce type d'épine est fortement enrichie en filament d'actine qui intervient dans la motilité et les changements de forme des épines. (Gray et al., 1982; Harris and Stevens, 1988; Trachtenberg et al., 2002).

Les *épines champignon* (« *mushroom spine* ») sont constituées par un cou serré et une large tête évoquant la forme d'un champignon. La stabilité de ces épines et la force de leur synapse sont grandes.

Les épines dites « *stubby* » sont assez peu décrites dans la littérature. Mais, elles sont caractérisées morphologiquement par un diamètre de cou aussi large que la tête de l'épine. Tout comme les épines en champignon, leur stabilité et la force de leur synapse sont importantes (Harris et al., 1984; Harris and Stevens, 1988).



**Figure 24 : Représentation schématique de la morphologie des épines dendritiques** (Yuste and Bonhoeffer, 2004). Explications détaillées dans le texte.

### 1.6.3. Les microtubules et les épines

La présence de microtubule et de leurs protéines associées dans les épines a longtemps été controversée. Grâce aux techniques d'imagerie en direct de protéines couplées à un fluorochrome, Gu et ses collaborateurs (Gu et al., 2008) ont montré la présence de microtubules dans les épines et leur polymérisation directement à l'intérieur de celles-ci.

Une étude récente a également montré que les microtubules pénètrent uniquement dans un faible pourcentage d'épines dendritiques (environ 1%) et que leur passage n'est que transitoire, la moyenne est de 3 minutes par invasion (pouvant aller de 20 secondes à environ 30 minutes). De plus, cette étude fournit comme information supplémentaire qu'en une heure les microtubules entrent dans 10% des épines dendritiques et par extrapolation, les auteurs émettent l'hypothèse que toutes les épines dendritiques pourraient être envahies par les microtubules en une journée (Hu et al., 2008).

La présence de microtubules dans les épines dendritiques est corrélée avec l'activité synaptique. En effet, le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) augmente l'entrée de microtubule dans les épines dendritiques. Le nocodazole, quant à lui, inhibe la formation des épines dendritiques en empêchant la polymérisation des microtubules. Par contre, une faible concentration en taxol, induisant l'augmentation de la polymérisation des microtubules, augmente la formation des épines dendritiques induite par le BDNF. Tout cela montre que la dynamique des microtubules peut agir soit en faisant germer de nouvelles épines dendritiques, soit en inhibant le désassemblage d'épines préalablement formées (Gu et al., 2008). Il est intéressant de noter que les microtubules qui pénètrent dans les épines sont très dynamiques par opposition à ceux présents dans les dendrites qui sont très stables (Jaworski et al., 2009; Kaech et al., 2001).

## 2. Résultats

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que les mutations d'EFHC1 altèrent aussi bien la migration radiaire que la migration tangentielle dans le cerveau en développement.

Dans cette partie, nous nous sommes particulièrement intéressés aux dernières étapes de la mise en place des neurones de projection du cortex cérébral, à savoir l'axonogenèse, la dendritogenèse et la mise en place des épines dendritiques. Comme ces étapes s'effectuent principalement après la migration, nous avons analysé ces paramètres chez les nouveau-nés.

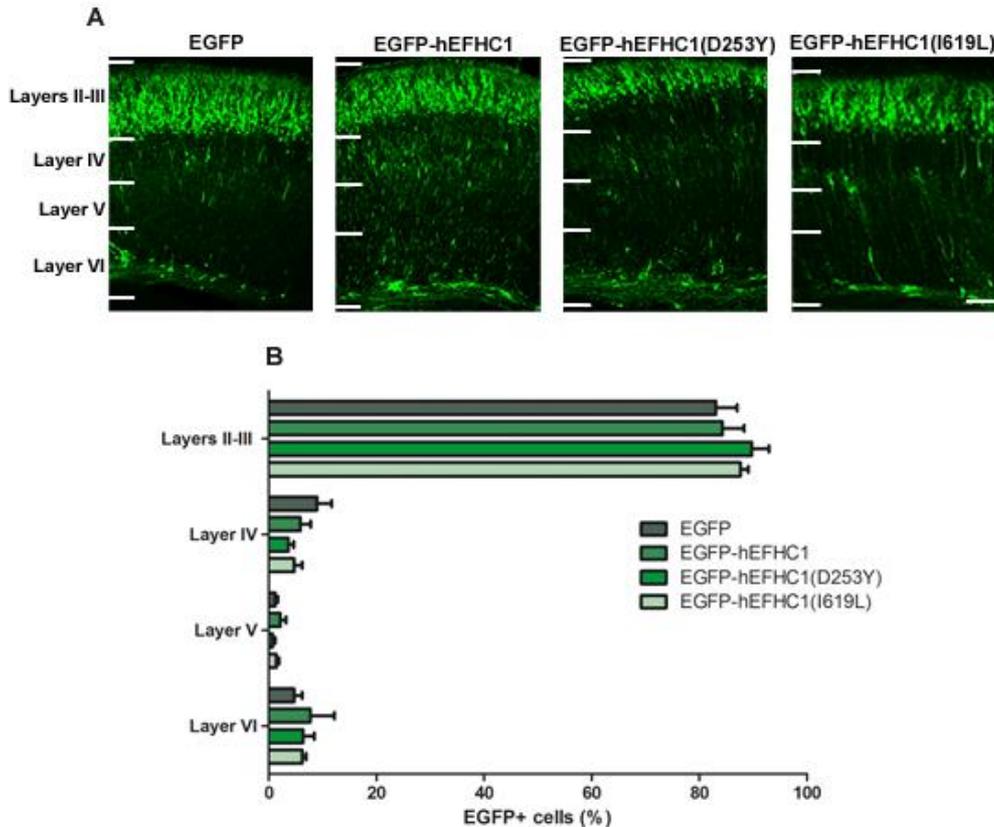
## **2.1. Influence des mutations d'EFHC1 sur la migration radiaire à P5**

Avant d'étudier les différentes étapes de la différenciation terminale, nous avons préalablement voulu savoir où se positionnent les neurones exprimant EFHC1 muté aux stades ultérieurs du développement cérébral. Restent-ils bloqués indéfiniment dans la zone intermédiaire ou finissent-ils par atteindre leur destination dans les couches supérieures ?

Pour ce faire, nous avons électroporé comme précédemment des souris gestantes à E14.5 avec EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1(D253Y) (mutation induisant les effets les plus drastiques), et EGFP-EFHC1(I619L) (un des polymorphismes) et nous avons sacrifié les nouveau-nés 5 jours après la naissance (P5). Nous avons ensuite quantifié le nombre de cellules EGFP<sup>+</sup> dans chacune des couches qui forment le cortex (Figure 25). Pour rappel, à la naissance, le néocortex est composé de six couches moléculairement distinctes établies de façon « inside-out » au-dessus de la matière blanche.

Sur la figure 25B, nous observons dans les différentes conditions que la majorité des cellules EGFP<sup>+</sup> ont atteint les couches II-III (EGFP :  $83 \pm 4\%$  ; EGFP-EFHC1 :  $84 \pm 4\%$  ; EGFP-EFHC1(D253Y) :  $90 \pm 3\%$  ; EGFP-EFHC1(I619L) :  $88 \pm 1\%$ ).

Ces résultats montrent que le défaut de migration observé à E17 (Figure 15) n'est que temporaire. Finalement, les neurones électroporés avec la mutation d'EFHC1 atteignent leur destination finale (couches II-III). Les mutations d'EFHC1 induisent donc un retard de migration plutôt qu'un blocage.

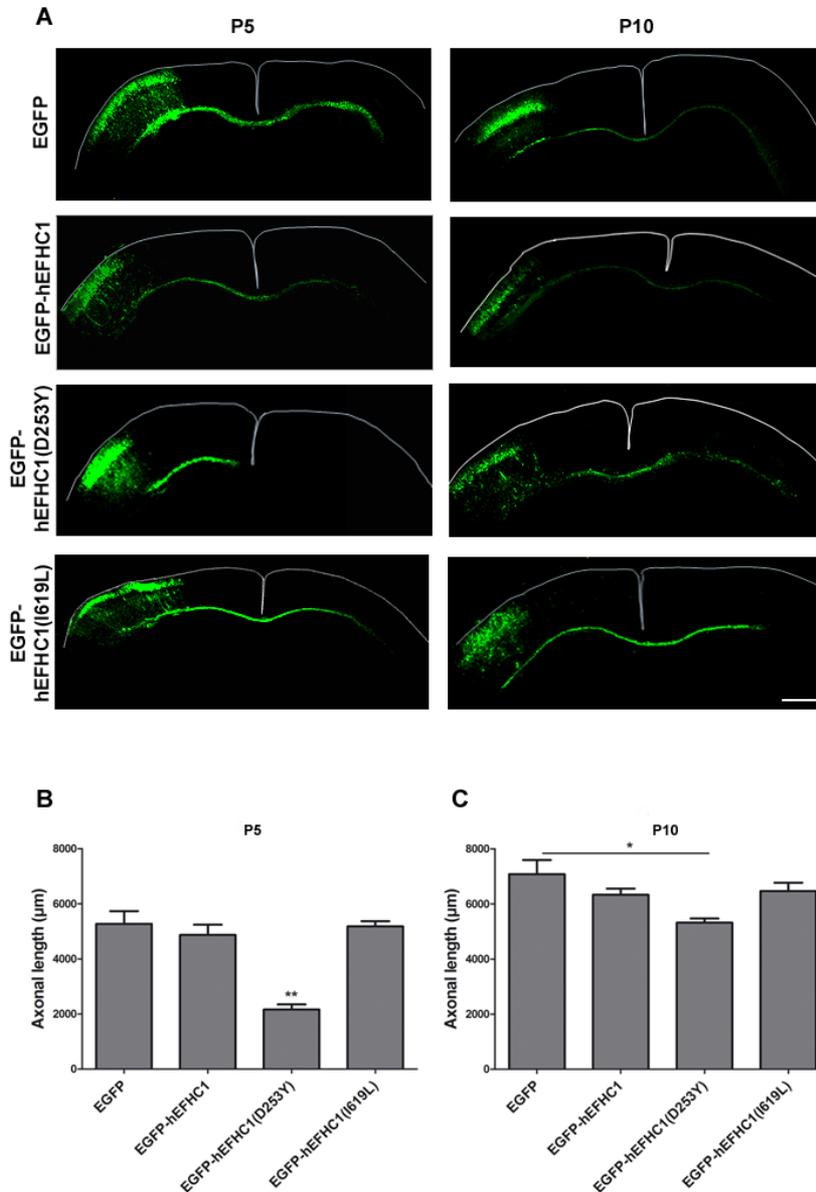


**Figure 25 : Influence de la surexpression des mutations d'EFHC1 sur la migration radiaire des neurones de projections dans le cortex cérébral mesurée à P5.** (A) Distribution des cellules EGFP<sup>+</sup> dans les différentes couches corticales (couches II-III, IV, V, VI) cinq jours après la naissance d'embryons électroporés à E14.5 avec EGFP, EGFP-hEFHC1, EGFP-hEFHC1(D253Y) ou EGFP-hEFHC1(I619L) (vert). (B) Quantification des cellules EGFP<sup>+</sup> dans les différentes régions corticales (couches II-III, IV, V, VI) cinq jours après la naissance. Les barres d'erreur montrent les SEM. La barre d'échelle représente 100µm.

## 2.2. L'axonogenèse est ralentie en présence d'une mutation d'EFHC1

La première étape de la différenciation terminale commence par la mise en place de l'axone. Nous avons étudié l'impact des mutations d'EFHC1 sur la mise en place des axones des neurones de projection. Nous avons quantifié la longueur des axones à deux âges différents (P5 et P10) après électroporation à E14.5 des différentes conditions. Pour ce faire, nous avons mesuré la longueur des axones des projections cortico-corticales à partir du

moment où ils atteignent la couche IV (couche de la matière blanche) jusque leur autre extrémité.



**Figure 26 : La surexpression d’une mutation d’EFHC1 induit un ralentissement de la croissance axonale.** (A) Image représentative des projections axonales cortico-corticales des neurones électroporés. Les embryons à E14.5 ont été électroporés avec l’EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1(D253Y) ou EGFP-EFHC1(I619L) (vert). Les embryons ont été sacrifiés à P5 et P10. Le panneau se rapportant à EGFP-EFHC1(D253Y) montre à P5 une longueur axonale moindre que les autres conditions, alors qu’à P10 le retard de croissance est récupéré. (B) Longueur des projections axonales à P5 (C) Longueur des projections axonales à P10. (3 < n < 7). Les barres d’erreur représentent les SEM. \* P<0.05, \*\*P<0.01. Barre d’échelle: 500 $\mu\text{m}$

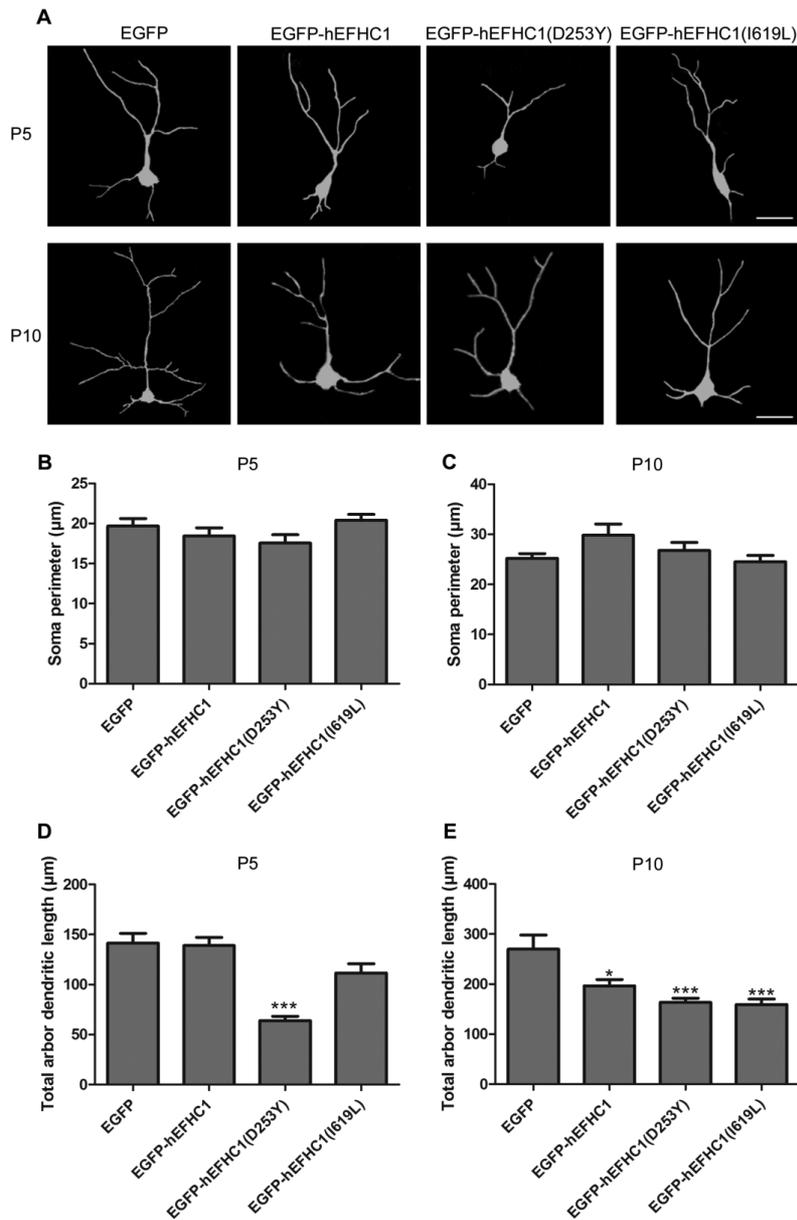
Sur la figure 26A, nous pouvons observer que dans toutes les conditions contrôles, les axones atteignent le second hémisphère en passant par le corps calleux. Par contre, les axones des neurones exprimant la protéine mutée, quant à eux, s'arrêtent dans le premier hémisphère. La quantification des longueurs montre une diminution statistiquement significative de la longueur des axones en présence de la protéine mutée comparée avec la protéine sauvage (EGFP =  $5268 \pm 464 \mu\text{m}$  ; EGFP-EFHC1 =  $4866 \pm 372 \mu\text{m}$  ; EGFP-EFHC1(D253Y) =  $2582 \pm 447 \mu\text{m}$  ; EGFP-EFHC1(I619L) =  $5175 \pm 190 \mu\text{m}$ ) (Figure 26B).

Comme les effets sur la migration n'étaient que transitoires, nous avons voulu vérifier si le défaut d'axonogenèse observé à P5 était également présent à P10. Nous avons donc utilisé la même démarche expérimentale mais nous avons sacrifié les animaux dix jours après la naissance. La quantification de la longueur des axones ne montre plus de différence statistiquement significative entre EGFP-EFHC1(D253Y) et la protéine sauvage (EGFP =  $7078 \pm 516 \mu\text{m}$  ; EGFP-EFHC1 =  $6333 \pm 383 \mu\text{m}$  ; EGFP-EFHC1(D253Y) =  $5319 \pm 149 \mu\text{m}$  ; EGFP-EFHC1(I619L) =  $6463 \pm 307 \mu\text{m}$ ) (Figure 26C). Nous observons néanmoins une différence statistiquement significative entre le mutant et la protéine EGFP seule.

Les résultats obtenus montrent que les mutations d'EFHC1 induisent, non pas un blocage, mais un ralentissement de la croissance axonale.

### **2.3. La dendritogenèse est ralentie en présence d'une mutation d'EFHC1**

Afin d'étudier le rôle d'EFHC1 mutée dans la mise en place de dendrites *in vivo*, les embryons ont été électroporés à E14.5 et l'étude a été réalisée sur des nouveau-nés à P5 et P10. La morphologie des arbres dendritiques des neurones des couches II-III a été reconstituée au moyen du plug-in NeuronJ du logiciel ImageJ à partir d'images obtenues par microscopie confocale (Figure 27A).



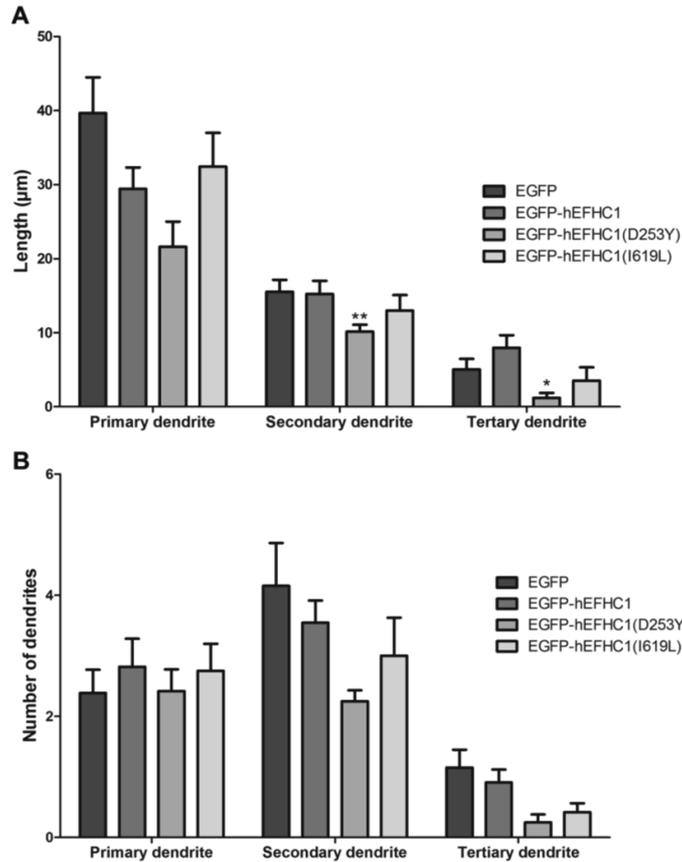
**Figure 27 : La surexpression d'une protéine mutée induit un ralentissement de la dendritogenèse.** (A) Tracé représentatif des neurones d'embryons électroporés à E14.5 avec l'EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1(D253Y) ou EGFP-EFHC1(I619L) et sacrifiés à P5 et P10. Les axones ne sont pas représentés. (B) Quantification de la longueur du périmètre du soma à P5. (C) Quantification de la longueur du périmètre du soma à P10. (D) Quantification de la longueur totale de l'arbre dendritique à P5. (E) Quantification de la longueur totale de l'arbre dendritique à P10 ( $9 < n < 14$ ). Les barres d'erreur représentent les SEM. \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$ . Barre d'échelle : 20 µm.

Nous avons montré que la moyenne du périmètre du soma reste inchangée aussi bien à P5 qu'à P10 (Figures 27B et 27C) alors que la longueur totale de l'arbre dendritique des neurones exprimant la protéine mutée est statistiquement diminuée à P5 comparé au résultat en présence de l'EGFP, de la protéine sauvage ou du polymorphisme (Figure 27D) (EGFP =  $141 \pm 10 \mu\text{m}$  ; EGFP-EFHC1 =  $139 \pm 8 \mu\text{m}$  ; EGFP-EFHC1(D253Y) =  $64 \pm 4 \mu\text{m}$  ; EGFP-EFHC1(I619L) =  $112 \pm 9 \mu\text{m}$ ).

A P10, nous observons dans le cas des neurones exprimant la protéine mutée que la longueur de l'arbre dendritique s'est fortement agrandie et que la complexité de l'arbre, c'est-à-dire le nombre de branchements, a augmenté entre les deux stades étudiés (P5 versus P10) (Figure 27E). La comparaison du mutant avec la protéine sauvage ou le polymorphisme ne montre plus de différence statistiquement significative. Par contre nous observons une différence statistiquement significative de la longueur de l'arbre dendritique des neurones électroporés avec l'EGFP comparé aux trois autres conditions (EGFP =  $267 \pm 28 \mu\text{m}$  ; EGFP-EFHC1 =  $197 \pm 13 \mu\text{m}$  ; EGFP-EFHC1(D253Y) =  $163 \pm 9 \mu\text{m}$  ; EGFP-EFHC1(I619L) =  $159 \pm 11 \mu\text{m}$ ).

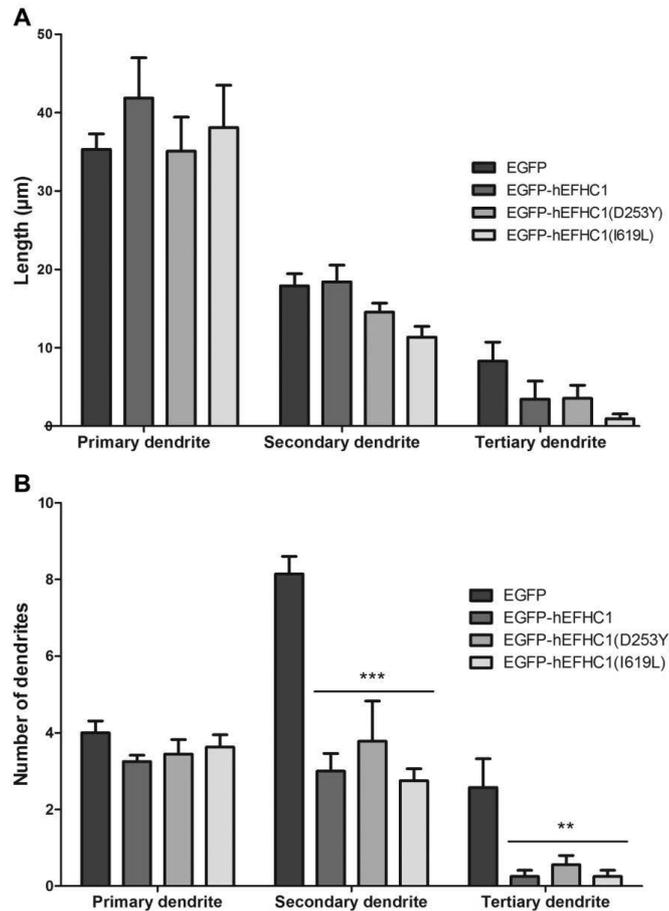
Nous avons voulu déterminer si la différence de longueur de l'arbre dendritique était dû à une diminution de la longueur ou du nombre de dendrites primaires, secondaires ou encore tertiaires. Pour ce faire, nous avons quantifié la longueur et le nombre des différentes dendrites pour chacune des conditions à P5 (Figure 28) et P10 (Figure 29).

A P5, nous observons une diminution de la longueur de tous les sous-types de dendrites en présence de la protéine mutée et celle-ci est statistiquement significative pour les dendrites secondaires (EGFP =  $15.5 \pm 1.6 \mu\text{m}$ , EGFP-hEFHC1 =  $13.0 \pm 1.6 \mu\text{m}$ , EGFP-hEFHC1(D253Y) =  $10 \pm 0.9 \mu\text{m}$ , EGFP-hEFHC1(I619L) =  $14 \pm 1.9 \mu\text{m}$ ) et tertiaires (EGFP =  $5.0 \pm 1.4 \mu\text{m}$ , EGFP-hEFHC1 =  $7.4 \pm 1.6 \mu\text{m}$ , EGFP-hEFHC1(D253Y) =  $1.2 \pm 0.7 \mu\text{m}$ , EGFP-hEFHC1(I619L) =  $3.8 \pm 1.9 \mu\text{m}$ )(Figure 28). Par contre, en présence de la protéine mutée, le nombre de dendrites primaires, secondaires et tertiaires est diminué comparé à l'EGFP ou à la protéine sauvage mais sans différence statistiquement significative. Ces résultats suggèrent que la diminution de la longueur de l'arbre dendritique observée à P5 peut être expliquée par une diminution générale à la fois du nombre et de la longueur des différentes sous-catégories de dendrites.



