



Rôle du microARN 146a dans le développement cérébral et pertinence pour les maladies du neurodéveloppement

Julien Fregeac

► To cite this version:

Julien Fregeac. Rôle du microARN 146a dans le développement cérébral et pertinence pour les maladies du neurodéveloppement. Génétique humaine. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT : 2018USPCB120 . tel-02517307

HAL Id: tel-02517307

<https://theses.hal.science/tel-02517307>

Submitted on 24 Mar 2020

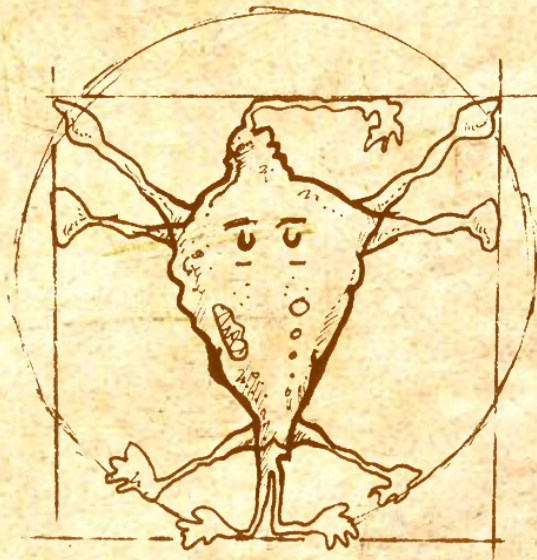
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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

MANUSCRIT DE THÈSE

*En vue de l'obtention du titre de
Docteur en Sciences du vivant de l'université Paris Descartes
Julien Fregeac*

*Rôle du microARN 146a dans le développement cérébral
et pertinence pour les maladies du neurodéveloppement*



Défense de thèse devant le jury composé de

*Docteur Alessandra Pierani
Docteur Marion Coolen
Docteur Frédéric Laumonnier
Professeur Pierre Gressens
Professeur Christophe Lefebvre
Docteur Laurence Colleaoux*

*Présidente
Rapporteuse
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse*

*Do not take life too seriously. You will
never get out of it alive.*

Elbert Hubbard

REMERCIEMENTS

À mon jury

Mes premiers remerciements vont au Dr Marion Coolen et au Dr Frédéric Laumonier pour le temps qu'ils ont pris afin d'évaluer mon manuscrit, au Pr Pierre Gressens et au Pr Christophe Lefebvre pour avoir accepté d'être mes examinateurs et au Dr Alessandra Pierani pour me faire l'honneur de présider mon jury. Enfin, je remercie l'ensemble de mon jury de m'offrir l'opportunité de discuter de mon projet de thèse avec des experts.

Au Dr Laurence Colleaux

J'aimerais adresser mes plus grands remerciements à ma directrice de thèse. J'aimerais te remercier Laurence pour m'avoir recruté et cru en moi alors même qu'on n'avait pas encore de financement de thèse, pour m'avoir encadré tout au long de ces quatre années de la meilleure des manières et encore plus pour ton soutien dans les moments difficiles de ces deux dernières années. Tu es une grande scientifique et une chef avec qui c'est un plaisir de travailler mais tu es avant tout une personne formidable. Je n'y serais jamais arrivé sans toi. Merci!

À mon équipe

Je remercie Sonny en premier. C'est grâce à toi que j'ai pu rejoindre l'équipe et tu m'as encadré et appris à être organisé, efficace et indépendant. Je voudrais ensuite dire un grand merci à Dani, mon camarade de thèse pendant toutes ces années, pour ta bonne humeur tout au long de ton parcours du combattant et malgré toutes les fois où je t'ai frustré. Je remercie également tous les autres membres de l'équipe: Karine pour avoir toutes les réponses, Nami pour rire à mes blagues, même quand il ne devrait pas, Antoine pour m'avoir supporté en tant qu'encadrant et m'avoir aidé à arriver au bout du projet, Matthieu pour les discussions improbables, les références de Kaamelott et les fous rires qu'elles ont entraîné, Ekin qui est probablement la plus gentille personne du monde,

Karthi pour avoir été mon adversaire dans la guerre du génotypage et m'avoir rappelé à quel point c'est bon d'être mauvais, Anne pour sa gentillesse et son aide dans la rédaction du manuscrit, Vincent pour avoir offert un point de vue extérieur et avisé sur mon projet, Valérie et Giulia, qu'on croise moins souvent mais que c'est toujours un plaisir de voir et enfin Maéva et Mickaël qui ont quitté le laboratoire mais qui font toujours partie de la famille. C'est vraiment un plaisir de travailler avec vous tous et j'aurai du mal à retrouver une telle ambiance à l'avenir.