**Figure 28: Quantification de la longueur et du nombre de dendrites primaires, secondaires et tertiaires des neurones de projections à P5.** Les embryons à E14.5 ont été électroporés avec l'EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1(D253Y) ou EGFP-EFHC1(I619L) et sacrifiés à P5. (A) Longueur des dendrites primaires, secondaires et tertiaires. (B) Nombre de dendrites primaires, secondaires et tertiaires. ( $11 < n < 13$ ), \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

A P10, l'analyse des résultats obtenus montre que le nombre de dendrites secondaires (EGFP =  $8.14 \pm 0.46$ ; EGFP-hEFHC1 =  $3.00 \pm 0.46$ , EGFP-hEFHC1(D253Y) =  $3.78 \pm 1.05$ , EGFP-hEFHC1(I619L) =  $2.75 \pm 0.31$ ) et tertiaires (EGFP =  $2.57 \pm 0.75$ ; EGFP-hEFHC1 =  $0.25 \pm 0.16$ , EGFP-hEFHC1(D253Y) =  $0.56 \pm 0.24$ , EGFP-hEFHC1(I619L) =  $0.25 \pm 0.16$ ) est statistiquement diminué en présence de la protéine EFHC1 sauvage, mutée et polymorphique comparé à l'EGFP (Figure 29). Par contre, il n'y a pas de différence entre la protéine mutée et sauvage.

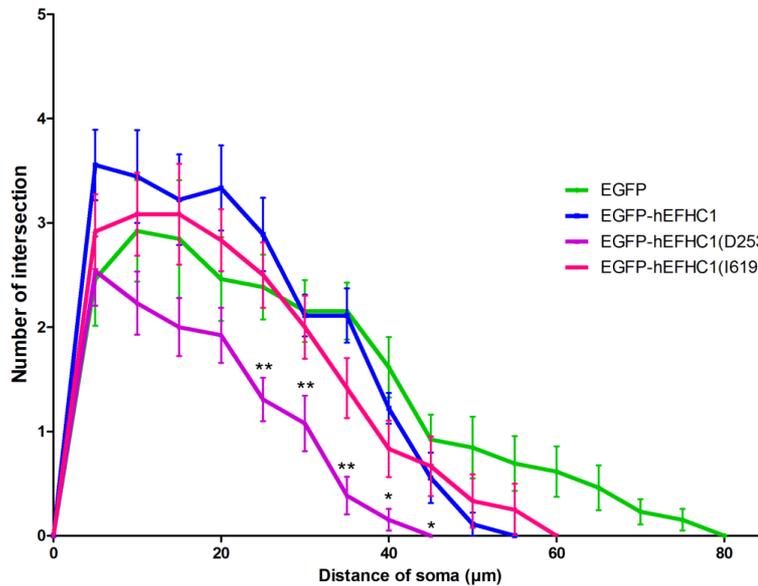


**Figure 29 : Quantification de la longueur et du nombre de dendrites primaires, secondaires et tertiaires des neurones de projections à P10.** Les embryons à E14.5 ont été électroporés avec l'EGFP, EGFP-hEFHC1, EGFP-hEFHC1(D253Y) ou EGFP-hEFHC1(I619L) et sacrifiés à P10. **(A)** Longueur des dendrites primaires, secondaires et tertiaires. **(B)** Nombre de dendrites primaires, secondaires et tertiaires. ( $8 < n < 10$ ) \* $P < 0,05$  ; \*\* $P < 0,01$ .

Nous avons ensuite quantifié la complexité de l'arbre dendritique neuronale à P5 et P10 par la méthode de Sholl qui permet d'évaluer la complexité des projections neuronales. Cette technique consiste à tracer des cercles concentriques de rayon croissant linéairement, dont le centre est le soma. Ensuite, nous calculons le nombre d'intersections des extensions du neurone avec chaque cercle (Gutierrez and Davies, 2007).

Sur la figure 30, nous pouvons observer qu'à P5 le mutant présente une complexité semblable aux autres conditions à proximité du soma puisque le nombre d'intersections se

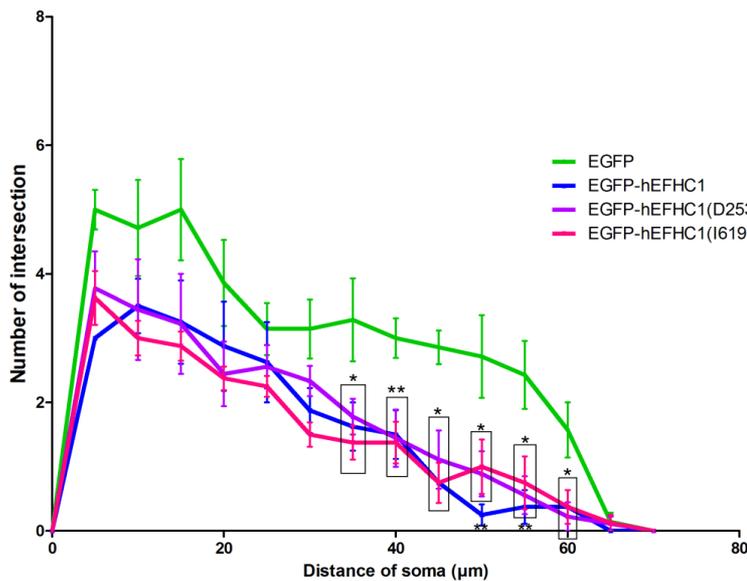
situe autour 2 et 3 pour les différentes conditions. Par contre, à partir de 20 $\mu$ m, la complexité des neurones mutés est fortement diminuée.



**Figure 30 : Analyse de Sholl à P5.** Les embryons à E14.5 ont été électroporés avec l'EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1(D253Y) ou EGFP-EFHC1(I619L) et sacrifiés à P5 ( $9 < n < 13$ ). \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$

Cette analyse de Sholl a également été menée à P10, à cet âge, nous montrons que la complexité dendritique est semblable pour les conditions EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1(D253Y) et EGFP-EFHC1(I619L) aussi bien en position proximale que distale. Cependant, leur complexité se révèle statistiquement diminuée en position distale comparée à la protéine EGFP (Figure 31).

En conclusion, nous avons montré que les neurones exprimant la protéine EFHC1 mutée présentent une complexité moins importante en position distale et une diminution de la longueur de l'arbre dendritique à P5. Par contre, à P10, ces neurones comblent leur retard et présentent une longueur de l'arbre dendritique et une complexité semblable aux autres conditions d'EFHC1. Ces résultats semblent indiquer que les neurones exprimant la protéine mutée ont, dans un premier temps, la capacité d'initier des branchements mais l'extension des dendrites est ralentie en début de processus.



**Figure 31 : Analyse de Sholl à P10.** Les embryons à E14.5 ont été électroporés avec l'EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-hEFHC1(D253Y) ou EGFP-EFHC1(I619L) et sacrifiés à P10 ( $8 < n < 9$ ). \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$

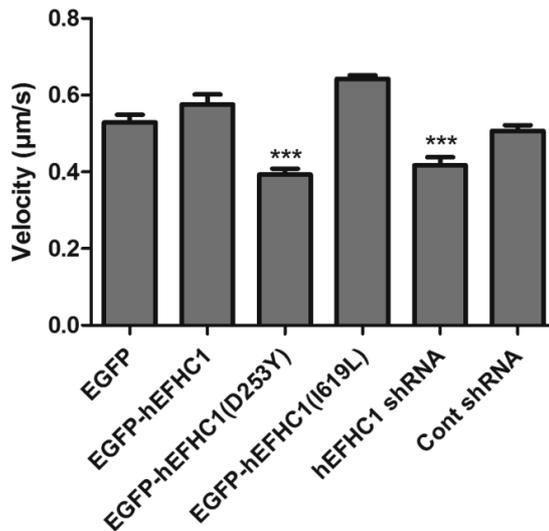
## 2.4. La dynamique des microtubules est altérée lors de la surexpression de la protéine mutée

Vu qu'EFHC1 est une MAP dont nous ne connaissons pas exactement la fonction, nous avons voulu savoir si EFHC1 et ses formes mutées pouvaient moduler la dynamique des microtubules.

Pour ce faire, nous avons co-transfecté des cellules HeLa avec, d'une part, la protéine EB3 couplée à la RFP et, d'autre part, avec une des différentes suivantes : EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1(D253Y), EGFP-EFHC1(I619L), EFHC1 shARN ou encore un contrôle shARN (Cont shARN). Nous avons effectué des vidéos en temps réel afin d'enregistrer le mouvement des protéines EB3-RFP pendant 90 secondes toutes les deux secondes. A partir de ces films, nous avons pu évaluer la vélocité (la vitesse de croissance des microtubules) (Figure 32).

Nous avons montré qu'en présence de la mutation d'EFHC1 et du shARN dirigé contre cette protéine, la vitesse de croissance des microtubules est statistiquement diminuée

comparée à la forme sauvage ou au polymorphisme (EFP =  $0.529 \pm 0.020$  ; EGFP-hEFHC1 =  $0.561 \pm 0.029$ , EGFP-hEFHC1(D253Y) =  $0.393 \pm 0.063$ , EGFP-hEFHC1(I619L) =  $0.644 \pm 0.038$ , hEFHC1 shARN =  $0.417 \pm 0.022$ , Cont shARN =  $0.507 \pm 0.015$ ). Ces résultats montrent qu'EFHC1 agit sur la vélocité des microtubules et que sa perte de fonction induit une diminution de celle-ci.

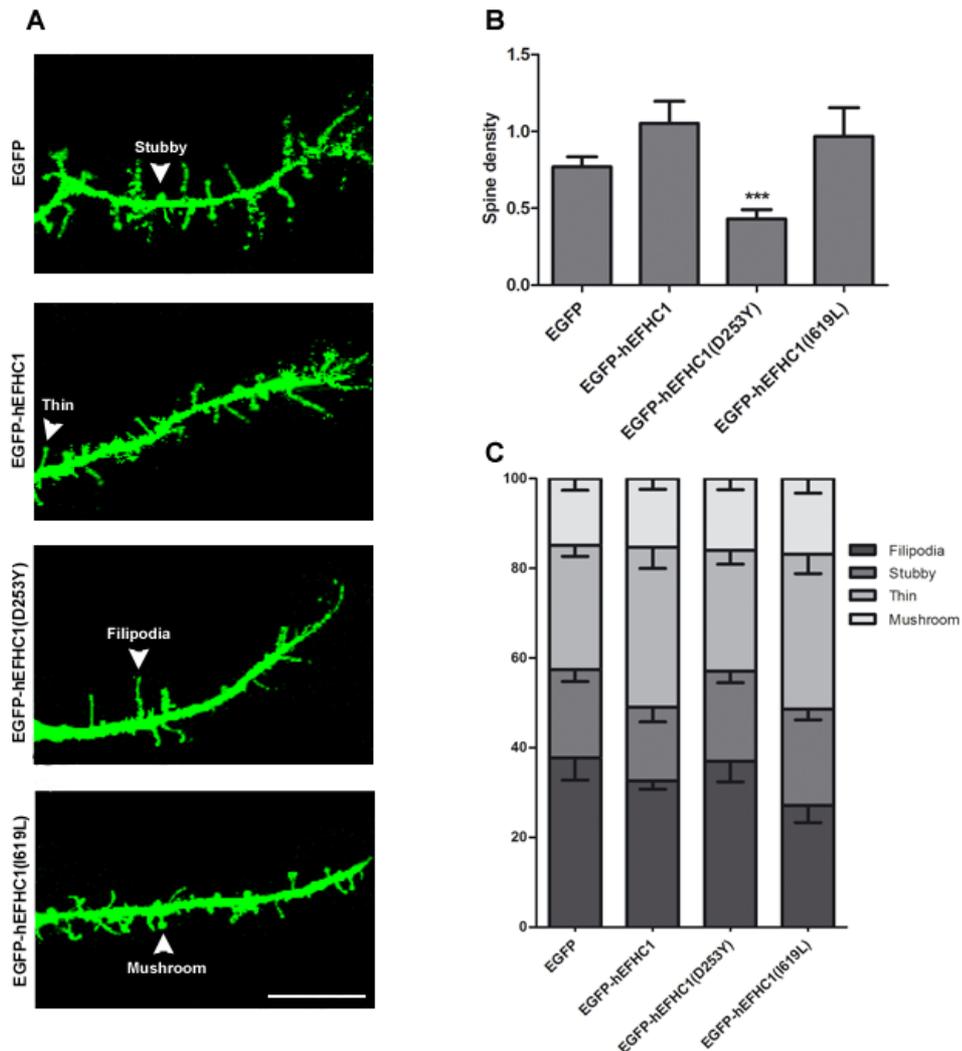


**Figure 32 : EFHC1 intervient dans le taux de croissance des microtubules.** Les cellules HeLa ont été co-transfectées avec EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1(D253Y), EGFP-EFHC1(I619L), hEFHC1 shARN ou Cont shARN et avec EB3-RFP ( $17 < n < 24$ ). Les barres d'erreurs représentent les SEM. \*\*\* $P < 0.001$

## 2.5. Les mutations d'EFHC1 altèrent la densité des épines dendritiques

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons étudié l'effet des mutations d'EFHC1 sur la forme et la morphologie des épines dendritiques. Dans un premier temps, nous avons voulu étudié ce phénomène *in vivo* sur les embryons de souris électroporés à E14.5 avec EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1(D253Y) ou encore EGFP-EFHC1(I619L). Cependant, pour des raisons techniques, cela n'a pas été possible. En effet, l'observation des épines s'effectue aux alentours de P15. Il nous a été impossible de visualiser notre protéine de fusion à ce moment là. Nous avons donc changé de modèle et nous sommes passés à un modèle *in vitro*.

Ainsi, des souris gestantes à E14.5 ont été électroporées avec les différentes conditions. Les cerveaux des embryons à E16.5 ont été disséqués et les neurones du cortex ont été mis en culture pendant 4 jours. Ensuite, nous avons quantifié la densité des épines dendritiques par  $\mu\text{m}$ . Nous les avons également classées selon leur morphologie et nous avons quantifié le pourcentage d'épines se présentant soit sous la forme de filipode, d'épine « thin », « mushroom » ou encore « stubby » (Figure 33).



**Figure 33: La mutation d'EFHC1 induit une diminution de la densité des épines dendritiques.** (A) Images représentatives de la densité des épines dendritiques *in vitro* de neurones corticaux électroporés à E14.5 avec l'EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1(D253Y) ou encore EGFP-EFHC1(I619L) (vert). Les neurones ont été mis en culture à E16.5 et maintenus en culture pendant 4 jours. (B) Quantification de la densité des épines dendritiques. (C) Quantification des types d'épines dendritiques. ( $490 < n_{(\text{épines})} < 597$ ). Barre d'échelle 10  $\mu\text{m}$ . Les barres d'erreur représentent les SEM. \*\*\* $P < 0.001$

Sur la figure 34B, nous pouvons observer que lorsque la protéine mutée est exprimée dans les neurones mis en culture, il y a une diminution statistiquement significative de la densité des épines dendritiques (EFFP =  $0.77 \pm 0.07$  ; EGFP-hEFHC1 =  $1.05 \pm 0.14$ , EGFP-hEFHC1(D253Y) =  $0.43 \pm 0.06$ , EGFP-hEFHC1(I619L) =  $0.97 \pm 0.19$ ). Par contre, la proportion de chacun des types d'épines n'est pas modifiée entre les différentes conditions (Figure 34C).

### 3. Discussion et conclusions préliminaires

Dans le premier chapitre (publication n°1), nous avons constaté qu'à E17 les mutations d'EFHC1 électroporées à E14.5 provoquent une stagnation des neuroblastes dans la zone intermédiaire (Figure 15). Dans l'actuel chapitre, nous démontrons qu'en post-natal (P5 et P10) ce défaut n'est plus présent. Nous en concluons donc que les mutations de la protéine sont susceptibles de ralentir et non de bloquer totalement les processus migratoires embryonnaires. Cela nous a poussé à étudier l'influence des mutations sur les phénomènes de différenciation terminale du cerveau à savoir l'axonogenèse, la dendritogenèse et la formation des épines dendritiques en post-natal.

L'étude de l'axonogenèse montre que les axones des neurones exprimant la protéine mutée sont plus courts à P5 (Figure 26) mais pas à P10, le retard de la longueur axonale est comblé. L'analyse de la mise en place des dendrites révèle une diminution de la longueur et de la complexité de l'arbre dendritique à P5 (Figure 26 et figure 30) mais cette différence est absente à P10 (Figure 26 et figure 31). Ces résultats indiquent clairement un ralentissement dans l'installation de l'axonogenèse et de la dendritogenèse *in vivo*.

En outre, nous avons mis en évidence une diminution de la complexité et de la longueur de l'arbre dendritique à P10 pour les différentes conditions en comparaison avec la protéine EGFP seule (Figure 27 et figure 32). Ce dernier résultat est surprenant puisque tant la protéine sauvage que le polymorphisme se démarquent de l'EGFP et montrent des effets semblables à celui de la protéine mutée. Toutefois, si nous comparons l'augmentation de la longueur axonale et dendritique de ces deux formes entre P5 et P10, nous constatons qu'elle est plus faible que celle mesurée pour l'EGFP. L'explication réside peut-être dans la

technique utilisée qui consiste à surexprimer les différentes protéines au départ d'un plasmide. Or nous observons, et ce dès les premiers jours suivant l'électroporation un niveau d'expression plus faible de toutes les protéines de fusion (sauvage, mutée ou polymorphisme) comparé à l'EGFP. D'autre part, plus on s'éloigne du moment de l'électroporation plus la quantité de plasmide par cellule diminue, ce qui affecte le niveau d'expression des protéines. Dans ces conditions, les protéines de fusion se trouveraient plus « diluées » dans la cellule et seraient dès lors moins facilement détectables plus on s'éloigne du soma. Mais ceci est purement spéculatif. .

Il est interpellant de noter que l'effet des formes mutées d'EFHC1 sur la migration, l'axonogenèse et la dendritogenèse, est à chaque fois marqué au début du processus mais qu'il tend à être comblé assez rapidement avec le temps. Comment expliquer cette correction? Nous pourrions évoquer l'existence de processus adaptatifs se mettant en place pour compenser ces déficits. La nature exacte de ceux-ci reste à déterminer mais l'expression, voire la surexpression d'un paralogue tel que EFHC2 pourrait être un moyen pour palier l'absence d'EFHC1. En dehors des ces processus adaptatifs, les retards d'axonogenèse et de dendritogenèse observés à P5 pourraient simplement découler du fait que les neurones électroporés arrivent avec un délai à leur destination finale. Dès lors, le délai nécessaire pour mettre en place l'axone et les dendrites découlerait simplement du retard observé dans les étapes plus précoces du développement. Afin de vérifier cette dernière hypothèse, il serait intéressant d'utiliser un plasmide dans lequel le gène *EFHC1* serait sous la dépendance d'un promoteur activé plus tardivement. Cette technique permettrait de voir si l'expression plus tardive des mutations d'EFHC1 dans les neurones ayant déjà atteints leur destination engendre également des problèmes dans la mise en place des axones et des dendrites.

Nous avons également étudié les épines dendritiques *in vitro* et nous avons montré, qu'en présence de la protéine EFHC1 mutée, la densité des épines dendritiques diminue (Figure 33).

L'ensemble des effets rapportés dans ce chapitre rappellent ceux obtenus chez la drosophile par Rossetto et ses collaborateurs (Rossetto et al., 2011). En effet en l'absence de *Defhc1.1*, homologue d'EFHC1, ils observent une augmentation du nombre de terminaisons dendritiques ainsi qu'une augmentation du nombre de boutons synaptiques au niveau de la jonction neuromusculaire. D'autre part, ils ont également montré que la surexpression de *Defhc1.1* induit une altération de la longueur de l'arbre dendritique et de sa complexité. Ils

suggèrent dès lors que *Defhc1.1* agirait comme un inhibiteur de la morphologie de l'arbre dendritique.

Par ailleurs, le dénominateur commun des processus de division, de migration, d'axonogenèse, de dendritogenèse et d'épines dendritiques est qu'ils impliquent tous les microtubules. Le remodelage et la réorganisation de ceux-ci s'avèrent important dans la formation du fuseau mitotique, la migration radiaire, l'avancement du cône de croissance et également dans l'élargissement des épines suite à une activité synaptique. Le ralentissement de tous ces phénomènes pourrait s'expliquer par une altération des paramètres dynamiques des microtubules. Nous avons d'ailleurs montré que la protéine mutée d'EFHC1 induit un ralentissement de la dynamique des microtubules (Figure 32). Par exemple, en présence de la protéine mutée, la proportion de catastrophe ou de sauvetage pourrait être augmentée ou encore le temps de pause pourrait être accru. Ces phénomènes pourraient expliquer le défaut de formation des épines dendritiques mais aussi pourquoi la migration radiaire, l'axonogenèse et la dendritogenèse sont ralenties.

Des anomalies semblables à celles obtenues avec la protéine EFHC1 mutée ont été découvertes avec d'autres MAPs. En effet, la protéine LIS1 induit la lissencéphalie, qui est une maladie du développement cérébral humain, caractérisée par une absence presque complète de gyri, par des ventricules élargis, par une altération de la lamination du cortex et par la présence d'hétérotopie neuronale. Elle joue un rôle important dans toutes les fonctions cellulaires reliées aux microtubules telles que la migration, l'orientation du fuseau mitotique, la capture des chromosomes... (Faulkner et al., 2000; Tanaka et al., 2004; Tsai et al., 2005). Ainsi, une étude a montré que dans des cerveaux de rats électroporés avec un shARN dirigé contre la protéine LIS1, la croissance axonale est modifiée. En effet, les axones sont plus courts, plus incurvés et plus branchés que dans la condition contrôle. Néanmoins, l'orientation de ceux-ci n'est pas altérée mais le taux d'extension est considérablement ralenti (Tsai et al., 2005). De plus, des cultures primaires de neurones pyramidaux d'hippocampe de souris hétérozygotes pour le gène *LISI* (*LIS1*<sup>+/-</sup>) montrent un retard de croissance des dendrites avec un arbre dendritique moins élaboré (Fleck et al., 2000). Enfin, l'utilisation de shARN dirigés contre la dynéine et LIS1 induit une forte inhibition du remodelage du cône de croissance et de la croissance neuritique dans les neurones de poussin. Ces chercheurs justifient ces perturbations par un déficit de réorganisation des microtubules. Cet effet, ils ne l'attribuent

pas à une altération de l'assemblage ou du transport mais plutôt à une instabilité des microtubules (Grabham et al., 2007). Finalement, la protéine DCX, une autre MAP impliquée dans la lissencéphalie, jouerait un rôle dans la formation des axones puisque la délétion de ce gène chez la souris induit une augmentation du nombre de branchements axonaux (Kappeler et al., 2006; Koizumi et al., 2006).

Tous les phénotypes observés en présence de la forme mutée d'EFHC1 ressemblent à ceux observés lors de l'invalidation ou des mutations de certaines MAPs. Par conséquent, EFHC1 pourrait être impliqué dans les mêmes voies cellulaires que ces protéines et donc jouer un rôle dans la migration, la division et la différenciation terminale. Il serait dès lors intéressant d'essayer de déterminer plus précisément quel est le rôle joué par EFHC1, quel(s) est (sont) son (ses) partenaire(s).



## **Conclusion générale et perspectives**



Les épilepsies représentent une pathologie neurologique très répandue dans le monde et constituent, dans beaucoup de pays, des problèmes médico-sociaux importants. L'ILAE encourage la recherche de mécanismes physiopathologiques dont la compréhension devrait faciliter les traitements des divers syndromes épileptiques (Tableau 1, page 4). Parmi ceux-ci, les épilepsies génétiques, partielles ou généralisées, représentent un groupe numériquement important d'affections souvent bénignes, ou de bon pronostic et déterminées par des mutations de gènes dont l'identification récente fait l'objet de nombreux travaux. Les premiers résultats de ceux-ci ont suscité un certain enthousiasme dans la mesure où les gènes identifiés appartenaient à la classe de protéines membranaires associées à des canaux ioniques (récepteur nicotinique à l'acétylcholine, sous-unité du récepteur GABA<sub>A</sub> dans les familles avec ADFLNE ou de GEFS+ (Claes et al., 2003; Dibbens et al., 2004)). Qu'une épilepsie soit le fait d'une « canalopathie » apparaissait aller de soi. Cette notion s'est d'ailleurs vue renforcée depuis la découverte des mutations du canal sodique voltage dépendant associées au syndrome de Dravet (Claes et al., 2003).

Dans le cadre du consortium international dans lequel notre laboratoire s'est inscrit depuis plusieurs années, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'épilepsie myoclonique juvénile dont les caractéristiques syndromiques ont été rappelées (Introduction, page 8). Rappelons simplement que ce syndrome juvénile reste une affection souvent bénigne dont les investigations en imagerie médicale conventionnelle restent le plus souvent négatives. Cependant, des études récentes utilisant des modifications de certains paramètres des techniques d'imagerie classique, ont montré diverses anomalies structurales incluant une augmentation de la matière grise dans le lobe frontal et également une atrophie de l'hippocampe, du thalamus, du corps calleux (Betting et al., 2006; Kim et al., 2007; Tae et al., 2006; Woermann et al., 1999).

Grâce à un travail clinique intense et de longue haleine, de nombreuses familles ont pu être étudiées dans de nombreux pays différents du globe. Ceci a permis aux études classiques de liaisons génétiques, progressivement renforcées par des technologies de biologie moléculaire nouvelles, d'identifier des loci et des gènes significativement co-ségrégés avec le phénotype particulier de l'EMJ. A ce jour, plusieurs gènes ont été mis en évidence.

Comme nous l'avons signalé (Introduction, page 13), le gène *EFHC1* ou *Myoclonine 1*, a été le premier publié (Suzuki et al., 2004) et l'étude de ses propriétés a été l'objet du

travail de notre laboratoire depuis dix ans. Nous avons aussi indiqué qu'il s'agit du gène « épileptique » dont la fréquence de mutation est la plus élevée parmi l'ensemble des autres gènes syndromiques connus à ce jour. D'emblée, la séquence de ce nouveau gène (Figure 1, page 14) indiquait qu'il ne codait pas d'un canal ionique. Des travaux princeps avaient suggéré qu'EFHC1 agirait comme senseur calcique et aurait un effet pro-apoptotique (Suzuki et al., 2004). Ensuite, il a été montré que cette protéine était fortement exprimée dans les flagelles et les cils motiles, suggérant que la JME pourrait résulter d'un dysfonctionnement des cils et donc correspondre à une « ciliopathie » (Ikeda et al., 2005).

Les premiers travaux de notre laboratoire ont montré qu'EFHC1 est une protéine associée aux microtubules (MAP) qui intervient dans la régulation de la division cellulaire ainsi que dans la migration radiaire durant le développement cortical. En effet, dans une cellule en interphase, la protéine EFHC1 se localise dans le cytoplasme, le noyau, à l'exception des nucléoles, et au niveau du centrosome. Dans une cellule en division, elle se concentre au niveau des pôles du fuseau mitotique et du corps intermédiaire lors de la cytokinèse. Des études complémentaires ont démontré que cette association s'effectue via les 45 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale. A l'aide de shARN dirigé contre EFHC1, nous avons confirmé que cette protéine joue un rôle dans la division cellulaire. En effet, la diminution d'expression d'EFHC1 induit une augmentation du nombre de fuseaux mitotiques anormaux. Par ailleurs, des travaux menés *in vivo* sur des cerveaux d'embryons de rat, ont mis en évidence un défaut de migration neuronale radiaire au cours du développement du cortex cérébral. Nous avons montré qu'il résultait d'une diminution de sortie de cycle cellulaire des cellules progénitrices neuronales conduisant à une accumulation de celles-ci, d'une altération de l'architecture des prolongements de la glie radiaire, d'une augmentation de la mort cellulaire par apoptose et d'un défaut de locomotion des neurones post-mitotiques (de Nijs et al., 2006; de Nijs et al., 2009)

Face à ces premiers résultats fondamentaux, les travaux utilisant cette fois les mutations d'EFHC1 retrouvées dans les familles des patients souffrant de JME devenaient incontournables. C'est ce qui a fait l'objet de notre thèse. Nous nous sommes intéressés à l'effet de quatre mutations faux-sens d'EFHC1 sur les propriétés fonctionnelles ainsi établies de la protéine. Nous avons montré que, tout comme la protéine sauvage, ces formes mutées s'associent au centrosome, au fuseau mitotique et au corps intermédiaire lors de la cytokinèse (Figures 11-12-13). Par ailleurs, nous avons confirmé que les mutations perturbent la division

cellulaire, la migration radiaire et tangentielle, ainsi que la différenciation terminale dans le cortex cérébral en développement. En effet, les mutations d'EFHC1 augmentent le nombre de fuseaux mitotiques anormaux (fuseau unipolaire, anomalie de congression) dans des cellules HEK293 en culture (Figure 14). De plus, par électroporation *in utero*, nous avons montré que les formes mutées de cette protéine induisent une altération de la migration tangentielle et radiaire associée dans les deux cas à des défauts de longueur des processus antérieurs des cellules en migration (Figures 15-19). Nous avons également observé une anomalie au niveau de la glie radiaire et de la transition cellules « multipolaire-bipolaire » dans la zone intermédiaire (Figure 18). Ces premiers résultats ont fait l'objet d'une première publication significative (de Nijs et al., 2012).

Afin de savoir quel est l'impact des ces anomalies à plus long terme, nous avons abordé les mêmes recherches mais à des stades ultérieurs de développement. Nous avons montré que le défaut de migration radiaire observé à E17 correspondait à un retard de migration puisqu'à P5 les neurones ont atteint leur destination finale (Figure 25). Durant la différenciation terminale, nous avons également observé un ralentissement de la mise en place des axones et des dendrites (Figures 26-27). En effet, à P5, la longueur de l'axone, de l'arbre dendritique et de sa complexité est amoindrie en présence d'EFHC1 muté (Figures 26-27-30). Mais à P10, aucune différence statistiquement significative ne persiste (Figures 26-27-31). Enfin, à l'aide de modèles *in vitro*, nous avons observé que la dynamique des microtubules (Figure 32) et la densité des épines dendritiques (Figure 33) sont diminuées en présence de la protéine EFHC1 mutée.

Tous les résultats obtenus dans ce travail montrent que les mutations d'EFHC1 associées à l'EMJ induisent une perte de fonction modérée des propriétés d'EFHC1, conduisant à des troubles transitoires au niveau de la migration et de la différenciation terminale au cours du développement du cortex cérébral. Ils nous permettent également de conforter l'idée qu'EFHC1 interviendrait dans le contrôle de la division cellulaire et du développement du cortex en affectant différentes étapes de la corticogenèse. Ainsi donc, nos premiers travaux complétés par les données de la thèse actuelle, permettent d'avancer l'idée qu'EFHC1 joue un rôle dans le contrôle de différents mécanismes en rapport avec la corticogenèse cérébrale. Les mécanismes biologiques par lesquels EFHC1 peut réguler ces différents aspects du développement cérébral sont actuellement à l'étude dans le laboratoire. Une protéine du centrosome, associée aux microtubules, modulant la dynamique de ceux-ci et

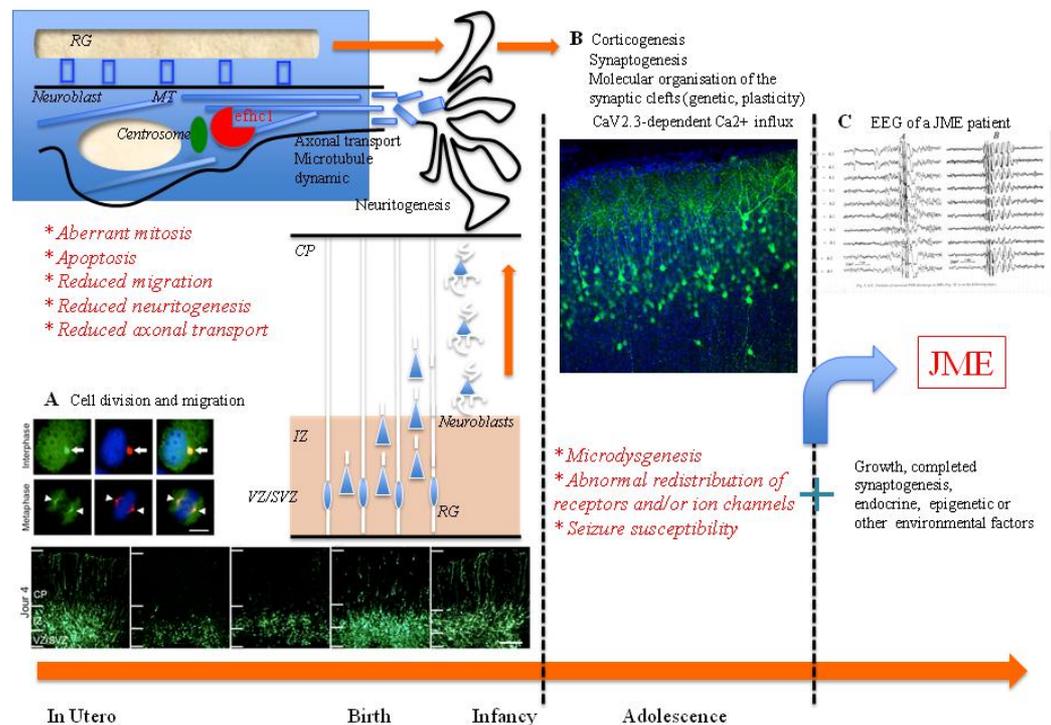
la vitesse de la migration et la neuritogenèse est évidemment suspecte de contribuer à l'architecture cellulaire et de participer au transport axonal et/ou à la redistribution du patron protéique du mur présynaptique.

L'altération modérée et transitoire de migration obtenue en présence des mutations pourrait se répercuter moins drastiquement sur l'architecture cérébrale à l'âge adulte, conduisant à la mise en place d'anomalies subtiles cortical et sous-corticales. Ceci semble en accord avec les données obtenues par les techniques d'imagerie cérébrale et les analyses post-mortem (Meencke and Janz, 1984) mettant en évidence la présence d'anomalies structurales du lobe frontal et de microdysgénésies chez des patients souffrant d'EMJ. Plusieurs études ont démontré qu'il existe un lien entre le mauvais positionnement des neurones et l'épileptogenèse (Kriegstein and Noctor, 2004; LoTurco and Bai, 2006; Marsh et al., 2009). Cela suggère que l'EMJ pourrait être un désordre neurodéveloppemental qui pourrait résulter de défauts dans l'intégration neuronal.

D'autre part, les défauts d'axonogenèse, de dendritogenèse ou de formation d'épine dendritique pourraient induire des anomalies de connectivité et de mise en place des réseaux neuronaux. Les problèmes de connectivité et de mise en place des réseaux neuronaux sont restés relativement peu étudiés jusqu'à ces dernières années. Néanmoins, ils semblent contribuer à diverses pathologies comme l'addiction, l'anxiété ou encore la dépression par exemple. Ainsi, des études s'intéressant au transporteur de la dopamine (DAT) ou de la sérotonine (SERT) ont montré des différences de connectivité dans le cerveau de souris KO pour leur gène respectif (Bearer et al., 2009; Zhang et al., 2010). A ce jour, les rares études menées chez la patients atteints d'EMJ ont détecté soit des anomalies au niveau de la circuiterie thalamo-corticale (Deppe et al., 2008), soit une diminution de la connectivité de l'aire motrice supplémentaire (Vulliemoz et al., 2011) ou encore une augmentation de la connectivité entre certaines aires cognitives et le cortex moteur (Vollmar et al., 2011). Ces types d'altérations se mettant en place progressivement au cours de la maturation cérébrale, ils sont dès lors susceptibles de produire leurs effets plus tardivement dans la vie et pourraient donc mieux correspondre à l'âge d'apparition des premières crises chez les patients souffrant d'EMJ. A l'instar de modèles actuellement proposés en neurosciences cognitives (Dehaene, Changeux), nous pouvons voir comment une modification synaptique subtile pourrait déboucher sur des modifications significatives de signaux bioélectriques à l'échelle du cortex cérébral dans son entièreté empruntant les voies sous-corticales et, en particulier, les boucles

thalamo-corticales, si sollicitées au cours de la production des décharges de pointes-ondes généralisées caractéristiques de ces épilepsies généralisées, dont la JME (Blumenfeld, 2005).

En conclusion, nos travaux suggèrent que l'EMJ pourrait bien être plus une anomalie subtile de développement cortical qu'une « simple canalopathie ». Nous émettons l'hypothèse que les mutations d'EFHC1 (Figure 34) pourraient conduire à des microdysgénésies, à un remodelage synaptique cortical différent et/ou à des modifications subtiles de connectivité suffisantes pour créer, à l'adolescence, un état d'hypersynchronie électrique propice au développement d'un certain degré d'hyperexcitabilité responsable du développement de l'EMJ.



**Figure 34 : Modèle hypothétique du mécanisme de l'EMJ en présence du gène *EFHC1* (ou *Myoclonine 1*) muté.** Durant le développement cortical, la présence de la protéine EFHC1 mutée dans les neurones affecterait la dynamique des microtubules. L'altération de ce processus induirait des anomalies de mitoses, ralentirait la migration, la neurogenèse et le transport axonal. Ces altérations pourraient être responsables des microdysgénésies observées, de problème de réseaux neuronaux ou encore d'une distribution anormale des récepteurs et/ou des canaux ioniques, qui eux-mêmes, à l'adolescence seraient responsable de l'hyperexcitabilité neuronale constatée chez les patients atteints d'EMJ.

A ce stade, toutefois, la persistance après électroporation de formes mutées d'EFHC1, de lésions synaptiques significantes à l'âge adulte doit encore être démontrée ainsi d'ailleurs

que leur caractère épiléptogène éventuel. C'est ce que nos travaux ultérieurs tenteront de démontrer.

Dans la continuité de ce travail, il serait intéressant de poursuivre l'identification précise des mécanismes moléculaires et cellulaires des épilepsies génétiques généralisées, incluant peut être la mise en évidence de microdysgénésies corticales. De plus, il s'avérerait également pertinent de s'attaquer à la synaptogenèse afin de voir si les neurones exprimant la protéine mutée présentent des caractéristiques électrophysiologiques épiléptogènes. Nous pourrions également nous focaliser sur le transport axonale afin de voir si celui-ci est altéré ou non à l'aide de vidéos en temps réel par exemple. Finalement, la recherche de(s) partenaire(s) potentiel(s) d'EFHC1 pourrait nous aider à mieux comprendre sa fonction.

Nous espérons que toutes ces recherches permettront d'avancer dans la compréhension des fonctions d'EFHC1 dans ces différents processus qui mettent en jeu les microtubules et le centrosome.

# **Bibliographie**



## A

- Akhmanova, A.**, and Steinmetz, M.O. (2008). Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 309-322.
- Akhmanova, A.**, and Steinmetz, M.O. (2010). Microtubule +TIPs at a glance. *J Cell Sci* 123, 3415-3419.
- Alfradique, I.**, and Vasconcelos, M.M. (2007). Juvenile myoclonic epilepsy. *Arq Neuropsiquiatr* 65, 1266-1271.
- Anderson, S.A.**, Marin, O., Horn, C., Jennings, K., and Rubenstein, J.L. (2001). Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* 128, 353-363.
- Ang, E.S., Jr.**, Haydar, T.F., Gluncic, V., and Rakic, P. (2003). Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex. *J Neurosci* 23, 5805-5815.
- Angevine, J.B., Jr.**, and Sidman, R.L. (1961). Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* 192, 766-768.
- Annesi, F.**, Gambardella, A., Michelucci, R., Bianchi, A., Marini, C., Canevini, M.P., Capovilla, G., Elia, M., Buti, D., Chifari, R., *et al.* (2007). Mutational analysis of EFHC1 gene in Italian families with juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsia* 48, 1686-1690.
- Arimura, N.**, and Kaibuchi, K. (2007). Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8, 194-205.
- Ayala, R.**, Shu, T., and Tsai, L.H. (2007). Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell* 128, 29-43.

## B

- Baas, P.W.** (1996). The neuronal centrosome as a generator of microtubules for the axon. *Curr Top Dev Biol* 33, 281-298.
- Baas, P.W.** (1999). Microtubules and neuronal polarity: lessons from mitosis. *Neuron* 22, 23-31.
- Baek, S.T.**, Kerjan, G., Bielas, S.L., Lee, J.E., Fenstermaker, A.G., Novarino, G., and Gleeson, J.G. (2014). Off-Target Effect of doublecortin Family shRNA on Neuronal Migration Associated with Endogenous MicroRNA Dysregulation. *Neuron* 82, 1255-1262.
- Baise-Zung, C.**, Guilhoto, L.M., and Grossmann, R.M. (2006). Juvenile myoclonic epilepsy: non-classic electroencephalographical presentation in adult patients. *Eur J Neurol* 13, 171-175.
- Barnes, A.P.**, and Polleux, F. (2009). Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annu Rev Neurosci* 32, 347-381.
- Basto, R.**, Lau, J., Vinogradova, T., Gardiol, A., Woods, C.G., Khodjakov, A., and Raff, J.W. (2006). Flies without centrioles. *Cell* 125, 1375-1386.
- Bearer, E.L.**, Zhang, X., Janvelyan, D., Boulat, B., and Jacobs, R.E. (2009). Reward circuitry is perturbed in the absence of the serotonin transporter. *Neuroimage* 46, 1091-1104.
- Bell, G.S.**, and Sander, J.W. (2001). The epidemiology of epilepsy: the size of the problem. *Seizure* 10, 306-314; quiz 315-306.
- Belmont, L.D.**, Hyman, A.A., Sawin, K.E., and Mitchison, T.J. (1990). Real-time visualization of cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in cytoplasmic extracts. *Cell* 62, 579-589.
- Berg, A.T.**, Berkovic, S.F., Brodie, M.J., Buchhalter, J., Cross, J.H., van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T.A., Mathern, G.W., *et al.* (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 51, 676-685.

- Betting, L.E.**, Mory, S.B., Li, L.M., Lopes-Cendes, I., Guerreiro, M.M., Guerreiro, C.A., and Cendes, F. (2006). Voxel-based morphometry in patients with idiopathic generalized epilepsies. *Neuroimage* 32, 498-502.
- Blumenfeld, H.** (2005). Cellular and network mechanisms of spike-wave seizures. *Epilepsia* 46 Suppl 9, 21-33.
- Bonhoeffer, T.**, and Yuste, R. (2002). Spine motility. Phenomenology, mechanisms, and function. *Neuron* 35, 1019-1027.
- Bradke, F.**, and Dotti, C.G. (1997). Neuronal polarity: vectorial cytoplasmic flow precedes axon formation. *Neuron* 19, 1175-1186.
- Breuss, M.**, and Keays, D.A. (2014). Microtubules and neurodevelopmental disease: the movers and the makers. *Adv Exp Med Biol* 800, 75-96.

## C

- Cassimeris, L.**, Inoue, S., and Salmon, E.D. (1988). Microtubule dynamics in the chromosomal spindle fiber: analysis by fluorescence and high-resolution polarization microscopy. *Cell Motil Cytoskeleton* 10, 185-196.
- Cates, M.S.**, Teodoro, M.L., and Phillips, G.N., Jr. (2002). Molecular mechanisms of calcium and magnesium binding to parvalbumin. *Biophys J* 82, 1133-1146.
- Cheeseman, I.M.**, and Desai, A. (2008). Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 33-46.
- Ciumas, C.**, Wahlin, T.B., Jucaite, A., Lindstrom, P., Halldin, C., and Savic, I. (2008). Reduced dopamine transporter binding in patients with juvenile myoclonic epilepsy. *Neurology* 71, 788-794.
- Claes, L.**, Ceulemans, B., Audenaert, D., Smets, K., Lofgren, A., Del-Favero, J., Ala-Mello, S., Basel-Vanagaite, L., Plecko, B., Raskin, S., *et al.* (2003). De novo SCN1A mutations are a major cause of severe myoclonic epilepsy of infancy. *Hum Mutat* 21, 615-621.
- Conde, C.**, and Caceres, A. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci* 10, 319-332.
- Conte, F.F.**, Ribeiro, P.A., Marchesini, R.B., Pascoal, V.D., Silva, J.M., Oliveira, A.R., Gilioli, R., Sbragia, L., Bittencourt, J.C., and Lopes-Cendes, I. (2009). Expression profile and distribution of *Efhc1* gene transcript during rodent brain development. *J Mol Neurosci* 39, 69-77.
- Coss, R.G.**, and Perkel, D.H. (1985). The function of dendritic spines: a review of theoretical issues. *Behav Neural Biol* 44, 151-185.
- Cossette, P.**, Liu, L., Brisebois, K., Dong, H., Lortie, A., Vanasse, M., Saint-Hilaire, J.M., Carmant, L., Verner, A., Lu, W.Y., *et al.* (2002). Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet* 31, 184-189.

## D

- Dailey, M.E.**, and Smith, S.J. (1996). The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci* 16, 2983-2994.
- de Anda, F.C.**, Pollarolo, G., Da Silva, J.S., Camoletto, P.G., Feiguin, F., and Dotti, C.G. (2005). Centrosome localization determines neuronal polarity. *Nature* 436, 704-708.
- de Nijs, L.**, Lakaye, B., Coumans, B., Leon, C., Ikeda, T., Delgado-Escueta, A.V., Grisar, T., and Chanas, G. (2006). EFHC1, a protein mutated in juvenile myoclonic epilepsy, associates with the mitotic spindle through its N-terminus. *Exp Cell Res* 312, 2872-2879.
- de Nijs, L.**, Leon, C., Nguyen, L., Loturco, J.J., Delgado-Escueta, A.V., Grisar, T., and Lakaye, B. (2009). EFHC1 interacts with microtubules to regulate cell division and cortical development. *Nat Neurosci* 12, 1266-1274.

- de Nijs, L.**, Wolkoff, N., Coumans, B., Delgado-Escueta, A.V., Grisar, T., and Lakaye, B. (2012). Mutations of EFHC1, linked to juvenile myoclonic epilepsy, disrupt radial and tangential migrations during brain development. *Hum Mol Genet* *21*, 5106-5117.
- De Roo, M.**, Klausner, P., Mendez, P., Pogliana, L., and Muller, D. (2008). Activity-dependent PSD formation and stabilization of newly formed spines in hippocampal slice cultures. *Cereb Cortex* *18*, 151-161.
- Delgado-Escueta, A.V.** (2007). Advances in genetics of juvenile myoclonic epilepsies. *Epilepsy Curr* *7*, 61-67.
- Delgado-Escueta, A.V.**, Koeleman, B.P., Bailey, J.N., Medina, M.T., and Duron, R.M. (2013). The quest for juvenile myoclonic epilepsy genes. *Epilepsy Behav* *28 Suppl 1*, S52-57.
- Deppe, M.**, Kellinghaus, C., Duning, T., Moddel, G., Mohammadi, S., Deppe, K., Schiffbauer, H., Kugel, H., Keller, S.S., Ringelstein, E.B., *et al.* (2008). Nerve fiber impairment of anterior thalamocortical circuitry in juvenile myoclonic epilepsy. *Neurology* *71*, 1981-1985.
- Desai, A.**, and Mitchison, T.J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* *13*, 83-117.
- Dibbens, L.M.**, Feng, H.J., Richards, M.C., Harkin, L.A., Hodgson, B.L., Scott, D., Jenkins, M., Petrou, S., Sutherland, G.R., Scheffer, I.E., *et al.* (2004). GABRD encoding a protein for extra- or peri-synaptic GABAA receptors is a susceptibility locus for generalized epilepsies. *Hum Mol Genet* *13*, 1315-1319.
- Dunaevsky, A.**, Tashiro, A., Majewska, A., Mason, C., and Yuste, R. (1999). Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 13438-13443.

## E

- Efimov, A.**, Kharitonov, A., Efimova, N., Loncarek, J., Miller, P.M., Andreyeva, N., Gleeson, P., Galjart, N., Maia, A.R., McLeod, I.X., *et al.* (2007). Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. *Dev Cell* *12*, 917-930.
- Ems-McClung, S.C.**, and Walczak, C.E. (2010). Kinesin-13s in mitosis: Key players in the spatial and temporal organization of spindle microtubules. *Semin Cell Dev Biol* *21*, 276-282.
- Escayg, A.**, De Waard, M., Lee, D.D., Bichet, D., Wolf, P., Mayer, T., Johnston, J., Baloh, R., Sander, T., and Meisler, M.H. (2000). Coding and noncoding variation of the human calcium-channel beta4-subunit gene CACNB4 in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia. *Am J Hum Genet* *66*, 1531-1539.
- Evans, L.**, Mitchison, T., and Kirschner, M. (1985). Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. *J Cell Biol* *100*, 1185-1191.

## F

- Farah, C.A.**, and Leclerc, N. (2008). HMWMAP2: new perspectives on a pathway to dendritic identity. *Cell Motil Cytoskeleton* *65*, 515-527.
- Faulkner, N.E.**, Dujardin, D.L., Tai, C.Y., Vaughan, K.T., O'Connell, C.B., Wang, Y., and Vallee, R.B. (2000). A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nat Cell Biol* *2*, 784-791.
- 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.
- Fleck, M.W.**, Hirotsune, S., Gambello, M.J., Phillips-Tansey, E., Soares, G., Mervis, R.F., Wynshaw-Boris, A., and McBain, C.J. (2000). Hippocampal abnormalities and enhanced excitability in a murine model of human lissencephaly. *J Neurosci* *20*, 2439-2450.
- Franco, S.J.**, and Muller, U. (2013). Shaping our minds: stem and progenitor cell diversity in the mammalian neocortex. *Neuron* *77*, 19-34.