Au Crédit Agricole Ile de France Mécénat

Je tiens à remercier le Crédit Agricole Ile de France Mécénat pour l'intérêt porté à mon projet et avoir accepté de financer ma thèse

Au groupe de Fabiola Terzi

J'aimerais remercier Fabiola Terzi et son groupe pour avoir accepté de partager avec nous leur modèle murin sur lequel j'ai effectué la majorité de mes travaux de thèse.

À l'Imagine Sport Association

J'ai eu le grand privilège durant mon temps à Imagine de participer à la fondation de l'Imagine Sport Association dont j'ai eu le plaisir d'être le président ces deux dernières années. J'ai trouvé cette expérience extrêmement formatrice et je tiens à remercier tous nos membres pour leur motivation sans faille. L'association n'existerait pas sans vous. J'adresse une note particulière à toutes les personnes qui ont constitué mon bureau, notamment mes deux vice présidents Diana et Dan, vous avez été formidables! J'espère avoir l'occasion un jour de travailler avec une équipe aussi agréable et efficace que vous. J'aimerais également dire un grand merci à la direction et au staff administratif de l'institut et notamment Stanislas Lyonnet, Laure Boquet, Laurent Mellier et Stéphane Paillet pour leur soutien et leur enthousiasme qui a permis à notre association de se développer.

À l'association YRII

Même si votre association est moins fun que la notre (hehe!), ça a été un plaisir de co-organiser des événements avec vous, vous apportez énormément à l'institut. J'adresse mes remerciements en particulier à Hicham et Clarisse, les dirigeants de l'association, pour leur amitié tout au long de cette folle aventure à Imagine.

À l'ensemble de l'institut Imagine

Je remercie les toutes les personnes avec qui j'ai eu l'occasion d'interagir à l'institut et notamment les gens du 3ème étage. C'est grâce à vous que travailler ici est aussi agréable.

Au BBQ gang

Un immense merci à Caro, Sarah, Dan, Dani, Pedro, Lucas, Alice, Carmen et Kenny ce groupe d'amis improbablement parfait, pour les barbecues, les ring of fire, les soirées chez Edouard, le Subway du vendredi et votre bonne humeur au quotidien tout simplement. La vie en thèse n'aurait pas été la même sans vous.

À nos collaborateurs

J'aimerais remercier Franck et Stéphanie pour l'aide scientifique et technique inestimable qu'ils ont apporté à notre projet. C'était un plaisir de collaborer avec vous.

À mes relecteurs Anne, Hicham, Aude et Stefania

Je vous remercie pour le temps que vous avez consacré à mon manuscrit et pour vos précieux conseils.

À mes amis de l'université

Nous avons été nombreux à être restés en contact après le master et partager notre quotidien de thésard n'a pu être que bénéfique. J'adresse des remerciements tout particuliers à Lisa et Ludo avec qui c'est impossible de passer de mauvais moments.

À mes amis non scientifiques

J'adresse des remerciements spéciaux à Marc et Élodie notamment qui entendent régulièrement parler de thèse et de neurones depuis tout ce temps et qui continuent à avoir envie de me voir. Un peu de normalité fait du bien dans ce monde de sciences.

À ma famille

J'aimerais remercier ma mère, Xavier et mes grands-parents qui me soutiennent depuis aussi longtemps que je me souviens ainsi que ma famille du sud Pierre, Sonia et Téo, toujours prêts à m'accueillir et qui m'appellent "Docteur" depuis déjà bien longtemps.

RÉSUMÉ

Rôle du microARN 146a dans le développement cérébral et pertinence pour les maladies du neurodéveloppement

Les maladies du neurodéveloppement (MND) regroupent des pathologies caractérisées par des troubles de la cognition, de la communication, du comportement ou du fonctionnement moteur en conséquence d'un développement cérébral atypique. Les MND incluent la déficience intellectuelle (DI), les troubles du spectre autistique (TSA), le trouble du déficit de l'attention, les troubles de l'apprentissage et les troubles moteurs. Avec une prévalence globale de 3%, les MND sont responsables de 10% des dépenses de santé dans les pays développés et constituent donc un défi médical et socioéconomique majeur. Les microARNs (miARNs) sont de petits ARNs non codant de ~20-22 nucléotides. Ils exercent une régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique en dégradant ou réprimant la traduction d'ARNs messagers spécifiques. Chaque miARN ciblant plusieurs centaines de transcrits, ils constituent des médiateurs clés de l'expression génique. Les microARNs régulent la majorité des processus biologiques et notamment le développement cérébral. Plusieurs miARNs ont d'ailleurs été associés à des pathologies neurologiques comme la maladie d'Alzheimer ou la sclérose latérale amyotrophique mais aussi à des MND telles que le TSA, la DI et l'épilepsie. Des études d'expression réalisées sur divers échantillons de patients TSA ont identifié *miR-146a* comme le miARN le plus fréquemment dérégulé. Une expression anormale de ce miARN a également été observée dans des cas de DI et d'épilepsie. Il est important de noter que moduler l'expression de *miR-146a* est suffisant pour réduire la latence, la durée et l'intensité des crises d'épilepsie induites dans des modèles rongeurs d'épilepsie télencéphalique. *miR-146a* est un régulateur connu des voies de signalisation NF κ B, Notch et Wnt/ β -caténine et a été associé à des