**Friocourt, G.**, Koulakoff, A., Chafey, P., Boucher, D., Fauchereau, F., Chelly, J., and Francis, F. (2003). Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes. *Cereb Cortex* *13*, 620-626.

## G

**Gifford, J.L.**, Walsh, M.P., and Vogel, H.J. (2007). Structures and metal-ion-binding properties of the Ca<sup>2+</sup>-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochem J* *405*, 199-221.

**Godin, J.D.**, and Nguyen, L. (2014). Novel functions of core cell cycle regulators in neuronal migration. *Adv Exp Med Biol* *800*, 59-74.

**Goldberg, D.J.**, and Burmeister, D.W. (1986). Stages in axon formation: observations of growth of *Aplysia* axons in culture using video-enhanced contrast-differential interference contrast microscopy. *J Cell Biol* *103*, 1921-1931.

**Gotz, M.**, and Huttner, W.B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 777-788.

**Grabham, P.W.**, Seale, G.E., Bennecib, M., Goldberg, D.J., and Vallee, R.B. (2007). Cytoplasmic dynein and LIS1 are required for microtubule advance during growth cone remodeling and fast axonal outgrowth. *J Neurosci* *27*, 5823-5834.

**Gray, E.G.**, Westrum, L.E., Burgoyne, R.D., and Barron, J. (1982). Synaptic organisation and neuron microtubule distribution. *Cell Tissue Res* *226*, 579-588.

**Greenberg, D.A.**, Cayanis, E., Strug, L., Marathe, S., Durner, M., Pal, D.K., Alvin, G.B., Klotz, I., Dicker, E., Shinnar, S., *et al.* (2005). Malic enzyme 2 may underlie susceptibility to adolescent-onset idiopathic generalized epilepsy. *Am J Hum Genet* *76*, 139-146.

**Grueber, W.B.**, Yang, C.H., Ye, B., and Jan, Y.N. (2005). The development of neuronal morphology in insects. *Curr Biol* *15*, R730-738.

**Grunewald, R.A.**, and Panayiotopoulos, C.P. (1993). Juvenile myoclonic epilepsy. A review. *Arch Neurol* *50*, 594-598.

**Gu, J.**, Firestein, B.L., and Zheng, J.Q. (2008). Microtubules in dendritic spine development. *J Neurosci* *28*, 12120-12124.

**Gutierrez, H.**, and Davies, A.M. (2007). A fast and accurate procedure for deriving the Sholl profile in quantitative studies of neuronal morphology. *J Neurosci Methods* *163*, 24-30.

## H

**Harada, A.**, Teng, J., Takei, Y., Oguchi, K., and Hirokawa, N. (2002). MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction. *J Cell Biol* *158*, 541-549.

**Harris, E.W.**, Ganong, A.H., and Cotman, C.W. (1984). Long-term potentiation in the hippocampus involves activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res* *323*, 132-137.

**Harris, K.M.**, and Stevens, J.K. (1988). Dendritic spines of rat cerebellar Purkinje cells: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci* *8*, 4455-4469.

**Higginbotham, H.**, Tanaka, T., Brinkman, B.C., and Gleeson, J.G. (2006). GSK3beta and PKCzeta function in centrosome localization and process stabilization during Slit-mediated neuronal repolarization. *Mol Cell Neurosci* *32*, 118-132.

**Hippenmeyer, S.** (2014). Molecular pathways controlling the sequential steps of cortical projection neuron migration. *Adv Exp Med Biol* *800*, 1-24.

**Hu, X.**, Viesselmann, C., Nam, S., Merriam, E., and Dent, E.W. (2008). Activity-dependent dynamic microtubule invasion of dendritic spines. *J Neurosci* *28*, 13094-13105.

## I

**Ikeda, K.**, Brown, J.A., Yagi, T., Norrander, J.M., Hirono, M., Eccleston, E., Kamiya, R., and Linck, R.W. (2003). Rib72, a conserved protein associated with the ribbon compartment of flagellar A-microtubules and potentially involved in the linkage between outer doublet microtubules. *J Biol Chem* 278, 7725-7734.

**Ikeda, T.**, Ikeda, K., Enomoto, M., Park, M.K., Hirono, M., and Kamiya, R. (2005). The mouse ortholog of EFHC1 implicated in juvenile myoclonic epilepsy is an axonemal protein widely conserved among organisms with motile cilia and flagella. *FEBS Lett* 579, 819-822.

**Ikura, M.** (1996). Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem Sci* 21, 14-17.

**Itoh, Y.**, Moriyama, Y., Hasegawa, T., Endo, T.A., Toyoda, T., and Gotoh, Y. (2013). Scratch regulates neuronal migration onset via an epithelial-mesenchymal transition-like mechanism. *Nat Neurosci* 16, 416-425.

## J

**Jaglin, X.H.**, and Chelly, J. (2009). Tubulin-related cortical dysgeneses: microtubule dysfunction underlying neuronal migration defects. *Trends Genet* 25, 555-566.

**Jara-Prado, A.**, Martinez-Juarez, I.E., Ochoa, A., Gonzalez, V.M., Fernandez-Gonzalez-Aragon Mdel, C., Lopez-Ruiz, M., Medina, M.T., Bailey, J.N., Delgado-Escueta, A.V., and Alonso, M.E. (2012). Novel Myoclonin1/EFHC1 mutations in Mexican patients with juvenile myoclonic epilepsy. *Seizure* 21, 550-554.

**Jareb, M.**, and Banker, G. (1997). Inhibition of axonal growth by brefeldin A in hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 17, 8955-8963.

**Jaworski, J.**, Kapitein, L.C., Gouveia, S.M., Dortland, B.R., Wulf, P.S., Grigoriev, I., Camera, P., Spangler, S.A., Di Stefano, P., Demmers, J., *et al.* (2009). Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity. *Neuron* 61, 85-100.

## K

**Kaech, S.**, Parmar, H., Roelandse, M., Bornmann, C., and Matus, A. (2001). Cytoskeletal microdifferentiation: a mechanism for organizing morphological plasticity in dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7086-7092.

**Kapoor, A.**, Satishchandra, P., Ratnapriya, R., Reddy, R., Kadandale, J., Shankar, S.K., and Anand, A. (2008). An idiopathic epilepsy syndrome linked to 3q13.3-q21 and missense mutations in the extracellular calcium sensing receptor gene. *Ann Neurol* 64, 158-167.

**Kappeler, C.**, Saillour, Y., Baudoin, J.P., Tuy, F.P., Alvarez, C., Houbron, C., Gaspar, P., Hamard, G., Chelly, J., Metin, C., *et al.* (2006). Branching and nucleokinesis defects in migrating interneurons derived from doublecortin knockout mice. *Hum Mol Genet* 15, 1387-1400.

**Katano, M.**, Numata, T., Aguan, K., Hara, Y., Kiyonaka, S., Yamamoto, S., Miki, T., Sawamura, S., Suzuki, T., Yamakawa, K., *et al.* (2012). The juvenile myoclonic epilepsy-related protein EFHC1 interacts with the redox-sensitive TRPM2 channel linked to cell death. *Cell Calcium* 51, 179-185.

**Kim, J.H.**, Lee, J.K., Koh, S.B., Lee, S.A., Lee, J.M., Kim, S.I., and Kang, J.K. (2007). Regional grey matter abnormalities in juvenile myoclonic epilepsy: a voxel-based morphometry study. *Neuroimage* 37, 1132-1137.

**King, S.M.** (2006). Axonemal protofilament ribbons, DM10 domains, and the link to juvenile myoclonic epilepsy. *Cell Motil Cytoskeleton* 63, 245-253.

**Koizumi, H.**, Higginbotham, H., Poon, T., Tanaka, T., Brinkman, B.C., and Gleeson, J.G. (2006). Doublecortin maintains bipolar shape and nuclear translocation during migration in the adult forebrain. *Nat Neurosci* 9, 779-786.

- Kretsinger, R.H.**, and Nockolds, C.E. (1973). Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J Biol Chem* *248*, 3313-3326.
- Kriegstein, A.R.**, and Noctor, S.C. (2004). Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci* *27*, 392-399.
- Kwan, A.C.**, Dombeck, D.A., and Webb, W.W. (2008). Polarized microtubule arrays in apical dendrites and axons. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 11370-11375.

## L

- Lavdas, A.A.**, Grigoriou, M., Pachnis, V., and Parnavelas, J.G. (1999). The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* *19*, 7881-7888.
- Leiss, F.**, Koper, E., Hein, I., Fouquet, W., Lindner, J., Sigrist, S., and Tavoanis, G. (2009). Characterization of dendritic spines in the Drosophila central nervous system. *Dev Neurobiol* *69*, 221-234.
- Leon, C.**, de Nijs, L., Chanas, G., Delgado-Escueta, A.V., Grisar, T., and Lakaye, B. (2010). Distribution of EFHC1 or Myoclonin 1 in mouse neural structures. *Epilepsy Res* *88*, 196-207.
- Lewit-Bentley, A.**, and Rety, S. (2000). EF-hand calcium-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* *10*, 637-643.
- Lohmann, C.**, and Bonhoeffer, T. (2008). A role for local calcium signaling in rapid synaptic partner selection by dendritic filopodia. *Neuron* *59*, 253-260.
- LoTurco, J.J.**, and Bai, J. (2006). The multipolar stage and disruptions in neuronal migration. *Trends Neurosci* *29*, 407-413.
- Lowery, L.A.**, and Van Vactor, D. (2009). The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 332-343.

## M

- Ma, S.**, Blair, M.A., Abou-Khalil, B., Lagrange, A.H., Gurnett, C.A., and Hadera, P. (2006). Mutations in the GABRA1 and EFHC1 genes are rare in familial juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsy Res* *71*, 129-134.
- Maletic-Savatic, M.**, Malinow, R., and Svoboda, K. (1999). Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science* *283*, 1923-1927.
- Marin, O.** (2013). Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of neocortical interneurons. *Eur J Neurosci* *38*, 2019-2029.
- Marin, O.**, Valiente, M., Ge, X., and Tsai, L.H. (2010). Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *2*, a001834.
- Marrs, G.S.**, Green, S.H., and Dailey, M.E. (2001). Rapid formation and remodeling of postsynaptic densities in developing dendrites. *Nat Neurosci* *4*, 1006-1013.
- Marsh, E.**, Fulp, C., Gomez, E., Nasrallah, I., Minarcik, J., Sudi, J., Christian, S.L., Mancini, G., Labosky, P., Dobyns, W., *et al.* (2009). Targeted loss of Arx results in a developmental epilepsy mouse model and recapitulates the human phenotype in heterozygous females. *Brain* *132*, 1563-1576.
- Martinez-Juarez, I.E.**, Alonso, M.E., Medina, M.T., Duron, R.M., Bailey, J.N., Lopez-Ruiz, M., Ramos-Ramirez, R., Leon, L., Pineda, G., Castroviejo, I.P., *et al.* (2006). Juvenile myoclonic epilepsy subsyndromes: family studies and long-term follow-up. *Brain* *129*, 1269-1280.
- Mas, C.**, Taske, N., Deutsch, S., Guipponi, M., Thomas, P., Covanis, A., Friis, M., Kjeldsen, M.J., Pizzolato, G.P., Villemure, J.G., *et al.* (2004). Association of the connexin36 gene with juvenile myoclonic epilepsy. *J Med Genet* *41*, e93.
- McConnell, S.K.** (1995). Constructing the cerebral cortex: neurogenesis and fate determination. *Neuron* *15*, 761-768.

- Medina, M.T.**, Suzuki, T., Alonso, M.E., Duron, R.M., Martinez-Juarez, I.E., Bailey, J.N., Bai, D., Inoue, Y., Yoshimura, I., Kaneko, S., *et al.* (2008). Novel mutations in Myoclonin1/EFHC1 in sporadic and familial juvenile myoclonic epilepsy. *Neurology* 70, 2137-2144.
- Meencke, H.J.**, and Janz, D. (1984). Neuropathological findings in primary generalized epilepsy: a study of eight cases. *Epilepsia* 25, 8-21.
- Meijer, L.** (2003). Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Oncologie*.
- Meschaks, A.**, Lindstrom, P., Halldin, C., Farde, L., and Savic, I. (2005). Regional reductions in serotonin 1A receptor binding in juvenile myoclonic epilepsy. *Arch Neurol* 62, 946-950.
- Mitchison, T., and Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237-242.
- Miyata, T.**, Kawaguchi, A., Saito, K., Kawano, M., Muto, T., and Ogawa, M. (2004). Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development* 131, 3133-3145.
- Murai, M.J.**, Sassonia, R.C., Zamboni, A.H., Conte, F.F., Martins-de-Souza, D., Aparicio, R., de Oliveira, M.G., and Lopes-Cendes, I. (2008). Characterization of the C-terminal half of human juvenile myoclonic epilepsy protein EFHC1: dimer formation blocks Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> binding to its functional EF-hand. *Arch Biochem Biophys* 477, 131-138.
- Nadarajah, B.**, Brunstrom, J.E., Grutzendler, J., Wong, R.O., and Pearlman, A.L. (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat Neurosci* 4, 143-150.

## N

- Nakagawa, H.**, Koyama, K., Murata, Y., Morito, M., Akiyama, T., and Nakamura, Y. (2000). EB3, a novel member of the EB1 family preferentially expressed in the central nervous system, binds to a CNS-specific APC homologue. *Oncogene* 19, 210-216.
- Nakase, T.**, and Naus, C.C. (2004). Gap junctions and neurological disorders of the central nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1662, 149-158.
- Neukirchen, D.**, and Bradke, F. (2011). Neuronal polarization and the cytoskeleton. *Semin Cell Dev Biol* 22, 825-833.
- Noctor, S.C.**, Flint, A.C., Weissman, T.A., Dammerman, R.S., and Kriegstein, A.R. (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409, 714-720.
- Noctor, S.C.**, Martinez-Cerdeno, 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.
- Noctor, S.C.**, Martinez-Cerdeno, V., and Kriegstein, A.R. (2008). Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *J Comp Neurol* 508, 28-44.

## O

- Opeskin, K.**, Kalnins, R.M., Halliday, G., Cartwright, H., and Berkovic, S.F. (2000). Idiopathic generalized epilepsy: lack of significant microdysgenesis. *Neurology* 55, 1101-1106.

## P

- Pal, D.K.**, Evgrafov, O.V., Tabares, P., Zhang, F., Durner, M., and Greenberg, D.A. (2003). BRD2 (RING3) is a probable major susceptibility gene for common juvenile myoclonic epilepsy. *Am J Hum Genet* 73, 261-270.

- Patel-King, R.S.**, Benashski, S.E., and King, S.M. (2002). A bipartite Ca<sup>2+</sup>-regulated nucleoside-diphosphate kinase system within the *Chlamydomonas* flagellum. The regulatory subunit p72. *J Biol Chem* *277*, 34271-34279.
- Polleux, F.**, Dehay, C., and Kennedy, H. (1997). The timetable of laminar neurogenesis contributes to the specification of cortical areas in mouse isocortex. *J Comp Neurol* *385*, 95-116.
- Polleux, F.**, Whitford, K.L., Dijkhuizen, P.A., Vitalis, T., and Ghosh, A. (2002). Control of cortical interneuron migration by neurotrophins and PI3-kinase signaling. *Development* *129*, 3147-3160.
- Poulain, F.E.**, and Sobel, A. (2010). The microtubule network and neuronal morphogenesis: Dynamic and coordinated orchestration through multiple players. *Mol Cell Neurosci* *43*, 15-32.
- Prevett, M.C.**, Duncan, J.S., Jones, T., Fish, D.R., and Brooks, D.J. (1995). Demonstration of thalamic activation during typical absence seizures using H<sub>2</sub>(15)O and PET. *Neurology* *45*, 1396-1402.
- Price, D.J.**, Aslam, S., Tasker, L., and Gillies, K. (1997). Fates of the earliest generated cells in the developing murine neocortex. *J Comp Neurol* *377*, 414-422.

## R

- Rainesalo, S.**, Saransaari, P., Peltola, J., and Keranen, T. (2003). Uptake of GABA and activity of GABA-transaminase in platelets from epileptic patients. *Epilepsy Res* *53*, 233-239.
- Rakic, P.** (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol* *145*, 61-83.
- Rossetto, M.G.**, Zanarella, E., Orso, G., Scorzeto, M., Megighian, A., Kumar, V., Delgado-Escueta, A.V., and Daga, A. (2011). Defhc1.1, a homologue of the juvenile myoclonic gene EFHC1, modulates architecture and basal activity of the neuromuscular junction in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* *20*, 4248-4257.
- Roymans, D.**, Willems, R., Vissenberg, K., De Jonghe, C., Grobben, B., Claes, P., Lascu, I., Van Bockstaele, D., Verbelen, J.P., Van Broeckhoven, C., *et al.* (2000). Nucleoside diphosphate kinase beta (Nm23-R1/NDPKbeta) is associated with intermediate filaments and becomes upregulated upon cAMP-induced differentiation of rat C6 glioma. *Exp Cell Res* *261*, 127-138.

## S

- Sammak, P.J.**, and Borisy, G.G. (1988). Direct observation of microtubule dynamics in living cells. *Nature* *332*, 724-726.
- Savic, I.**, Osterman, Y., and Helms, G. (2004). MRS shows syndrome differentiated metabolite changes in human-generalized epilepsies. *Neuroimage* *21*, 163-172.
- Sawamoto, K.**, Wichterle, H., Gonzalez-Perez, O., Cholfin, J.A., Yamada, M., Spassky, N., Murcia, N.S., Garcia-Verdugo, J.M., Marin, O., Rubenstein, J.L., *et al.* (2006). New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* *311*, 629-632.
- Schaar, B.T.**, and McConnell, S.K. (2005). Cytoskeletal coordination during neuronal migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 13652-13657.
- Schaefer, A.W.**, Kabir, N., and Forscher, P. (2002). Filopodia and actin arcs guide the assembly and transport of two populations of microtubules with unique dynamic parameters in neuronal growth cones. *J Cell Biol* *158*, 139-152.
- Segal, M.** (2005). Dendritic spines and long-term plasticity. *Nat Rev Neurosci* *6*, 277-284.
- Sekine, K., Honda, T., Kawauchi, T., Kubo, K., and Nakajima, K. (2011). The outermost region of the developing cortical plate is crucial for both the switch of the radial migration

- mode and the Dab1-dependent "inside-out" lamination in the neocortex. *J Neurosci* *31*, 9426-9439.
- Sharp, D.J.**, Yu, W., Ferhat, L., Kuriyama, R., Rueger, D.C., and Baas, P.W. (1997). Identification of a microtubule-associated motor protein essential for dendritic differentiation. *J Cell Biol* *138*, 833-843.
- Simister, R.J.**, McLean, M.A., Barker, G.J., and Duncan, J.S. (2003). Proton MRS reveals frontal lobe metabolite abnormalities in idiopathic generalized epilepsy. *Neurology* *61*, 897-902.
- Stearns, T.** (2001). Centrosome duplication. a centriolar pas de deux. *Cell* *105*, 417-420.
- Stepanova, T.**, Slemmer, J., Hoogenraad, C.C., Lansbergen, G., Dortland, B., De Zeeuw, C.I., Grosveld, F., van Cappellen, G., Akhmanova, A., and Galjart, N. (2003). Visualization of microtubule growth in cultured neurons via the use of EB3-GFP (end-binding protein 3-green fluorescent protein). *J Neurosci* *23*, 2655-2664.
- Stiess, M.**, and Bradke, F. (2011). Neuronal polarization: the cytoskeleton leads the way. *Dev Neurobiol* *71*, 430-444.
- Stogmann, E.**, Lichtner, P., Baumgartner, C., Bonelli, S., Assem-Hilger, E., Leutmezer, F., Schmied, M., Hotzy, C., Strom, T.M., Meitinger, T., *et al.* (2006). Idiopathic generalized epilepsy phenotypes associated with different EFHC1 mutations. *Neurology* *67*, 2029-2031.
- Super, H.**, Soriano, E., and Uylings, H.B. (1998). The functions of the preplate in development and evolution of the neocortex and hippocampus. *Brain Res Brain Res Rev* *27*, 40-64.
- Suter, D.M.**, and Miller, K.E. (2011). The emerging role of forces in axonal elongation. *Prog Neurobiol* *94*, 91-101.
- Suzuki, T.**, Delgado-Escueta, A.V., Aguan, K., Alonso, M.E., Shi, J., Hara, Y., Nishida, M., Numata, T., Medina, M.T., Takeuchi, T., *et al.* (2004). Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet* *36*, 842-849.
- Suzuki, T.**, Miyamoto, H., Nakahari, T., Inoue, I., Suemoto, T., Jiang, B., Hirota, Y., Itoharu, S., Saido, T.C., Tsumoto, T., *et al.* (2009). Efhc1 deficiency causes spontaneous myoclonus and increased seizure susceptibility. *Hum Mol Genet* *18*, 1099-1109.
- Suzuki, Y.**, Toribe, Y., Mogami, Y., Yanagihara, K., and Nishikawa, M. (2008). Epilepsy in patients with congenital cytomegalovirus infection. *Brain Dev* *30*, 420-424.
- Swartz, B.E.**, Simpkins, F., Halgren, E., Mandelkern, M., Brown, C., Krisdakumtorn, T., and Gee, M. (1996). Visual working memory in primary generalized epilepsy: an 18FDG-PET study. *Neurology* *47*, 1203-1212.
- Szebenyi, G.**, Bollati, F., Bisbal, M., Sheridan, S., Faas, L., Wray, R., Haferkamp, S., Nguyen, S., Caceres, A., and Brady, S.T. (2005). Activity-driven dendritic remodeling requires microtubule-associated protein 1A. *Curr Biol* *15*, 1820-1826.

## T

- 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.
- Tae, W.S.**, Hong, S.B., Joo, E.Y., Han, S.J., Cho, J.W., Seo, D.W., Lee, J.M., Kim, I.Y., Byun, H.S., and Kim, S.I. (2006). Structural brain abnormalities in juvenile myoclonic epilepsy patients: volumetry and voxel-based morphometry. *Korean J Radiol* *7*, 162-172.
- 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.
- Tanaka, T.**, Serneo, F.F., Higgins, C., Gambello, M.J., Wynshaw-Boris, A., and Gleeson, J.G. (2004). Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. *J Cell Biol* *165*, 709-721.

- Thomas, P., Arzimanoglou, A. (2000). *Epilepsies* (Paris, Masson).
- Trachtenberg, J.T.**, Chen, B.E., Knott, G.W., Feng, G., Sanes, J.R., Welker, E., and Svoboda, K. (2002). Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* *420*, 788-794.
- Tripathi, M.**, and Jain, S. (2003). Genetics in epilepsy: transcultural perspectives. *Epilepsia* *44 Suppl 1*, 12-16.
- 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.
- Tsai, L.H.**, and Gleeson, J.G. (2005). Nucleokinesis in neuronal migration. *Neuron* *46*, 383-388.
- Tsien, R.Y.** (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* *67*, 509-544.

## V

- Valiente, M.**, and Marin, O. (2010). Neuronal migration mechanisms in development and disease. *Curr Opin Neurobiol* *20*, 68-78.
- Vallee, R.B.**, Seale, G.E., and Tsai, J.W. (2009). Emerging roles for myosin II and cytoplasmic dynein in migrating neurons and growth cones. *Trends Cell Biol* *19*, 347-355.
- Velisek, L.**, Shang, E., Veliskova, J., Chachua, T., Macchiarulo, S., Maglakelidze, G., Wolgemuth, D.J., and Greenberg, D.A. (2011). GABAergic neuron deficit as an idiopathic generalized epilepsy mechanism: the role of BRD2 haploinsufficiency in juvenile myoclonic epilepsy. *PLoS One* *6*, e23656.
- Vollmar, C.**, O'Muircheartaigh, J., Barker, G.J., Symms, M.R., Thompson, P., Kumari, V., Duncan, J.S., Janz, D., Richardson, M.P., and Koepp, M.J. (2011). Motor system hyperconnectivity in juvenile myoclonic epilepsy: a cognitive functional magnetic resonance imaging study. *Brain* *134*, 1710-1719.
- Vulliemoz, S.**, Vollmar, C., Koepp, M.J., Yogarajah, M., O'Muircheartaigh, J., Carmichael, D.W., Stretton, J., Richardson, M.P., Symms, M.R., and Duncan, J.S. (2011). Connectivity of the supplementary motor area in juvenile myoclonic epilepsy and frontal lobe epilepsy. *Epilepsia* *52*, 507-514.

## W

- Walker, R.A.**, O'Brien, E.T., Pryer, N.K., Soboeiro, M.F., Voter, W.A., Erickson, H.P., and Salmon, E.D. (1988). Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J Cell Biol* *107*, 1437-1448.
- Wichterle, H.**, Turnbull, D.H., Nery, S., Fishell, G., and Alvarez-Buylla, A. (2001). In utero fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development* *128*, 3759-3771.
- Wiggin, G.R.**, Fawcett, J.P., and Pawson, T. (2005). Polarity proteins in axon specification and synaptogenesis. *Dev Cell* *8*, 803-816.
- Witte, H.**, Neukirchen, D., and Bradke, F. (2008). Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J Cell Biol* *180*, 619-632.
- Woermann, F.G.**, Free, S.L., Koepp, M.J., Sisodiya, S.M., and Duncan, J.S. (1999). Abnormal cerebral structure in juvenile myoclonic epilepsy demonstrated with voxel-based analysis of MRI. *Brain* *122 ( Pt 11)*, 2101-2108.
- Wolf, P.** (1992). Juvenile myoclonic epilepsy. In *Epilepsy syndromes in infancy, childhood and adolescence*, J. Roger, Bureau, M., Dravet, C., Dreifuss, F.E., Perret, A. and Wolf, P., ed. (London, John Libbey and Company Ltd), pp. 313-327.
- Wong, M.**, and Guo, D. (2013). Dendritic spine pathology in epilepsy: cause or consequence? *Neuroscience* *251*, 141-150.

**Wu, Q.,** Liu, J., Fang, A., Li, R., Bai, Y., Kriegstein, A.R., and Wang, X. (2014). The dynamics of neuronal migration. *Adv Exp Med Biol* *800*, 25-36.

**Y**

**Yu, W.,** and Baas, P.W. (1994). Changes in microtubule number and length during axon differentiation. *J Neurosci* *14*, 2818-2829.

**Yu, W.,** Cook, C., Sauter, C., Kuriyama, R., Kaplan, P.L., and Baas, P.W. (2000). Depletion of a microtubule-associated motor protein induces the loss of dendritic identity. *J Neurosci* *20*, 5782-5791.

**Yuste, R.,** and Bonhoeffer, T. (2004). Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat Rev Neurosci* *5*, 24-34.

**Z**

**Zanic, M.,** Stear, J.H., Hyman, A.A., and Howard, J. (2009). EB1 recognizes the nucleotide state of tubulin in the microtubule lattice. *PLoS One* *4*, e7585.

**Zhang, D.,** Rogers, G.C., Buster, D.W., and Sharp, D.J. (2007). Three microtubule severing enzymes contribute to the "Pacman-flux" machinery that moves chromosomes. *J Cell Biol* *177*, 231-242.

**Zhang, X.,** Bearer, E.L., Boulat, B., Hall, F.S., Uhl, G.R., and Jacobs, R.E. (2010). Altered neurocircuitry in the dopamine transporter knockout mouse brain. *PLoS One* *5*, e11506.

**Zuo, Y.,** Lin, A., Chang, P., and Gan, W.B. (2005). Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron* *46*, 181-189.



## **Annexes :**

- Matériels et méthodes complémentaires
  - Publication n°1
  - Publication n°2



# **Matériels et méthodes complémentaires**



Ce « matériel et méthode » complète celui publié par notre équipe dans l'article intitulé « Mutations of EFHC1, linked to juvenile myoclonic epilepsy, disrupt radial and tangential migrations during brain development » (Wolkoff *et al.*, 2012)

### **Culture cellulaire et transfections**

Les cellules HeLa sont maintenues dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco) complétement par 10% de sérum de bovin fétal (Greiner bio-one). Les cellules sont cultivées dans des boîtes de pétri de 10 cm de diamètre (Cell star, Greiner Bio-one) à 37°C, dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>.

Les cellules HeLa sont transfectées avec du Fugene 6 (Roche) selon le protocole de la firme. Afin de réaliser les courts films en temps réel, ces cellules sont transfectées 48h avant avec les plasmides contenant les formes mutées (1µg/µl) et 24h après avec le plasmide contenant la protéine EB3 couplée à la RFP (0,25µg/µl). Pour les transfections avec le shARN, nous avons transfecté 48h avant l'enregistrement des films avec le plasmide contenant le shARN (1µg/µl) et 24h après, nous avons co-transfecté les cellules avec le plasmide contenant le shARN et le plasmide EB3-RFP en veillant à bien respecter les proportions décrites ci-dessous, à savoir 4 fois moins de plasmides EB3 que de shARN.

### **Videos en temps réel**

Les vidéos en temps réel ont été enregistrées avec le microscope confocal Leica TCS SP2. Des acquisitions répétitives sont effectuées toutes les 2sec pendant 90secondes (zoom 60x). La moyenne de la vélocité a été obtenue en utilisant un plug-In KymoTool-Box (Cordelienres F, Institut Curie, France) du logiciel Image J.

Ce kymotoolbox permet l'étude du mouvement des protéines EB3 fixées à l'extrémité « plus end » des microtubules via la transposition de celle-ci sur un kymographe. D'abord, l'ensemble des plans en Z sont projetés sur un seul plan et ce pour chaque point du temps. C'est sur cette projection de l'intensité maximale que se déroule l'analyse (projection Z). Pour tracer le chemin des vésicules, une projection de tous les points de temps est réalisée. Ce chemin part généralement du centrosome vers la périphérie de la cellule. Ensuite, le plugin

applique un tracé sur la projection Z et analyse la position de chaque vésicule le long de ce tracé pour chaque point du temps. Il est alors possible de voir quelles sont les protéines +TIPS qui se déplacent. Pour analyser les kymographes, le tracé de chaque protéines +TIPS est réalisé. Le plugin restitue alors les paramètres de la dynamique de microtubules avec notamment la vitesse qui correspond à la pente de la droite du tracé.

### **Mise en culture de cellules à partir de cortex embryonnaire**

Cette technique s'effectue en deux étapes : une dissociation enzymatique suivie d'une dissociation mécanique. Tout d'abord, pour la dissociation enzymatique, les cerveaux préalablement électroporés à E14.5 sont disséqués et le cortex est microdisséqué dans du PBS-glucose 1,5%. Le cortex d'un cerveau découpé en morceaux est transféré dans une solution de papaïne-EBSS (Worthington) à pH 7.4. Après 10 minutes d'incubation à 37°C, 250µl d'une solution de DNase I-EBSS (Sigma) à pH7.4 sont ajoutés. De nouveau, après 10 minutes d'incubation, la papaïne est inhibée par 1ml de solution d'ovomucoïde-albumine EBSS (Worthington). Le tout est transféré dans un tube contenant 1ml de milieu neurobasal (Invitrogen) contenant 1% N2 (Gibco), 2% de B27 sans vitamine A (Gibco), 1% de glutamax (Invitrogen) et 1% de pénicilline-streptomycine (Invitrogen). Le tout formant le milieu neurobasal dit complet.

Pour la dissociation mécanique, les morceaux de cortex sont dissociés une première fois avec une pipette de 5ml par 6-7 aspirations et rejet du milieu en évitant de former des bulles. Ensuite, nous effectuons la même démarche à l'aide d'une pipette pasteur à embout rétréci à la flamme. Après centrifugation 5 minutes à  $200 \times g$ , le surnageant est enlevé et resuspendu dans 3ml de milieu neurobasal complet. Les cellules sont comptés à l'aide d'une lame de Thoma et elles sont mises en culture sur des lamelles coatées à la polyornithine (1h à température ambiante, 0,1mg/ml, Sigma) et à la lamine (2h à 37°C, 5µg/ml, MP biomedical) à la densité de 110000 cellules/ml. Une fois que les cellules ont adhéré, elles sont noyées avec le milieu neurobasal complet et maintenues en culture pendant 4 jours.

Finalement, les neurones corticaux en culture sont fixés à l'aide de paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 30 minutes à 4°C.

## **Préparation du tissu**

Les embryons électroporés à E14.5 (selon la méthode décrite dans de Wolkoff *et al.*, 2012) sont sacrifiés 5 ou 10 après leur naissance. Les cerveaux des bébés ont subi une perfusion intracardiaque d'abord de NaCl à 0,9% suivie par de la PFA à 4%. Les cerveaux sont ensuite post-fixés dans de la PFA à 4% pendant une nuit. Ils sont finalement cryopréservés dans une solution de sucrose à 20% pendant une nuit. Ensuite, le protocole est identique à celui décrit dans de Wolkoff *et al.*, 2012 pour l'obtention des cryosections et des immunomarquages à l'aide de l'anticorps polyclonal de rat anti-GFP (Molecular probe, 1:2000).

## **Analyse quantitative pour la dendritogenèse**

Les images sont obtenues à partir d'un microscope inversé à fluorescence Olympus IX81 couplé à un système confocal Olympus Fluoview FV1000 (Olympus). La mesure des longueurs des dendrites a été effectuée à l'aide du plug-In NeuronJ du logiciel ImageJ.

L'analyse de Sholl permet la quantification du nombre des extensions neuritiques. Pour ce faire des cercles concentriques sont tracés avec une implémentation régulière du rayon. Ces cercles sont centrés au niveau du soma et le nombre Xi d'extensions ayant une intersection avec l'un des cercles est compté. Cette analyse est effectuée à l'aide du plugin cercles concentriques disponibles dans Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/>). Dans notre analyse, un cercle de 10 $\mu$ m de rayon a été implémenté de 5 $\mu$ m à chaque cercle.

## **Analyse statistique**

Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide d'un "one-way ANOVA" suivi d'un post test de Bonferroni. Les différences entre les deux groupes sont considérées comme significative si la  $P < 0.05$ .



## **Publication n°1:**

**“Mutations of EFHC1, linked to juvenile myoclonic epilepsy, disrupt radial and tangential migrations during brain development”**

Laurence de Nijs, Nathalie Wolkoff, Bernard Coumans, Antonio V. Delgado-Escueta, Thierry Grisar and Bernard Lakaye.



# Mutations of EFHC1, linked to juvenile myoclonic epilepsy, disrupt radial and tangential migrations during brain development

Laurence de Nijs<sup>1,†</sup>, Nathalie Wolkoff<sup>1,†</sup>, Bernard Coumans<sup>1</sup>, Antonio V. Delgado-Escueta<sup>2</sup>, Thierry Grisar<sup>1</sup> and Bernard Lakaye<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>GIGA-Neurosciences, University of Liège, Liège, Belgium and <sup>2</sup>Epilepsy Genetics/Genomics Laboratories, Neurology and Research Services, VA Greater Los Angeles Healthcare System and David Geffen School of Medicine at UCLA, Los Angeles, CA, USA

Received June 17, 2012; Revised August 17, 2012; Accepted August 18, 2012

**Heterozygous mutations in *Myoclonin1/EFHC1* cause juvenile myoclonic epilepsy (JME), the most common form of genetic generalized epilepsies, while homozygous F229L mutation is associated with primary intractable epilepsy in infancy. Heterozygous mutations in adolescent JME patients produce subtle malformations of cortical and subcortical architecture, whereas homozygous F229L mutation in infancy induces severe brain pathology and death. However, the underlying pathological mechanisms for these observations remain unknown. We had previously demonstrated that EFHC1 is a microtubule-associated protein (MAP) involved in cell division and radial migration during cerebral corticogenesis. Here, we show that JME mutations, including F229L, do not alter the ability of EFHC1 to colocalize with the centrosome and the mitotic spindle, but act in a dominant-negative manner to impair mitotic spindle organization. We also found that mutants EFHC1 expression disrupted radial and tangential migration by affecting the morphology of radial glia and migrating neurons. These results show how *Myoclonin1/EFHC1* mutations disrupt brain development and potentially produce structural brain abnormalities on which epileptogenesis is established.**

## INTRODUCTION

Juvenile myoclonic epilepsy (JME) is the most common form of genetic generalized epilepsies and represents 10–30% of all epilepsies (1,2). JME typically starts during adolescence as symmetric and asymmetric myoclonic jerks, clonic tonic-clonic seizures and sometimes absence seizures (1,2). A genetic contribution to JME has long been established. Twenty-two chromosomal loci have been genetically linked with JME (3), although mutations have been identified only in five Mendelian genes (*CACNB4*, *CASR*, *GABRA1*, *GABRD* and *Myoclonin1/EFHC1*). <http://omim.org> and <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>). Three susceptibility single-nucleotide polymorphisms in *BRD2*, *Cx-36* and *ME2* have also been genetically associated with and contribute to the risk of JME (2,3).

So far, most mutations discovered in the coding sequence of *EFHC1* are heterozygous missense mutations (4–9). Rarely,

nonsense, deletions and deletions/frameshifts were also observed (8). Heterozygous mutations in *Myoclonin1/EFHC1* are to date the most frequent, reported in several unrelated families around the world, causing 3–9% of JME including autosomal dominant, singletons and sporadic cases (4–8). More recently, homozygous F229L mutation in *Myoclonin1/EFHC1* was shown to produce severe drug-resistant epilepsy in infancy starting 12–16 h after birth (10). While heterozygous mutations in adolescent JME patients produce subtle malformations of cortical and subcortical architecture (2,11), homozygous F229L mutation in infancy induces severe brain pathology and death at 6 months to 3 years of age (10).

*EFHC1* encodes a 70 kDa protein with three DM10 domains of unknown function and a single EF-hand motif with a Ca<sup>2+</sup>-binding domain (4). We have previously demonstrated that EFHC1 is a microtubule-associated protein (MAP) that localized to the centrosome and the mitotic spindle

\*To whom correspondence should be addressed at: University of Liège, GIGA-Neurosciences, 1 Avenue de l'hôpital, B-4000 Liège, Belgium. Tel: +32 43665964; Fax: +32 43665953; Email: b.lakaye@ulg.ac.be

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

through its N-terminus (12,13). We have shown that EFHC1 plays a role in cell division as its loss of function disrupts mitotic spindles organization. Moreover, in the developing neocortex (NCx), an acute EFHC1 deficiency impairs radial migration of projection neurons (13).

The development of the cerebral cortex is a very complex process, which follows strictly regulated and tightly linked sequences of proliferation, cell cycle exit, cell migration to specific cell layers and neuronal differentiation. Based on their origin, there are two major types of neurons in the developing brain, excitatory projection neurons and inhibitory interneurons; both types being important to maintain the balance between excitation and inhibition in the cortex. Projection neurons are generated in the dorsal telecephalon directly from radial glial cells in the proliferative germinal ventricular zone (VZ) (14–16). Radial glial cells undergo rapid proliferative divisions to expand the progenitor pool before they exit the cell cycle. Newborn neurons move radially to the subventricular zone (SVZ)-intermediate zone (IZ) where they pause and adopt a multipolar morphology before converting to a bipolar cell and recommencing their radial migration along radial glial processes to reach their final position in the cortical plate (CP) (16). Interneurons, on the other hand, originate from ganglionic eminences of the ventral forebrain and reach the cortex by tangential migration (15,17). Unlike radially migrating neurons, they are independent of radial glia for their migration (18). Cells from both types move forward by means of nucleokinesis, a saltatory process that involves forward extension of the leading process and somal translocation to keep up (19,20).

Here, we investigate the impact of the first four JME-causing mutations discovered (D210N, R221H, F229L and D253Y) and two coding polymorphisms (R159W and I619L), used as control (4) on EFHC1 function during the cell division and cortical development. We show that, in HEK293 cells, EFHC1 mutations do not alter the ability of the protein to colocalize with centrosomes and mitotic spindles but induce mitotic spindle defects. Moreover, we present evidence that mutants EFHC1 deleteriously impact radial and tangential migration during brain development by affecting the radial glia scaffold organization and the morphology of radially and tangentially migrating neurons. Overall, our results demonstrate a dominant-negative effect of mutations on EFHC1 properties and identify multiple distinct roles for EFHC1 in corticogenesis. These findings clarify the observed microdysgenesis produced by heterozygous mutations, the severe brain pathology created by homozygous mutations and hyperexcitable circuits in both JME and severe epilepsy of infancy.

## RESULTS

### The subcellular localization of mutants EFHC1 is similar to wild-type

As previously described for wild-type EFHC1 (12) (Fig. 1), we examined by fluorescence imaging the subcellular distribution in HEK293 cells of the first four mutations that have been associated with JME by Suzuki *et al.* (4), i.e. D210N, R221H, F229L and D253Y. In interphase cells, EGFP-tagged mutants EFHC1 were observed all over the cytoplasm and in

the nucleus, except the nucleoli (Fig. 1A). Moreover, mutant proteins colocalized with the centrosome, as shown by the  $\gamma$ -tubulin staining (Fig. 1A). During mitosis, all proteins associated with the mitotic spindle (Fig. 1B). Between prophase to late telophase, the staining was specifically located at spindle poles (Fig. 1B and supplementary Material, S1A). It was also observed at the spindle midzone from late anaphase to telophase and at the midbody during cytokinesis (Supplementary Material, Fig. S1A). We found the same results in the stably transfected HEK Flp-In T-Rex-293 cell line (not shown). In addition, we analyzed the subcellular localization of some EFHC1 coding polymorphisms (R159W and I619L) that were also present in healthy control population (4), and found no difference with the wild-type protein (Fig. 1 and Supplementary Material, Fig. S1B). Therefore, these data showed that all mutated and polymorphic forms of EFHC1 studied present the same expression pattern as the wild-type protein (12), indicating that they did not impair the subcellular targeting of EFHC1.

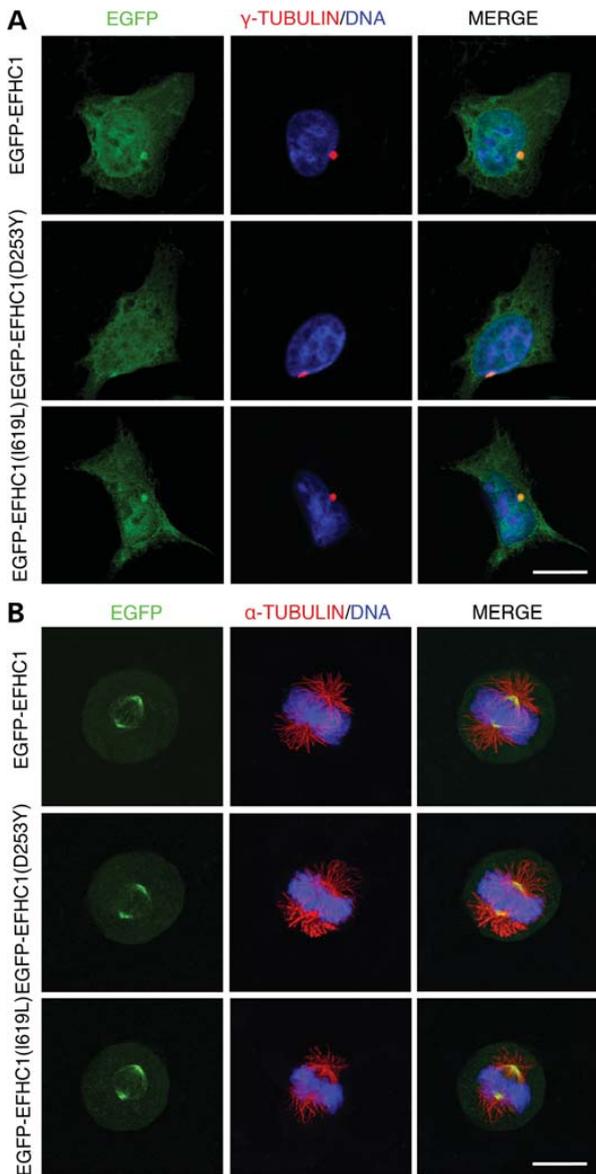
### JME mutations induce mitotic spindle defects

Based on our previous study reporting that EFHC1 loss of function leads to abnormal mitotic spindles (13), we further investigated the impact of EFHC1 mutations on mitosis. We, therefore, analyzed spindle morphology in HEK293 cells transfected with wild-type, mutants or polymorphisms EGFP-EFHC1 after  $\alpha$ -tubulin staining (Fig. 2). We found that overexpression of mutated forms resulted in mitotic spindle defects, including monopolar spindles and chromosomes alignment failures during metaphase (chromosomes congression abnormalities) (Fig. 2A). We quantified their occurrence in cultures overexpressing different EGFP-tagged EFHC1 proteins (Fig. 2B) and found that the percentage of abnormal spindles was significantly higher for mutant proteins ( $65.7 \pm 2.2\%$  for D210N,  $57.8 \pm 2.9\%$  for R221H,  $67.2 \pm 2.3\%$  for F229L and  $71.3 \pm 4.6\%$  for D253Y) compared with EGFP-EFHC1 ( $32.5 \pm 5.9\%$ ) or polymorphisms ( $36.4 \pm 5.6\%$  for R159W and  $37.7 \pm 4.5\%$  for I619L). We found the same results in the stably transfected HEK Flp-In T-Rex-293 cell line (not shown). These results suggest that mutant forms of EFHC1 could act as dominant-negative proteins that impair the normal function of wild-type protein.

Because we have previously demonstrated that mitotic spindle defects led to an accumulation of mitotic cells (13), we quantified the number of mitosis in cultures expressing EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1(D253Y) (the mutant form that gave the more important alteration of mitosis) or EGFP-EFHC1(I619L) (Fig. 2C). We found no differences in the mitotic index between the different above conditions.

### Mutants EFHC1 impair radial migration of cortical projection neurons

Since EFHC1 is essential for radial migration of projection neurons during cortical development (13), we examine the effect of its mutated forms on this process. We introduced EGFP or EGFP-tagged wild-type, mutant and polymorphic EFHC1 proteins into neural progenitor cells in mouse NCx by *in utero* electroporation at embryonic day (E) 14.5. Three



**Figure 1.** Subcellular localization of mutant and polymorphic EFHC1 proteins. HEK293 cells expressing EGFP-tagged wild-type (EGFP-EFHC1), EGFP-EFHC1(D253Y) or EGFP-EFHC1(I619L) (green). EGFP-EFHC1(D253Y) and EGFP-EFHC1(I619L) images are representative of mutants and polymorphisms, respectively. (A) Interphase cells were stained for  $\gamma$ -tubulin (red) to visualize centrosomes. DNA displayed in blue. Merge panels show that all EGFP-tagged proteins colocalized with the centrosome. (B) Mitotic cells were stained for  $\alpha$ -tubulin (red) to visualize microtubules. DNA displayed in blue. Merge panels show that all EGFP-tagged proteins associate with the mitotic spindle. Scale bars represent 20  $\mu$ m.

days later, we analyzed the distribution of EGFP-positive cells in the VZ/SVZ, IZ and CP (Fig. 3A). As previously described (13), no obvious differences in the spatial distribution between EGFP and EGFP-EFHC1 transfected brains were observed

(Fig. 3A and B). However, expression of EFHC1 mutations impaired radial migration as it resulted in the accumulation of electroporated cells in the IZ (Fig. 3B,  $45.5 \pm 3.4\%$  for D210N,  $51.8 \pm 2.9\%$  for R221H,  $45.9 \pm 3.6\%$  for F229L and  $48.9 \pm 2.8\%$  for D253Y versus  $38.6 \pm 2.2\%$  for EFHC1 and  $42.6 \pm 3.7\%$  for EGFP) together with a reduced percentage of projection neurons in the CP (Fig. 3B,  $21.8 \pm 4.3\%$  for D210N,  $17.5 \pm 3.9\%$  for R221H,  $22.8 \pm 2.2\%$  for F229L and  $18.1 \pm 1.9\%$  for D253Y versus  $29.8 \pm 1.8\%$  for EFHC1 and  $27.1 \pm 2.8\%$  for EGFP). In contrast, polymorphic proteins had no significant effect on radial migration (Fig. 3A and B). As experiments performed on cell lines (Fig. 2), these results point out a dominant-negative effect of mutant proteins. To verify this hypothesis, we analyzed the migration of cells electroporated with a dominant-negative form of EFHC1 containing only the microtubule-binding domain of the protein (EGFP-N45; (13)). We found that EGFP-N45 construct interfered with radial migration in the same way as mutants EFHC1 (Supplementary Material, Fig. S2), confirming the dominant-negative effect of mutant proteins.

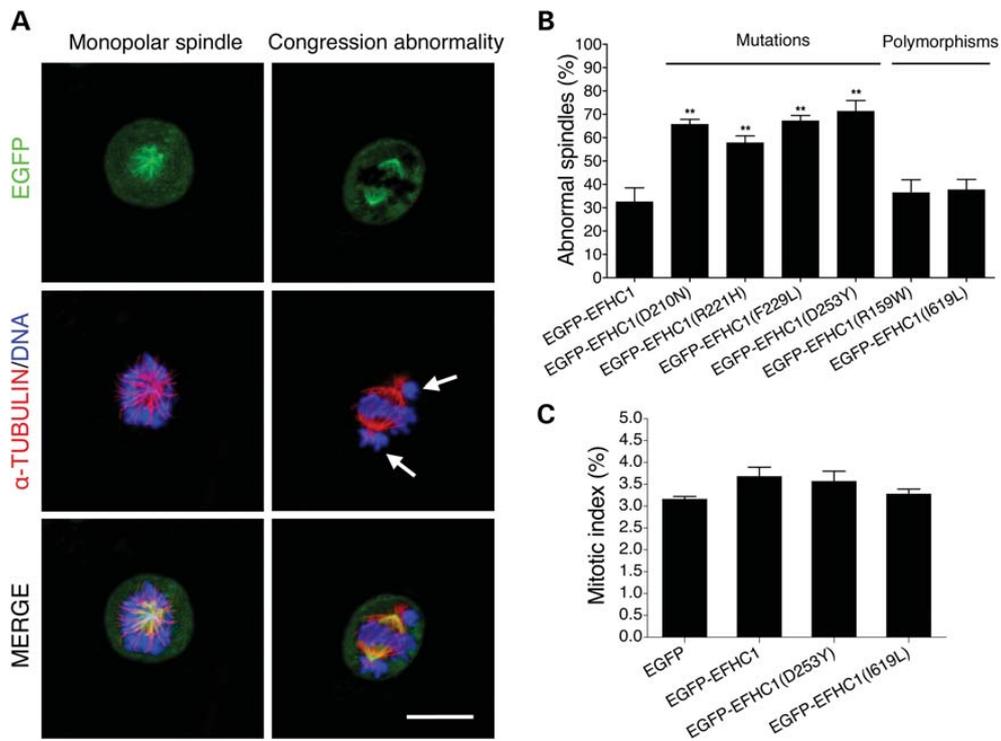
#### Mutated forms of EFHC1 does not influence progenitor cell proliferation and cell cycle exit

Because cortical progenitor cell division occurs before and is tightly coupled to neuronal migration, we decided to study the influence of EFHC1 mutations on mitosis, proliferation and cell cycle exit of cortical progenitors by *in utero* electroporation at E14.5. As the disruption of radial migration was similar for all mutant and polymorphic proteins, we selected the same mutant (EGFP-EFHC1(D253Y)) and polymorphism (EGFP-EFHC1(I619L)) as previously for further analysis. Sections from electroporated brains collected 2 days after electroporation were subjected to immunofluorescence to phospho-Histone H3 (PHH3), an M-phase marker (Fig. 4A). Similarly to cell cultures (Fig. 2C), the quantification of the mitotic index revealed that the percentage of mitotic cells remained unchanged after mutant protein expression compared with EGFP or EGFP-EFHC1 (Fig. 4B).

We next explored whether mutants EFHC1 influence the rate of cell cycle exit of cortical progenitors. For this purpose, embryos were electroporated *in utero* at E14.5 with EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1(D253Y) or EGFP-EFHC1(I619L), pulse labeled by a single injection of BrdU at E15.5 and sacrificed at E16.5. Triple immunolabeling with antibodies directed against green fluorescent protein (GFP), BrdU and Ki67 (Fig. 4C) allowed us to establish the cell cycle exit index. We found no difference in the percentage of cells that had exited the cell cycle between all conditions tested (Fig. 4D). Altogether, our results demonstrate that mutations of EFHC1 do not influence the proliferation and the cell cycle exit of cortical progenitors.

#### Mutants EFHC1 affect the morphology of radial glia and migrating projection neurons

To better understand the observed defect in radial migration and the accumulation of cells in the IZ induced by mutants EFHC1, we analyzed the morphology of radial glia and migrating cells within the IZ and CP (Fig. 5) 3 days after *in*



**Figure 2.** EFHC1 mutations induce mitotic spindle defects. (A) Representative images of mitotic spindle defects observed in HEK293 cells expressing mutants EGFP-EFHC1 (green). Monopolar spindle and chromosome alignment failure on metaphase plate (congression abnormality, arrows) are shown. The cells were stained for  $\alpha$ -tubulin (red) and DNA (blue). Scale bar represents 20  $\mu$ m. (B) Quantification of abnormal spindles in cultures 2 days after transfections with EGFP, EGFP-tagged wild-type, mutants or polymorphisms EFHC1. (C) Quantification of the mitotic index 2 days after transfections with EGFP, EGFP-EFHC1, mutant EGFP-EFHC1(D253Y) or polymorphic EGFP-EFHC1(I619L). Error bars show SEM. \*\* $P < 0.01$ .

*utero* electroporation at E14.5. In these experiments, again, we studied one representative mutation (EGFP-EFHC1(D253Y)) and one polymorphism (EGFP-EFHC1(I619L)) together with EGFP and EGFP-EFHC1 used as control.

Immunohistochemistry using an antibody to brain lipid-binding protein (BLBP), a marker of radial glia, revealed a disruption of normal radial glia architecture in the presence of mutant protein (Fig. 5A). Brains expressing EGFP, EGFP-EFHC1 or EGFP-EFHC1 (I619L) presented long parallel radial glial fibers that terminate with tight pial end-feet. In contrast, cortices electroporated with EGFP-EFHC1(D253Y) showed a reduction in the extent and number of radial fibers with few pial end-feet.

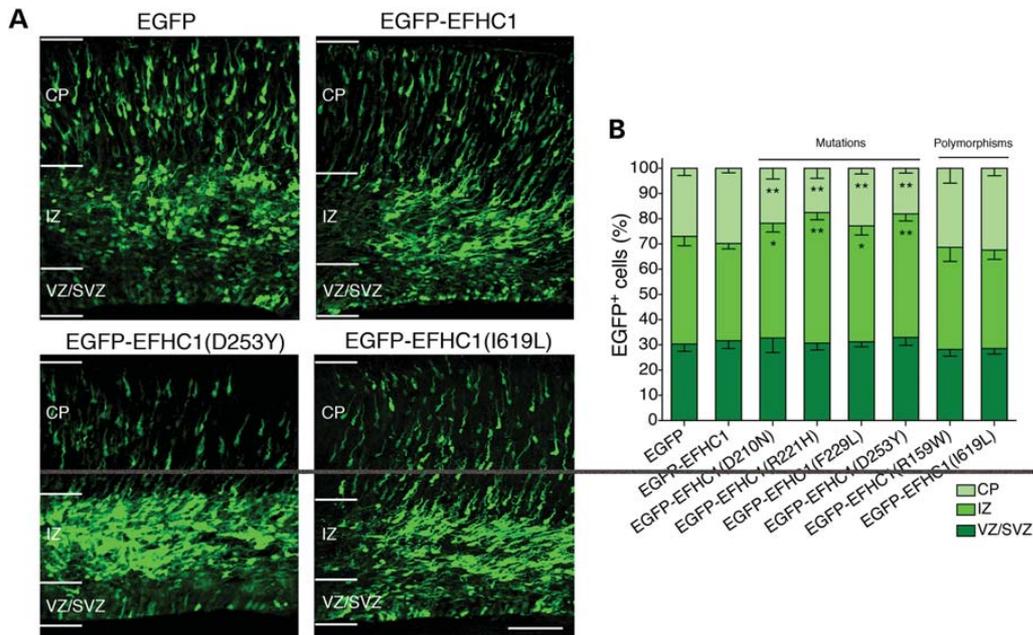
In the IZ, we quantified the number of multipolar (Fig. 5B, arrow heads) and bipolar (Fig. 5B, arrows) cells. We showed that the expression of EGFP-EFHC1(D253Y) leads to an accumulation of multipolar cells (Fig. 5C,  $76.7 \pm 4.54\%$ ) compared with EGFP ( $33.1 \pm 5.4\%$ ), EGFP-EFHC1 ( $37.1 \pm 5.3\%$ ) and EGFP-EFHC1(I619L) ( $44.7 \pm 7.4\%$ ), suggesting a defect in the multipolar–bipolar transition.

In the CP of brains transfected with EGFP, EGFP-EFHC1 and EGFP-EFHC1(I619L), labeled cells were bipolar with an elongated cell body and long leading processes orientated in roughly the same direction (Fig. 5D). Though, in the presence of EGFP-EFHC1(D253Y), the leading processes seemed

to be shorter, twisted (Fig. 5D, white arrows) or harbored several bulges (Fig. 5D, white arrow heads). Also some cells with round-shaped cell body lacking a leading process could be observed (Fig. 5D, red arrow heads). The quantification of leading processes length of migrating neurons in the CP revealed that leading processes are smaller in the presence of mutant EFHC1 [Fig. 5E,  $44.1 \pm 4.1 \mu$ m for EGFP,  $47.3 \pm 4.9 \mu$ m for EGFP-EFHC1,  $39.2 \pm 4.7 \mu$ m for EGFP-EFHC1(I619L) versus  $28.6 \pm 2.4 \mu$ m for EGFP-EFHC1(D253Y)]. These results highlight that mutants EFHC1 interfere with leading processes extension, and thus perturb nucleokinesis of migrating neurons. All together, our data suggest that mutants EFHC1 alter the morphology of radial glia and projection neurons at different steps of radial migration, resulting in their accumulation in the IZ and impairment of their correct migration in the CP.

#### Mutants EFHC1 disrupt tangential migration of interneurons

During cortical development, radial and tangential migrations set up the arsenal of cortical cell controlling the balance between synaptic excitation and inhibition, whose integrity is impaired in epileptic phenomena. As we showed a role of EFHC1 in radial migration, we therefore studied the impact of EFHC1 and its mutations on the tangential migration of



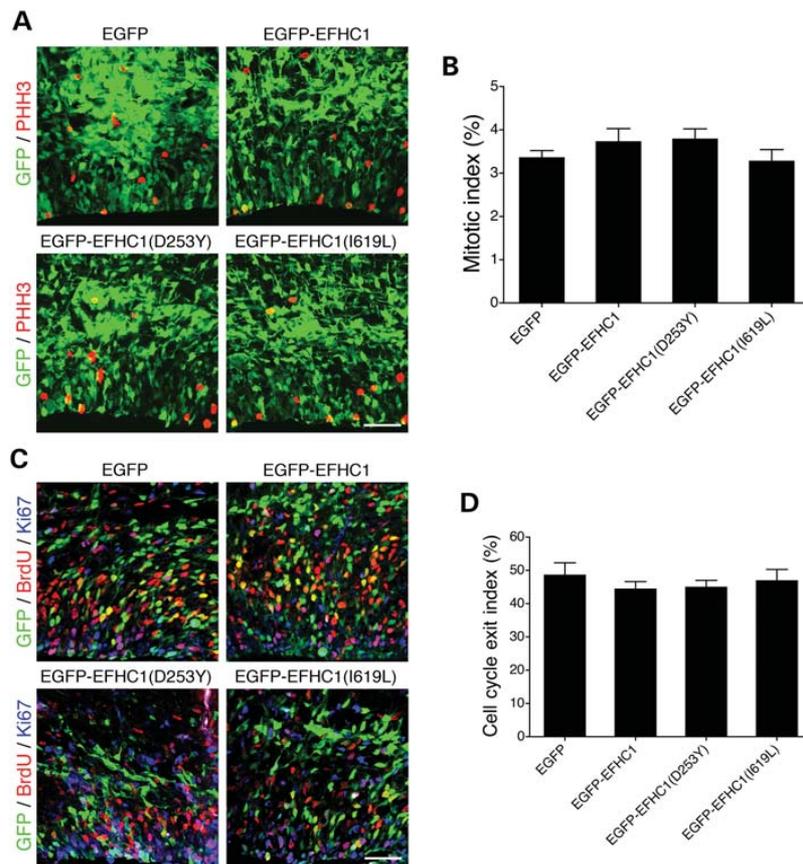
**Figure 3.** Acute expression of EFHC1 mutations alters radial migration of projection neurons in the cerebral cortex. (A) Distribution of EGFP-positive cells in different cortical regions (VZ/SVZ, IZ and CP) 3 days after *in utero* electroporation at E14.5 of EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1(D253Y) or EGFP-EFHC1(I619L) (green). EGFP-EFHC1(D253Y) and EGFP-EFHC1(I619L) images are representative of mutants and polymorphisms, respectively. EGFP-EFHC1(D253Y) panel shows radial migration defect in the CP. Scale bar represents 100  $\mu$ m. (B) Quantification of EGFP-positive cells in different cortical regions (VZ/SVZ, IZ and CP) 3 days after *in utero* electroporation at E14.5 under different above conditions. Error bars show SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

interneurons. For that purpose, we performed focal electroporation directly into the median ganglionic eminence (MGE) of rat organotypic slice cultures at E17. Three days after electroporation of EGFP, EGFP-tagged wild-type, mutant and polymorphic EFHC1 proteins, the position of electroporated cells was noted (Fig. 6A) and the proportion of EGFP-positive cells that had crossed the corticostriatal junction (CSJ) to reach the NCx was quantified (Fig. 6B). The percentage of EGFP-EFHC1 cells in the cortex was not significantly different from EGFP (Fig. 6B,  $33.09 \pm 1.56\%$  versus  $36.08 \pm 1.57\%$ , respectively), indicating that EFHC1 overexpression has no effect on the tangential migration of interneurons in the developing brain. On the contrary, the expression of mutants EFHC1 induced a significant reduction of EGFP<sup>+</sup> cells in the cortex compared with wild-type and polymorphics EFHC1 proteins or EGFP (Fig. 6B,  $13.1 \pm 3.6\%$  for D210N,  $15.2 \pm 2.9\%$  for R221H,  $15.8 \pm 4.5\%$  for F229L and  $12.3 \pm 2.4\%$  for D253Y).

We next examined the morphology of cells that had migrated in the cortex (Fig. 6C). We found that, similarly to projection neurons, most interneurons expressing mutants EFHC1 displayed shorter and twisted leading processes. [Fig. 6D,  $40.6 \pm 4.1 \mu$ m for EGFP;  $37.7 \pm 4.5 \mu$ m for EGFP-EFHC1;  $38.8 \pm 4.4 \mu$ m for EGFP-EFHC1(I619L) versus  $25.5 \pm 4.3 \mu$ m for EGFP-EFHC1(D253Y)]. Taken altogether, these results indicate that EFHC1 is necessary for tangential migration of interneurons, possibly by regulating cell morphology and process formation during migration.

## DISCUSSION

The principal questions in the pathophysiology of JME caused by heterozygous mutations of EFHC1 and intractable epilepsy of infancy due to homozygous mutations of EFHC1 are— which function(s) of myoclonin1/EFHC1 (i) cause(s) the characteristic JME myoclonic and clonic tonic–clonic seizures, (ii) facilitate(s) the establishment of chronic epilepsy (epileptogenesis), (iii) produce(s) the subtle ‘microdysgenesis’ malformations of cortical and subcortical architecture in its adolescent syndrome and severe intractable epilepsy, brain pathology and death in its syndrome of infancy? Several, but not mutually exclusive, hypotheses have been proposed for the functions of EFHC1. Suzuki *et al.* showed that overexpression of EFHC1 in mouse hippocampal primary culture neurons induced apoptosis by enhancing R-type voltage-dependent Ca<sup>2+</sup>-channel currents, an effect that is reduced by mutations (4). More recently, Katano *et al.* reported a molecular and functional interaction between EFHC1 and TRPM2, a Ca<sup>2+</sup>-permeable channel that mediates susceptibility to cell death (21). These data suggest that EFHC1 controls cellular calcium homeostasis and could explain how seizures are triggered and how impaired apoptosis result. Additionally, EFHC1 was shown to be expressed in tissues containing motile cilia and flagella, such as lung, testis or ependyma, suggesting a role for the protein in ciliary functions (22–25). This was confirmed in the EFHC1-deficient mice as the ciliary beating frequency of ependymal cells was affected in null



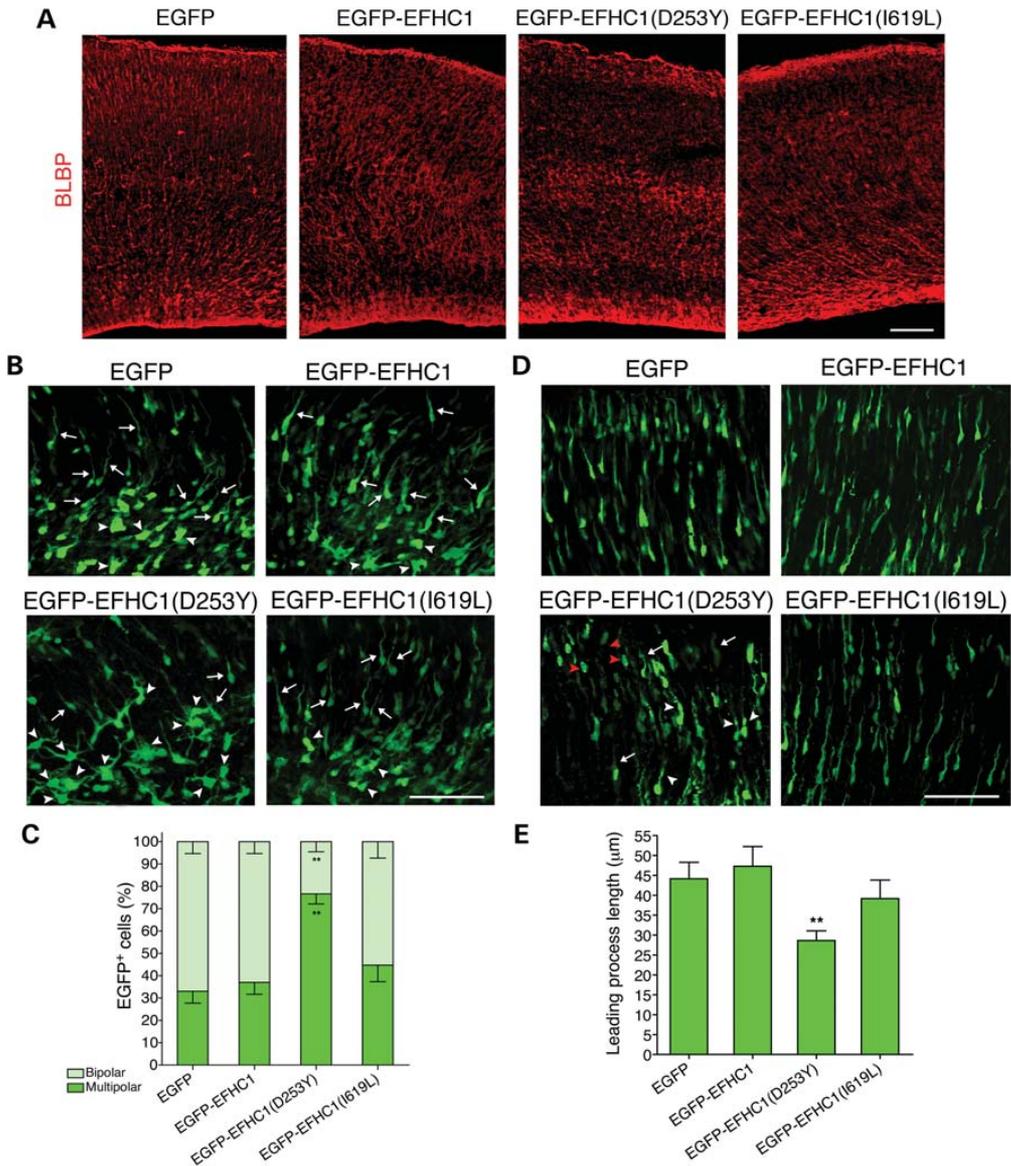
**Figure 4.** Mutants EFHC1 do not influence proliferation and cell cycle exit of cortical progenitors. (A) Immunolabeling for PHH3 (red), a mitotic marker, of VZ/SVZ cells in brains 2 days after *in utero* electroporation at E14.5 with EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1(D253Y) or EGFP-EFHC1(I619L) (green). (B) Quantification of the mitotic index under different above conditions. (C) Immunolabeling for BrdU (red) and Ki67 (blue), of VZ/SVZ cells in cortices 2 days after *in utero* electroporation at E14.5 with EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1(D253Y) or EGFP-EFHC1(I619L) (green). (D) Quantification of the cell cycle exit index in the different above conditions. Scale bars represent 50  $\mu$ m. Error bars show SEM.

mutants (26). In the latter suggestion, JME is considered as a ‘ciliopathy’. However, it is difficult to reconcile seizures, much less the establishment of epileptogenesis, resulting from a ‘ciliopathy’. In complement to the above-hypothesized functions of EFHC1, our research group has demonstrated that EFHC1 is a MAP that plays a role in cell division and radial migration during neocortical development (12,13). In a recent report, our results were confirmed when the *Drosophila* homolog of EFHC1 (*Defhc1.1*) was also shown to be a MAP (27). Furthermore, *Defhc1.1* knockout flies displayed overgrowth of dendritic arbor, whereas overexpressing *Defhc1.1* shows reduced dendrite elaboration (27). Taken together, these *in vitro* and *in vivo* experiments demonstrate that EFHC1 probably controls brain development by finely tuning microtubule cytoskeleton dynamics.

In our present study, we analyzed the impact of four pathological mutations (D210N, R221H, F229L and D253Y) and two coding polymorphisms (R159W and I619L) on the properties of EFHC1 at cellular level and during the development of the cerebral cortex. In HEK293 and stably transfected HEK

Flp-In T-Rex-293 cells, we showed that all mutated and polymorphic forms of EFHC1 presented the same subcellular localization of the wild-type protein, with an association with the centrosome and the mitotic spindle. These results are not surprising since mutations and polymorphisms are located outside the microtubule-binding domain of EFHC1, i.e. the first 45 amino acids of the N-terminus (13). However, we observed that mutant proteins increased the number of abnormal mitotic spindles such as monopolar spindles and congression abnormalities. Similar results have been obtained by overexpression of EGFP-N45, a dominant-negative construct containing only the microtubule-binding domain of EFHC1 (13). These data suggest that mutant proteins seem to perturb functions of endogenous EFHC1 through dominant-negative effects.

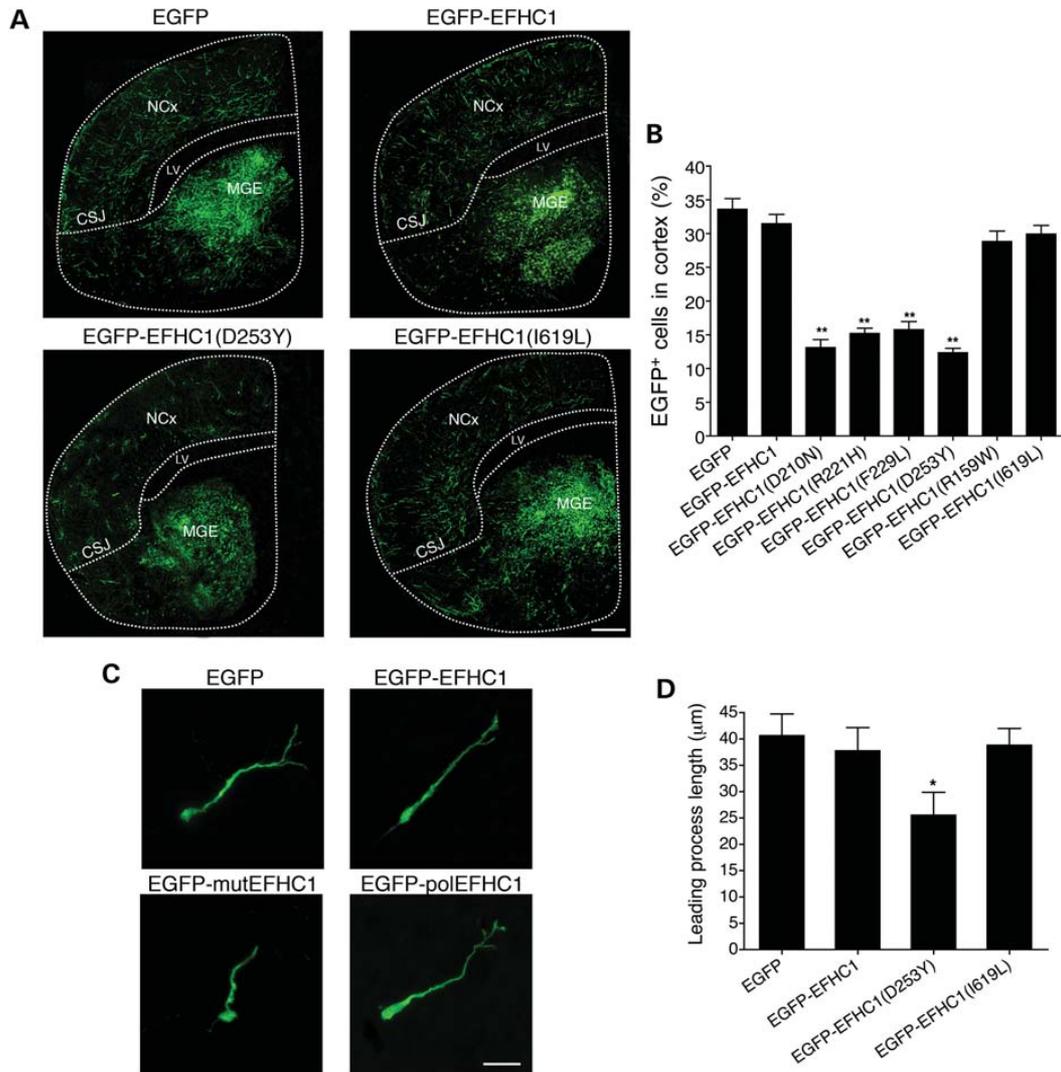
In the developing NCx, we demonstrated that acute expression of mutants EFHC1 disrupts both radial and tangential migration in a dominant-negative manner by affecting the different steps of corticogenesis: (i) the extension of radial glia processes, (ii) the transition from the multipolar to



**Figure 5.** Mutants EFHC1 affect the morphology of radial glia and radially migrating cells. (A) Immunolabeling for BLBP (red), a marker for radial glia, in cortices 3 days after *in utero* electroporation at E14.5 with EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1(D253Y) or EGFP-EFHC1(I619L). EGFP-EFHC1(D253Y) panel shows a disruption of radial glia scaffold. (B) Morphology of cells in the IZ of brains 3 days after *in utero* electroporation at E14.5 with EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1(D253Y) or EGFP-EFHC1(I619L) (green). Many cells expressing EGFP, EGFP-EFHC1 or EGFP-EFHC1(I619L) are bipolar (arrows), whereas most EGFP-EFHC1(D253Y) transfected cells remained with a multipolar morphology (arrow heads). (C) Quantification of bipolar and multipolar cells within the IZ under different above conditions. (D) Morphology of cells in the CP of brains 3 days after *in utero* electroporation at E14.5 with EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1(D253Y) or EGFP-EFHC1(I619L) (green). Cells electroporated with EGFP, EGFP-EFHC1 or EGFP-EFHC1(I619L) present long leading processes, though EGFP-EFHC1(D253Y) transfected cells display abnormal leading processes: short and twisted (white arrows), harboring several bulges (white arrow heads), round-shaped cell lacking a leading process (red arrow heads). (E) Quantification of leading processes length of migrating cells within the CP under different above conditions. Scale bars represent 100 μm. Error bars show SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

bipolar stage within the IZ and (iii) the formation of leading processes of radially and tangentially migrating cells. These distinct phases of migrations imply cell shape remodeling, which largely depend on dynamic rearrangements of

microtubules (16,28–30). Several MAPs and proteins localized at the centrosome, such as Lis1 and Dcx, are direct regulators of the microtubule dynamics underlying these morphological changes and are essential for cortical



**Figure 6.** Expression of mutants EFHC1 interferes with tangential migration of interneurons. (A) Distribution of EGFP-positive cells in coronal brain slices 3 days after focal electroporation at E17 of EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1(D253Y) or EGFP-EFHC1(I619L) (green). EGFP-EFHC1(D253Y) and EGFP-EFHC1(I619L) images are representative of mutants and polymorphisms, respectively. EGFP-EFHC1(D253Y) panel shows tangential migration defect in the cortex. Scale bar represents 200  $\mu\text{m}$ . (B) Quantification of EGFP-positive cells in the cortex 3 days after focal electroporation at E17 under different above conditions. (C) Morphology of migrating interneurons in brain slices 3 days after focal electroporation at E17 of EGFP, EGFP-EFHC1, EGFP-EFHC1(D253Y) or EGFP-EFHC1(I619L) (green). Most EGFP-EFHC1(D253Y) expressing cells appear with a short and twisted leading process. Scale bar represents 20  $\mu\text{m}$ . (D) Quantification of leading processes length of migrating cells within the cortex under different above conditions. Error bars show SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

development (19,31,32). EFHC1, as a MAP, is implicated in the same cellular pathways that regulate morphological changes necessary for different steps of neuronal migration. These new results presented here strengthen the hypothesis that EFHC1 plays a role in microtubule dynamics as previously suggested (13,27). The range of defects that we observed in neuronal migration is consistent with multiple important roles for EFHC1 in cortical histogenesis. Obviously, the precise mechanisms how EFHC1 is involved in radial and tangential migrations remain to be determined.

In a previous study, we have shown that RNAi or dominant-negative loss of EFHC1 function leads to an alteration of radial migration with an accumulation of progenitor cells in the VZ/SVZ following mitosis and cell cycle exit defects (13). Our present results are slightly different as we did not observe any default in proliferation and cell cycle exit of cortical progenitors in the presence of mutants EFHC1. Cells were capable to exit the VZ/SVZ and to migrate into the IZ and CP, whereas some of them accumulated in the IZ. We observed the same discrepancy in HEK293 where effects on

cell division were lower with mutations when compared with RNAi or dominant-negative construct. This paradox could be explained by a dose-dependent effect on EFHC1 impairment where a more severe reduction in EFHC1 function was induced by RNAi or dominant-negative construct compared with mutated proteins. Therefore, mutants EFHC1 seem to have mild dominant-negative effects, which would be fully consistent with our present data. The same observation has been made with DISC1, a MAP implicated in schizophrenia, where DISC1 RNAi induced a more pronounced failure of radial migration than did the addition of a carboxy-terminal-truncated mutant of DISC1 that function in a dominant-negative manner (33). Moreover, one has to consider differences in methodologies (*ex vivo* electroporation versus *in utero* electroporation) (34) and species (rat versus mouse) (35) used in both the studies.

To date, several quantitative neuroimaging studies have revealed multiple subtle structural abnormalities in JME brains such as an increase in cortical grey matter in mesial frontal lobes and an atrophy of the hippocampus, the thalamus and the corpus callosum (36–39). Moreover, post-mortem analysis of brains from JME patients has identified the presence of microscopic malformations called ‘microdysgenesis’, characterized by the presence of cortical and subcortical dysplastic neurons (11). These may be indicative of areas of subtle cortical folding abnormality related to early disruption of cortical development. Appropriate neuronal positioning is essential for normal neocortical function. Several studies have shown that there is a connection between altered neuronal positioning and establishment of epileptogenesis (32,40,41). Moreover, subtle alterations in neuron position and/or function have been reported to contribute to disorders such as dyslexia, schizophrenia or mental retardation (33,42). This suggests that JME could be a neurodevelopmental disorder that may result from defects in neuronal integration.

All results obtained in our present work suggest that mutations of EFHC1 act as dominant-negative inducing the loss of protein functions during development with dual effects on the clinical phenotype depending on the mode of transmission. This functional dominant-negative effect seems to be relatively mild when JME patients carry one copy of an EFHC1 mutation, e.g. heterozygous transmitted as an autosomal dominant trait. The levels of a heterozygous mutant EFHC1 in JME patients are unknown, but may well be relatively low, producing myoclonias grand mal convulsions and absences easily controlled by antiepileptic drugs like valproate or levetiracetam. So, it is eminently reasonable to suggest that partial impairment of EFHC1 function may be responsible for the subtle ‘microdysgenesis’ in JME brains. Moreover, one has to consider the presence of EFHC2, the paralog of EFHC1, which could functionally compensate the absence of EFHC1 resulting in JME patients whose cognitive functions are normal (43). Therefore, we hypothesize that heterozygous mutations of EFHC1 might lead to subtle deficits in the number, composition or positioning of glutamatergic and GABAergic neurons in the cortex, which could explain the observed microdysgenesis, normal cognitive functions and hyperexcitability in JME patients. A more severe drug-intractable epilepsy with delay in psychomotor development, brain pathology and death in infancy could also be

explained when two copies of EFHC1 mutations, e.g. homozygous mutations transmitted as an autosomal recessive trait, are present in EFHC1. Our results on the consequences of EFHC1 mutations linked to the adolescent JME phenotype and the severe intractable epilepsy of infancy emphasizes the important and vital functions of EFHC1 in brain development, improves our understanding of disease mechanisms in epilepsy and hopefully leads to improved diagnosis, safer drugs and curative therapies.

## MATERIALS AND METHODS

### Expression constructs

Point mutations were introduced in hEFHC1 by using the QuickChange site-directed mutagenesis method on the parent vectors pcDNA5/FRT/TO-EGFP-hEFHC1 or pCAGGS-EGFP-hEFHC1 (13). All constructs were verified by sequencing (Genotranscriptomics Platform, GIGA, University of Liege). The sequences of the mutagenic primers are available upon request. Plasmid solutions were prepared using the EndoFree plasmid purification kit (Qiagen).

### Cell culture and transfections

HEK293 cells were maintained in Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Greiner bio-one). Cells were grown at 37°C in a humidified incubator under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Stably transfected HEK Flp-In T-Rex-293 cells were generated and cultured as previously described (12). Cells were transfected using FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche) according to the manufacturer’s protocol.

### Animals

Time-pregnant Wistar rats (E17) and NMRI mice (E14.5) were provided by the animal facility of the University of Liege. They were treated according to the guidelines of Belgian Ministry of Agriculture in agreement with European community laboratory Animal Care and Use regulations.

### *In utero* electroporation

*In utero* electroporation was performed as described previously (44). Briefly, E14.5 timed-pregnant mice were deeply anesthetized with isoflurane in oxygen carrier (Abbot Laboratories Ltd). Uterine horns were exposed through a 1.5 cm incision in the ventral peritoneum and 1–3 µl of plasmid solution (2.5 µg/µl) with 0.05% Fast Green (Sigma) were injected through the uterus into the lateral ventricles of embryos using a pulled glass micropipette and a microinjector (Femtojet, Eppendorf). Electroporation was accomplished by discharging five electrical pulses at 35 V (50 ms duration) across the uterine wall at 1 s intervals using 5 mm platinum tweezers electrodes (CUY650P5, Sonidel) and a square wave electroporator (ECM-830, BTX). Uterine horns were replaced in the abdominal cavity and the abdomen wall and skin were sutured using the surgical needle and thread. Buprenorphine was injected (Temgesic<sup>®</sup>, Schering-Plough) and the animals

were warmed on heating pads until they woke up. At different times following the surgery, pregnant mice were sacrificed and embryos were processed for tissue analyses.

### Focal electroporation of the MGE on organotypic brain slices

E17 time-pregnant rat were sacrificed by decapitation and embryos were removed from the uterus. Embryonic brains were dissected in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) containing 0.25 mM glucose (PBS/glucose). Brains were embedded in 3% low-melting agarose (37°C, Bio-Rad) in PBS and incubated on ice for 1 h. Brains were cut coronally into 300  $\mu$ m slice with a vibratome (VT1000S, Leica) and transferred onto Nucleopore track-etched membrane (0.08  $\mu$ m pore size, Whatman). Slices with their supporting membranes were placed onto a 1% low-melting agarose gel in PBS covering a Petridish square platinum plate electrode (NEPA GENE). One microliter of plasmid solution (2.5  $\mu$ g/ $\mu$ l) with 0.05% Fast Green (Sigma) was injected into the MGE region of the brain slice using a pulled glass micropipette and a microinjector (Femtojet, Eppendorf). An agarose column was punched with a glass Pasteur pipette from a 1% (w/v) low-melting agarose gel in PBS and attached to a cover square platinum plate electrode (NEPA GENE). After adding one drop of PBS to the injected MGE region, the column was placed onto this region and square electric pulses (100 V, 10 ms) were passed five times with an interval of 1 s using an electroporator (ECM 830, BTX). The electroporated slices on their membranes were transferred into wells containing Neurobasal medium (Invitrogen) supplemented with 2% B27 (Gibco), 1% N2 (Gibco), 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen) and 1% glutamine (Invitrogen). Slices were cultured for 3 days under semidry conditions in an incubator at 37°C and with 5% CO<sub>2</sub>.

### Tissue processing

Embryonic brains were dissected in PBS/glucose and fixed in 4% paraformaldehyde for 1 h at 4°C. Cultured brain slices were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min at 4°C. Fixed samples were cryoprotected in 20% sucrose in PBS overnight at 4°C, embedded in Neg 50 frozen section medium (Thermo Scientific) and cut coronally at 20  $\mu$ m onto slides (Superfrost Plus, Thermo Scientific) with a cryostat (HM 560 M, Microm).

### Immunostaining procedures

For immunostaining, we used the following primary antibodies: mouse monoclonal antibody to  $\alpha$ -tubulin (clone B-5-2-1, Sigma, 1:2000), mouse monoclonal antibody to  $\gamma$ -tubulin (clone GTU-88, Sigma, 1:500), rabbit polyclonal antibody GFP (Molecular probe, 1:2000), mouse monoclonal antibody to  $\beta$ III-tubulin (Tuj-1, Covance, 1:1000), rabbit polyclonal antibody to BLBP (Chemicon, 1:500), rabbit monoclonal antibody to phospho-Histone H3 (PHH3, clone JY325, Upstate, 1:500), rat monoclonal antibody to BrdU (clone BU1/75, AbD serotec, 1:200) or mouse monoclonal antibody to Ki67 (clone B56, BD Pharmingen, 1:50). For secondary

antibodies, we used RRX-, FITC- or Cy5-conjugated antibodies to rabbit, mouse or rat IgG (Jackson ImmunoResearch, 1:500).

For immunocytochemistry, cells were grown on glass coverslips coated with polyornithine (0.1 mg/ml, Sigma) for 1 h at room temperature and laminin (5  $\mu$ g/ml, MP Biomedicals) for 2 h at 37°C. Cells were fixed in methanol for 6 min at -20°C or in 4% paraformaldehyde for 20 min at 4°C and rinsed three times in PBS. Cells were subsequently incubated in blocking solution (0.1% Triton X-100, 1.5% nonfat dried milk in PBS) for 1 h at 37°C. They were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in blocking solution, washed three times with PBS before incubation with secondary antibodies in blocking solution for 1 h at room temperature. After three washes in PBS, coverslips were mounted in Vectashield Hard Set Mounting Medium with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Vector laboratories). Images were captured with an Olympus Fluoview FV1000 confocal system equipped with an Olympus IX81 inverted microscope (Olympus) (Imaging and Flow Cytometry Platform, GIGA, University of Liège). Images were processed using Photoshop software (Adobe Systems).

For immunohistochemistry, cryostat sections were washed one time with PBS and incubated 1 h at room temperature in blocking solution [0.1% Triton X-100, 10% normal goat serum (Jackson ImmunoResearch) in PBS]. For BrdU immunostaining, sections were pretreated with 2 N HCl for 30 min at 37°C followed by neutralization in Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> for 15 min at 37°C before blocking. For Ki67 immunostaining, slices were pretreated with Target Retrieval Solution (Dako) for 20 min at 95°C before blocking. Slides were incubated overnight at 4°C with primary antibodies in blocking solution. After three washes in PBS, sections were incubated with secondary antibodies at room temperature in blocking solution. Slides were washed again with PBS and mounted in Vectashield Hard Set Mounting Medium with DAPI. Images were captured using an Olympus Fluoview FV1000 confocal system equipped with an Olympus IX81 inverted microscope (Olympus) (Imaging and Flow Cytometry Platform, GIGA, University of Liège).

### Quantitative analysis

For quantification of abnormal spindles on HEK293 and HEK Flp-In T-Rex-293, cells were counted 48 h after transfection or doxycycline induction, respectively, in three independent experiments (500 cells were randomly counted in each experiment).

For quantification of neuronal migration 3 days after *in utero* electroporation, different subregions (VZ/SVZ, IZ and CP) of the cerebral cortex were identified on the basis of cell density visualized with DAPI nuclear staining and neuronal marker ( $\beta$ -III-tubulin) expression staining. The number of EGFP-positive cells in different cortical subregions was counted in two adjacent sections from six to eight independent brains.

For quantification of the mitotic index, cryosections were stained with anti-PHH3 antibody 48 h after *in utero* electroporation. The number of EGFP-positive and EGFP- and PHH3-double-positive cells in the VZ/SVZ was counted in two adjacent sections from six to eight independent brains.

The mitotic index of EGFP-transfected cells was determined as the ratio of EGFP-positive mitotic cells (EGFP<sup>+</sup> and PHH3<sup>+</sup>) to the total EGFP-positive population in the VZ/SVZ.

For cell cycle exit studies, mother mice were injected with BrdU (50 mg/g body weight) 24 h after *in utero* electroporation. Brains were fixed and stained with antibodies to GFP, Ki67 and BrdU 24 h after the BrdU pulse. EGFP and BrdU double-positive and EGFP, BrdU and Ki67 triple-positive cells in the VZ/SVZ cells were counted in two adjacent slices from six to eight independent embryos. The cell cycle exit index corresponds to the percentage of EGFP-positive cells that exited the cell cycle (EGFP<sup>+</sup>, BrdU<sup>+</sup> and Ki67<sup>-</sup>) to total EGFP-labeled cells that incorporated BrdU (EGFP<sup>+</sup> and BrdU<sup>+</sup>).

For quantification of tangential migration 3 days after focal electroporation, each brain slice was divided into two regions, i.e. the NCx and the striatum/MGE by drawing a line at the CSJ. The number of EGFP-positive cells in the two regions was counted in two slices from six to eight independent brains.

### Statistical analyses

All experiments and quantifications were performed blind. Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism software. All values are presented as mean  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Dunnett's *post-hoc* test for multiple comparisons. Differences between the groups were considered significant for  $P < 0.05$ . Asterisks indicate the level of significance: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ .

### SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank S. Ormenese and G. Moraes from the GIGA-Imaging and Flow Cytometry Platform of the University of Liège for support with confocal microscopy and V. Dhennin from the GIGA-Genotranscriptomics Platform for the sequencing of constructs.

*Conflict of Interest statement.* None declared.

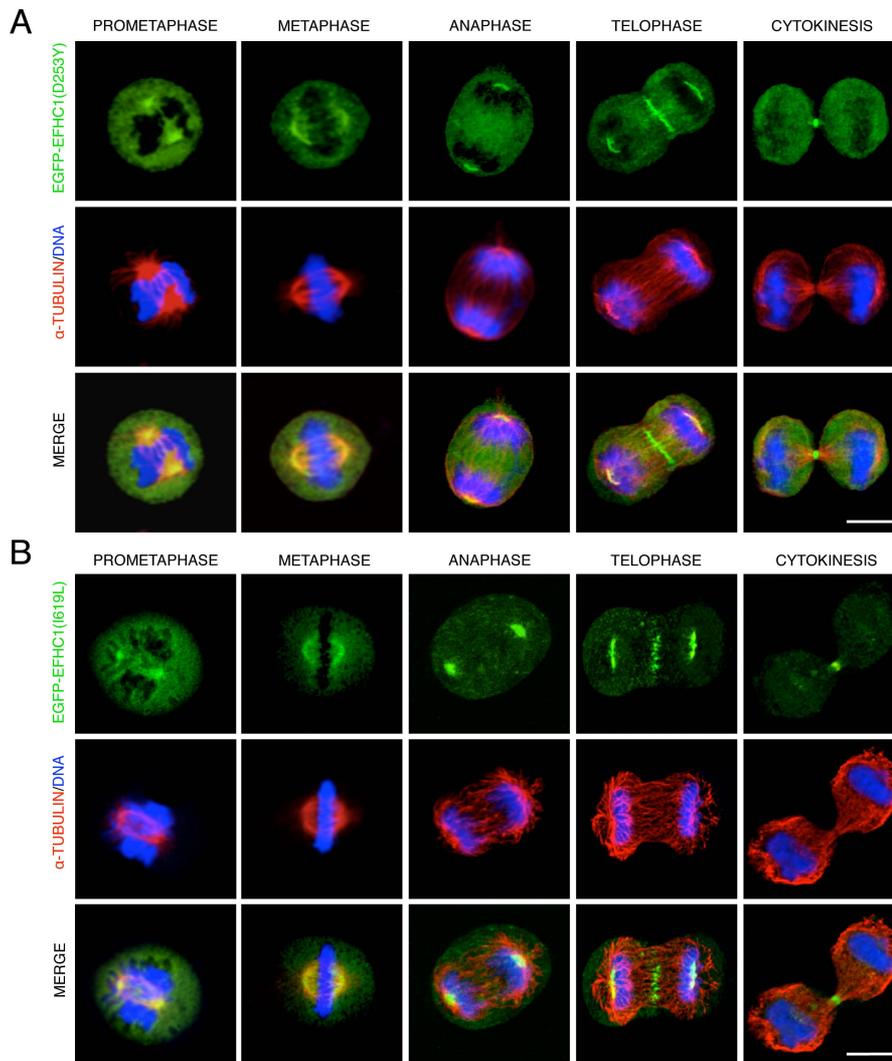
### FUNDING

This work was supported by the Fonds de la Recherche Scientifique-FNRS (FRSM 3.4531.09 to T.G. and B.L.); the Léon Fredericq Foundation (to L.d.N.) and the Fonds spéciaux of the University of Liège (C-10/31 and C-11/94 to T.G. and B.L.). L.d.N. and B.L. are, respectively, postdoctoral researcher and research associates at the Fonds de la Recherche Scientifique-FNRS. A.V.D.-E. is supported by NIH grant 5R01NS055057 and VA Merit Review grant.

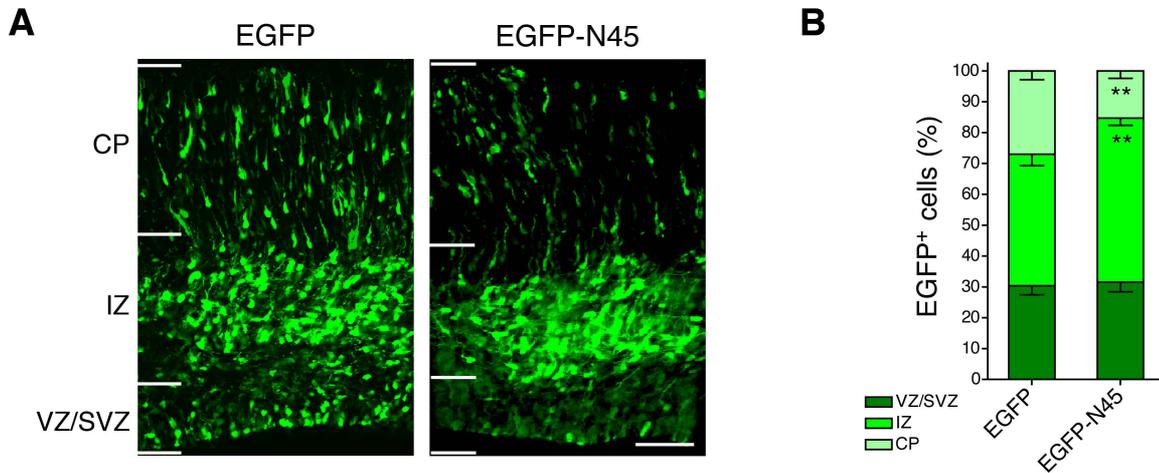
### REFERENCES

- Delgado-Escueta, A.V. and Enrile-Bacsal, F. (1984) Juvenile myoclonic epilepsy of Janz. *Neurology*, **34**, 285–294.
- Delgado-Escueta, A.V. (2007) Advances in genetics of juvenile myoclonic epilepsies. *Epilepsy Curr.*, **7**, 61–67.
- Noebels, J.L., Avoli, M., Rogawski, M.A., Olsen, R.W. and Delgado-Escueta, A.V. (2012) The next decade of research in the basic mechanisms of the epilepsies. In Noebels, J.L., Avoli, M., Rogawski, M.A., Olsen, R.W. and Delgado-Escueta, A.V. (eds), *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*, Oxford University Press, pp. 3–11.
- Suzuki, T., Delgado-Escueta, A.V., Aguan, K., Alonso, M.E., Shi, J., Hara, Y., Nishida, M., Numata, T., Medina, M.T., Takeuchi, T. *et al.* (2004) Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy. *Nat. Genet.*, **36**, 842–849.
- Ma, S., Blair, M.A., Abou-Khalil, B., Lagrange, A.H., Gurnett, C.A. and Hedera, P. (2006) Mutations in the GABRA1 and EFHC1 genes are rare in familial juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsy Res.*, **71**, 129–134.
- Stogmann, E., Lichtner, P., Baumgartner, C., Bonelli, S., Assem-Hilger, E., Leutmezer, F., Schmied, M., Hotzy, C., Strom, T.M., Meitinger, T. *et al.* (2006) Idiopathic generalized epilepsy phenotypes associated with different EFHC1 mutations. *Neurology*, **67**, 2029–2031.
- Annesi, F., Gambardella, A., Michelucci, R., Bianchi, A., Marini, C., Canevini, M.P., Capovilla, G., Elia, M., Buti, D., Chifari, R. *et al.* (2007) Mutational analysis of EFHC1 gene in Italian families with juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsia*, **48**, 1686–1690.
- Medina, M.T., Suzuki, T., Alonso, M.E., Duron, R.M., Martinez-Juarez, I.E., Bailey, J.N., Bai, D., Inoue, Y., Yoshimura, I., Kaneko, S. *et al.* (2008) Novel mutations in myoclonin1/EFHC1 in sporadic and familial juvenile myoclonic epilepsy. *Neurology*, **70**, 2137–2144.
- Jara-Prado, A., Martinez-Juarez, I.E., Ochoa, A., Gonzalez, V.M., Fernandez-Gonzalez-Aragon Mdel, C., Lopez-Ruiz, M., Medina, M.T., Bailey, J.N., Delgado-Escueta, A.V. and Alonso, M.E. (2012) Novel Myoclonin1/EFHC1 mutations in Mexican patients with juvenile myoclonic epilepsy. *Seizure*, **21**, 550–554.
- Berger, I., Dor, T., Halvardson, J., Edvardson, S., Shaag, A., Feuk, L. and Elpeleg, O. (2012) Intractable epilepsy of infancy due to homozygous mutation in the EFHC1 gene. *Epilepsia*, **58**, 1436–1440.
- Meencke, H.J. and Janz, D. (1984) Neuropathological findings in primary generalized epilepsy: a study of eight cases. *Epilepsia*, **25**, 8–21.
- de Nijs, L., Lakaye, B., Coumans, B., Leon, C., Ikeda, T., Delgado-Escueta, A.V., Grisar, T. and Chanas, G. (2006) EFHC1, a protein mutated in juvenile myoclonic epilepsy, associates with the mitotic spindle through its N-terminus. *Exp. Cell Res.*, **312**, 2872–2879.
- de Nijs, L., Leon, C., Nguyen, L., Loturco, J.J., Delgado-Escueta, A.V., Grisar, T. and Lakaye, B. (2009) EFHC1 interacts with microtubules to regulate cell division and cortical development. *Nat. Neurosci.*, **12**, 1266–1274.
- Nadarajah, B. and Parnavelas, J.G. (2002) Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.*, **3**, 423–432.
- Marin, O. and Rubenstein, J.L. (2003) Cell migration in the forebrain. *Annu. Rev. Neurosci.*, **26**, 441–483.
- Kriegstein, A.R. and Noctor, S.C. (2004) Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci.*, **27**, 392–399.
- Bellion, A. and Metin, C. (2005) Early regionalisation of the neocortex and the medial ganglionic eminence. *Brain Res. Bull.*, **66**, 402–409.
- Metin, C., Vallee, R.B., Rakic, P. and Bhide, P.G. (2008) Modes and mishaps of neuronal migration in the mammalian brain. *J. Neurosci.*, **28**, 11746–11752.
- Tsai, L.H. and Gleeson, J.G. (2005) Nucleokinesis in neuronal migration. *Neuron*, **46**, 383–388.
- Bellion, A., Baudoin, J.P., Alvarez, C., Bornens, M. and Metin, 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.
- Katano, M., Numata, T., Aguan, K., Hara, Y., Kiyonaka, S., Yamamoto, S., Miki, T., Sawamura, S., Suzuki, T., Yamakawa, K. *et al.* (2012) The juvenile myoclonic epilepsy-related protein EFHC1 interacts with the redox-sensitive TRPM2 channel linked to cell death. *Cell Calcium*, **51**, 179–185.
- Ikeda, T., Ikeda, K., Enomoto, M., Park, M.K., Hirono, M. and Kamiya, R. (2005) The mouse ortholog of EFHC1 implicated in juveniles

- myoclonic epilepsy is an axonemal protein widely conserved among organisms with motile cilia and flagella. *FEBS Lett.*, **579**, 819–822.
23. Suzuki, T., Inoue, I., Yamagata, T., Morita, N., Furuichi, T. and Yamakawa, K. (2008) Sequential expression of Efhc1/myoclonin1 in choroid plexus and ependymal cell cilia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **367**, 226–233.
  24. Léon, C., de Nijs, L., Chanas, G., Delgado-Escueta, A.V., Grisar, T. and Lakaye, B. (2010) Distribution of EFHC1 or Myoclonin 1 in mouse neural structures. *Epilepsy Res.*, **88**, 196–207.
  25. King, S.M. (2006) Axonemal protofilament ribbons, DM10 domains, and the link to juvenile myoclonic epilepsy. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **63**, 245–253.
  26. Suzuki, T., Miyamoto, H., Nakahari, T., Inoue, I., Suemoto, T., Jiang, B., Hirota, Y., Itohara, S., Saido, T.C., Tsumoto, T. *et al.* (2009) Efhc1 deficiency causes spontaneous myoclonus and increased seizure susceptibility. *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 1099–1109.
  27. Rossetto, M.G., Zanarella, E., Orso, G., Scorzeto, M., Megighian, A., Kumar, V., Delgado-Escueta, A.V. and Daga, A. (2012) Defhc1.1, a homologue of the juvenile myoclonic gene EFHC1, modulates architecture and basal activity of the neuromuscular junction in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 4248–4257.
  28. Jaglin, X.H. and Chelly, J. (2009) Tubulin-related cortical dysgeneses: microtubule dysfunction underlying neuronal migration defects. *Trends Genet.*, **25**, 555–566.
  29. Ayala, R., Shu, T. and Tsai, L.H. (2007) Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell*, **128**, 29–43.
  30. Schaar, B.T. and McConnell, S.K. (2005) Cytoskeletal coordination during neuronal migration. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **102**, 13652–13657.
  31. Valiente, M. and Marin, O. (2010) Neuronal migration mechanisms in development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **20**, 68–78.
  32. LoTurco, J.J. and Bai, J. (2006) The multipolar stage and disruptions in neuronal migration. *Trends Neurosci.*, **29**, 407–413.
  33. Kamiya, A., Kubo, K., Tomoda, T., Takaki, M., Youn, R., Ozeki, Y., Sawamura, N., Park, U., Kudo, C., Okawa, M. *et al.* (2005) A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nat. Cell Biol.*, **7**, 1167–1178.
  34. Higginbotham, H., Yokota, Y. and Anton, E.S. (2011) Strategies for analyzing neuronal progenitor development and neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Cereb. Cortex*, **21**, 1465–1474.
  35. Ramos, R.L., Bai, J. and LoTurco, J.J. (2006) Heterotopia formation in rat but not mouse neocortex after RNA interference knockdown of DCX. *Cereb. Cortex*, **16**, 1323–1331.
  36. Kim, J.H., Lee, J.K., Koh, S.B., Lee, S.A., Lee, J.M., Kim, S.I. and Kang, J.K. (2007) Regional grey matter abnormalities in juvenile myoclonic epilepsy: a voxel-based morphometry study. *Neuroimage*, **37**, 1132–1137.
  37. Woermann, F.G., Free, S.L., Koeppe, M.J., Sisodiya, S.M. and Duncan, J.S. (1999) Abnormal cerebral structure in juvenile myoclonic epilepsy demonstrated with voxel-based analysis of MRI. *Brain*, **122**, 2101–2108.
  38. Tae, W.S., Hong, S.B., Joo, E.Y., Han, S.J., Cho, J.W., Seo, D.W., Lee, J.M., Kim, I.Y., Byun, H.S. and Kim, S.I. (2006) Structural brain abnormalities in juvenile myoclonic epilepsy patients: volumetry and voxel-based morphometry. *Korean J. Radiol.*, **7**, 162–172.
  39. Betting, L.E., Mory, S.B., Li, L.M., Lopes-Cendes, I., Guerreiro, M.M., Guerreiro, C.A. and Cendes, F. (2006) Voxel-based morphometry in patients with idiopathic generalized epilepsies. *Neuroimage*, **32**, 498–502.
  40. Kriegstein, A.R. (2005) Constructing circuits: neurogenesis and migration in the developing neocortex. *Epilepsia*, **46**, 15–21.
  41. Marsh, E., Fulp, C., Gomez, E., Nasrallah, I., Minarcik, J., Sudi, J., Christian, S.L., Mancini, G., Labosky, P., Dobyns, W. *et al.* (2009) Targeted loss of Arx results in a developmental epilepsy mouse model and recapitulates the human phenotype in heterozygous females. *Brain*, **132**, 1563–1576.
  42. Galaburda, A.M., LoTurco, J., Ramus, F., Fitch, R.H. and Rosen, G.D. (2006) From genes to behavior in developmental dyslexia. *Nat. Neurosci.*, **9**, 1213–1217.
  43. Young-Pearse, T.L., Bai, J., Chang, R., Zheng, J.B., LoTurco, J.J. and Selkoe, D.J. (2007) A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by *in utero* RNA interference. *J. Neurosci.*, **27**, 14459–14469.
  44. Creppe, C., Malinouskaya, L., Volvert, M.L., Gillard, M., Close, P., Malaise, O., Laguesse, S., Cornez, I., Rahmouni, S., Ormenese, S. *et al.* (2009) Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of alpha-tubulin. *Cell*, **136**, 551–564.



**Supplemental Figure 1. Mutant and polymorphic forms of EFHC1 associate with the mitotic spindle.** HEK293 cells expressing (A) EGFP-EFHC1(D253Y) or (B) EGFP-EFHC1(I619L) (green) were stained for  $\alpha$ -tubulin (red) to visualize microtubules. DNA displays in blue. EGFP-EFHC1(D253Y) and EGFP-EFHC1(I619L) images are representative of mutants and polymorphisms, respectively. Different mitotic phases are presented. Merge panels show that mutant and polymorphic EFHC1 proteins associate with the mitotic spindle poles from prophase to late telophase, with the spindle midzone from late anaphase to telophase and with the midbody during cytokinesis. Scale bars represent 20  $\mu$ m.



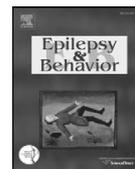
**Supplemental Figure 2. *In utero* expression of a dominant-negative form of EFHC1 disrupts radial migration.** (A) Distribution of EGFP-positive cells (green) in different cortical regions (VZ/SVZ, IZ, and CP) 3 days after *in utero* electroporation at E14.5 of EGFP or a dominant-negative form of EFHC1 (EGFP-N45). EGFP-N45 panel shows radial migration defect in the CP. Scale bar represents 100  $\mu$ m. (B) Quantification of EGFP-positive cells in different cortical regions (VZ/SVZ, IZ and CP) 3 days after *in utero* electroporation at E14.5 in the different above conditions. Error bars show s.e.m. \*\*  $p < 0.01$ .

## **Publication n°2:**

**“Juvenile myoclonic epilepsy as a possible neurodevelopmental disease: Role of EFHC1 or Myoclonin1”**

Laurence de Nijs, Nathalie Wolkoff, Thierry Grisar, Bernard Lakaye





## Review

# Juvenile myoclonic epilepsy as a possible neurodevelopmental disease: Role of EFHC1 or Myoclonin1

Laurence de Nijs, Nathalie Wolkoff, Thierry Grisar, Bernard Lakaye \*

GIGA-Neurosciences, University of Liège, Belgium

## ARTICLE INFO

## Article history:

Accepted 29 June 2012

## Keywords:

Juvenile myoclonic epilepsy  
EFHC1  
Apoptosis  
Motile cilia  
Choroid plexus  
Microtubule-associated protein  
Radial migration  
Brain development

## ABSTRACT

Juvenile Myoclonic Epilepsy (JME) accounts for almost 12% of all epilepsies and is one of the most frequent forms of genetic generalized epilepsies. Genetic studies have revealed that mutations in *EFHC1* (EF-hand containing one) account for 3 to 9% of all cases around the world. This gene encodes a protein that is not an ion channel, and several studies have tried to find its cellular role. In this article, we review the various functions that have been proposed for this protein. Interestingly, all of them could affect brain development at different steps, suggesting that the developmental assembly of neural circuits may play a prominent role in JME.

**This article is part of a supplemental special issue entitled *Juvenile Myoclonic Epilepsy: What is it Really?***

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Several heterozygous missense mutations in a gene called *EFHC1* have been identified in different unrelated families with JME probands from Belize, Los Angeles and Mexico [1]. Since then, novel missense mutations, a heterozygous nonsense mutation, a deletion/frameshift, and a deletion have been detected in various populations from Italy, Austria, Mexico, and Honduras. Nine percent of consecutive JME cases detected in families from a neurological clinic carry mutations in *EFHC1*. This represents the highest percentage of mutations found for a JME-causing gene of any population group [2].

The gene encodes a 640 amino acid protein with a molecular weight of 72 kDa, called EFHC1 or Myoclonin1. This protein contains three DM10 domains of unknown function and a single EF-hand motif, a Ca<sup>2+</sup>-binding domain (Fig. 1A). It is important to identify the physiological function of EFHC1 to understand its role in the pathophysiology of JME. Several research groups, including ours, tried to unravel the function of EFHC1 and ended up with various putative functions for this protein, which allowed us to speculate how EFHC1 mutations can cause JME.

## 2. EFHC1 is a pro-apoptotic protein

It was first proposed that EFHC1 is a pro-apoptotic protein as its overexpression in hippocampal neurons *in vitro* induced apoptotic cell

death [1]. This pro-apoptotic effect was assigned to the increased calcium currents through R-type voltage-dependent calcium channels (Ca<sub>v</sub>2.3) that were significantly reduced by any of the first five mutations associated with JME. More recently, it was demonstrated that EFHC1 potentiates the activity of TRPM2, a calcium permeable channel controlled by the cellular redox status that mediates susceptibility to cell death [3]. Together, these data suggested that EFHC1 could play a role in apoptotic mechanisms used to eliminate unwanted neurons during brain development. The decrease of apoptosis induced by EFHC1 mutations could increase the density of neurons with a precarious calcium homeostasis, leading to hyperexcitability responsible for JME [1].

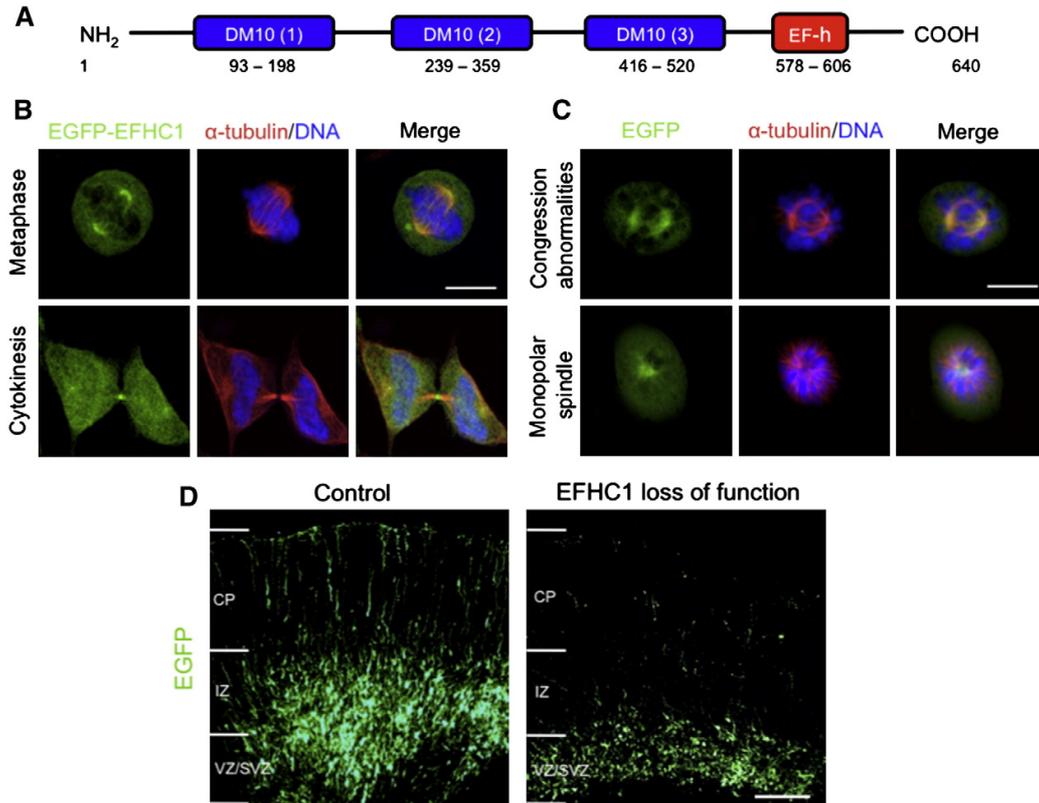
## 3. EFHC1 is a ciliary protein

In 2005, another research group pointed out that EFHC1 is orthologous to Rib72, an axonemal protein of *Chlamydomonas reinhardtii*. They demonstrated that EFHC1 is abundantly expressed in mouse tissues that have motile cilia or flagella, including the brain [4]. Later, EFHC1 was shown to be present in cilia of ependymal cells lining the cerebral ventricles [5,6]. All these results suggest that EFHC1 plays a role in the intrinsic properties of motile cilia. This was confirmed in the *EFHC1*-deficient mice as the ciliary beating frequency of ependyma cells was affected in null mutants [7].

In the adult brain, neuroblasts born in the subventricular zone migrate from the walls of the lateral ventricles to the olfactory bulb in parallel to cerebrospinal fluid (CSF) flow. The beating of ependymal cilia is required for normal CSF flow, concentration gradient formation of CSF guidance molecules, and directional migration of neuroblasts [8]. This

\* Corresponding author at: GIGA-Neurosciences, University of Liège, 1 av de l'Hôpital, B-4000 Liège, Belgium.

E-mail address: [B.Lakaye@ulg.ac.be](mailto:B.Lakaye@ulg.ac.be) (B. Lakaye).



**Fig. 1.** EFHC1 or Myoclonin1 controls cell division and early neuroblast migration during brain development. **A.** Schematic representation of the 640 amino acid protein EFHC1 containing three DM10 domains and one EF-hand (EF-h) sequence. **B.** Representation of the co-localization of EFHC1 (in green) with the mitotic spindle poles and the midbody (in red) in HEK293 cells during two stages of cell division (metaphase and cytokinesis). DNA appears in blue. **C.** EFHC1 loss of function in HEK293 cells induces mitotic spindle defects (monopolar spindle and congression abnormalities). **D.** EFHC1 impairment in the rat developing neocortex disrupts radial migration of projection neurons.

suggests that EFHC1, by controlling ependymal cell cilia beating, might have a direct effect on neuronal development.

#### 4. EFHC1 is a choroid plexus protein

It was previously reported that EFHC1 protein was dominantly expressed in choroid plexus at restricted developmental stages [5,6]. Choroid plexus is responsible for the formation of CSF by blood plasma filtration. Cerebrospinal fluid carries secreted protein such as growth factor that mediates age-dependent effects on the development and maintenance of the brain through the regulation of progenitor cell division [9]. Therefore, it is possible that mutations of EFHC1, by affecting cells of the choroid plexus, modifies the composition of the cerebrospinal fluid leading to defects in normal brain development.

#### 5. EFHC1 is a microtubule-associated protein (MAP) that plays a role in cell division and cortical development

Our laboratory previously reported that the subcellular distribution of EFHC1 in different cell lines varied during the cell cycle [10]. In interphase cells, the protein is present in the cytoplasm and nucleus, except for the nucleoli, and is particularly concentrated at the centrosome. During mitosis, EFHC1 is localized at spindle poles of the mitotic spindle and at the midbody during cytokinesis (Fig. 1B).

More recently, we demonstrated that EFHC1 interacts directly with microtubules through a new type of microtubule-binding domain

(MTBD) located at its N-terminus, and so is a MAP [11]. *In vitro*, EFHC1 loss of function induces mitotic spindle defects (Fig. 1C), confirming a role for this protein in cell division. Moreover, expression of EFHC1 transcript in the mouse brain is highest during embryogenesis, when cell division is prominent, compared with the adult brain [12]. All these results strongly suggested that EFHC1 could be involved in brain development. We, therefore, decided to investigate the role of EFHC1 during cortical development. We showed that EFHC1 impairment in the rat-developing neocortex disrupted radial migration of projection neurons (Fig. 1D) by affecting the mitosis and the cell cycle exit of cortical progenitors, the radial glia scaffold organization, and the locomotion of postmitotic neurons [11].

Thus, EFHC1 is a new MAP that is crucial for the regulation of cell division and neuronal migration during development. Accordingly, our findings suggest that microdysgenesis found in individuals suffering from JME could result from radial neuronal migration defects. During cortical maturation, these defects could lead to abnormal epileptogenic circuitry that will be responsible for JME at adolescence onset.

#### 6. The MAP Myoclonin1 is essential for the normal development and function of the neuromuscular junction synapse in *Drosophila*

Recently, one of the two *Drosophila* homologs of EFHC1, CG8959, also named *Defhc1.1*, was functionally characterized [13]. Transfected *Defhc1.1* is distributed both to the cytoplasm and to the nucleus of

resting cells, while in dividing cells, the protein is localized to the mitotic spindle. In agreement with our studies on the mammalian proteins, the investigators found that *Defhc1.1* is capable of binding to microtubules and, when overexpressed *in vivo*, it overlaps with axonal microtubules. *Defhc1.1* knockout *Drosophila* displayed normal appearance and behavior. However, the morphology of the neuromuscular junction synapse appeared aberrant, with an increase in the number of satellite boutons, structures that have been regarded as potential ramifications. In the neuromuscular junction synapse, disruption of *Defhc1.1* function leads to a decrease in the number of microtubule loops, whose presence correlates with halted bouton division, suggesting that *Defhc1.1* is a negative regulator of this process. These results suggest that *Defhc1.1* functions as an inhibitor of neurite growth by finely tuning the microtubule cytoskeleton dynamics and that EFHC1-dependent JME may result from augmented spontaneous neurotransmitter release due to overgrowth of neuronal processes [13].

## 7. Conclusion

*EFHC1* is a causative candidate gene for JME and is very interesting in several aspects. Firstly, this is the only gene that has been found mutated in several unrelated JME families all over the world, and secondly, it does not code for an ion channel protein, as is usually the case in epilepsies. This brings a new point of view to the physiopathology of JME and genetic epilepsies in general.

As reviewed in the present article, several but not necessarily mutually exclusive hypotheses can be proposed to explain the impact of *EFHC1* mutations on the physiopathology of JME. Each relates to an alteration of some brain development steps, *i.e.*, proliferation, migration, apoptosis, axon outgrowth, dendritic arborization, or connections formation. Although the brain of JME patients was usually considered as normal, it is now becoming clear, thanks to the advances in brain imaging techniques, that changes in cortical morphology occur in several brain regions [14]. Moreover, detailed postmortem pathological analysis detected microdysgenesis *i.e.* dystopic neurons and subtle abnormalities in cortical mantle of JME brains [15]. These may be indicative of areas of subtle cortical folding abnormality related to early disruption of cortical development.

Thus, besides the classical theory of channelopathies causing IGE, we posit the hypotheses that JME is a developmental disease and that mutations of *EFHC1* could induce subtle malformation of cortical development that lead to abnormal epileptogenic circuitry during cortical

maturation. This opens new perspectives in the identification of the precise molecular and cellular mechanisms of IGE, including subtle pathologies of early neuronal migration (microdysgenesis) and/or synaptogenesis. Eventually, the elucidation of such mechanisms will provide new targets for better pharmacological treatment of epilepsy.

## Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## References

- [1] Suzuki T, Delgado-Escueta AV, Aguan K, et al. Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet* 2004;36(8):842–9.
- [2] Medina MT, Suzuki T, Alonso ME, et al. Novel mutations in Myoclonin1/EFHC1 in sporadic and familial juvenile myoclonic epilepsy. *Neurology* 2008;70(22 Pt 2):2137–44.
- [3] Katano M, Numata T, Aguan K, et al. The juvenile myoclonic epilepsy-related protein EFHC1 interacts with the redox-sensitive TRPM2 channel linked to cell death. *Cell Calcium* 2012;51(2):179–85.
- [4] Ikeda T, Ikeda K, Enomoto M, Park MK, Hirano M, Kamiya R. The mouse ortholog of EFHC1 implicated in juvenile myoclonic epilepsy is an axonemal protein widely conserved among organisms with motile cilia and flagella. *FEBS Lett* 2005;579(3):819–22.
- [5] Suzuki T, Inoue I, Yamagata T, Morita N, Furuichi T, Yamakawa K. Sequential expression of Efhc1/myoclonin1 in choroid plexus and ependymal cell cilia. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;367(1):226–33.
- [6] Léon C, de Nijs L, Chanas G, Delgado-Escueta AV, Grisar T, Lakaye B. Distribution of EFHC1 or Myoclonin 1 in mouse neural structures. *Epilepsy Res* 2010;88(2–3):196–207.
- [7] Suzuki T, Miyamoto H, Nakahari T, et al. Efhc1 deficiency causes spontaneous myoclonus and increased seizure susceptibility. *Hum Mol Genet* 2009;18(6):1099–109.
- [8] Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, et al. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 2006;311(5761):629–32.
- [9] Lehtinen MK, Zappaterra MW, Chen X, et al. The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells. *Neuron* 2011;69(5):893–905.
- [10] de Nijs L, Lakaye B, Coumans B, et al. EFHC1, a protein mutated in juvenile myoclonic epilepsy, associates with the mitotic spindle through its N-terminus. *Exp Cell Res* 2006;312(15):2872–9.
- [11] de Nijs L, Léon C, Nguyen L, et al. EFHC1 interacts with microtubules to regulate cell division and cortical development. *Nat Neurosci* 2009;12(10):1266–74.
- [12] Grisar T, de Nijs L, Chanas G, et al. Some genetic and biochemical aspects of myoclonus. *Neurophysiol Clin* 2006;36(5–6):271–9.
- [13] Rossetto MG, Zanarella E, Orso G, et al. Defhc1.1, a homologue of the juvenile myoclonic gene EFHC1, modulates architecture and basal activity of the neuromuscular junction in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 2011;20(21):4248–57.
- [14] Ronan L, Alhusaini S, Scanlon C, Doherty CP, Delanty N, Fitzsimons M. Widespread cortical morphologic changes in juvenile myoclonic epilepsy: evidence from structural MRI. *Epilepsia* 2012;53(4):651–8.
- [15] Meecke HJ, Janz D. Neuropathological findings in primary generalized epilepsy: a study of eight cases. *Epilepsia* 1984;25(1):8–21.