cas de cancers et de maladies inflammatoires mais peu de choses sont connues sur ses fonctions dans le cerveau. Des travaux *in vitro* décrivent le rôle de *miR-146a* dans la survie et l'apoptose des neurones, la croissance axonale et l'endocytose des récepteurs AMPA. Notre groupe a également montré l'effet pro-neuronal de la sur-expression de *miR-146a* dans des cellules souches neurales humaines H9. Collectivement, ces données donnent un aperçu des fonctions de *miR-146a* dans des cellules en culture mais ne fournissent que peu d'informations quant à son rôle *in vivo* au cours du neurodéveloppement. Nous avons donc caractérisé la souris *Mir146a*^{-/-} par des techniques d'imagerie, de biologie cellulaire et moléculaire ainsi que des études de comportement. Nous avons démontré que la neurogenèse est altérée dans les souris *Mir146a*^{-/-}. Au jour embryonnaire 14 (E14), les embryons mutants ont plus de progéniteurs neuraux engagés vers un destin neuronal ainsi qu'un plus grand nombre de neurones post-mitotiques dans le néocortex. Grâce à des cultures de cellules primaires, nous avons montré que l'absence de *miR-146a* cause une augmentation de la croissance dendritique ainsi qu'une altération de la recapture du glutamate par les astrocytes et nous avons prouvé que le transporteur de glutamate GLT-1 est une cible directe de *miR-146a*. Des analyses transcriptomiques sur des échantillons de cerveau à E14, P30 et P60 indiquent que la perte de *miR-146a* affecte principalement les neurones. Enfin, des analyses par IRM et des études de comportement montrent une anatomie anormale de l'hippocampe ainsi qu'une altération des capacités d'apprentissage chez les souris mutantes. Ce travail décrit une des premières caractérisations du neurodéveloppement d'un modèle murin inactivé pour un miARN. Il montre que *miR-146a* est impliqué dans le contrôle de la balance entre renouvellement des progéniteurs neuraux et différenciation neuronale. Il démontre également que plusieurs signes retrouvés chez les patients comme l'altération de la neurogenèse, l'anatomie anormale du cerveau et les défauts d'apprentissage, sont également observés chez les souris *Mir146a*^{-/-}, soulignant la pertinence de ce modèle pour l'étude des maladies du neurodéveloppement.

ABSTRACT

Role of the microRNA 146a in brain development and relevance for developmental brain disorders

Developmental brain disorders (DBD) encompass a group of diseases characterised by impairments in cognition, communication, behaviour or motor functioning as a result of atypical brain development. This group includes intellectual disability (ID), autism spectrum disorders (ASD), attention deficit hyperactivity disorder, specific learning disorder and motor disorders. With an overall prevalence of 3 %, DBD accounts for 10% of the total health care cost in Western countries and is thus a major medical and socio-economical challenge. MicroRNAs (miRNAs) are small non coding RNAs of ~20-22 nucleotides. They play a key role in post-transcriptional gene expression regulation by targeting specific messenger RNA (mRNA) for degradation or translation repression. miRNAs are key mediator of gene expression as each of them can target hundreds of transcripts. miRNAs are expressed throughout the development and life of most eukaryote organisms and regulate a wide range of biological processes including brain development. Consistently, several miRNAs have been associated with neurological pathologies such as Alzheimer's disease (AD) or amyotrophic lateral sclerosis (ALS) but also with (DBD) namely ASD, ID and epilepsy. Expression studies performed on various sources of samples from ASD patients identified *miR-146a* as the most commonly deregulated miRNA. It has been reported in four different cohorts and tissue types including post-mortem brain, olfactory mucosal stem cells, fibroblasts and lymphoblastoid cell lines. Abnormal *miR-146a* expression has also been reported in ID and epilepsy. Importantly, modulating the expression of this particular miRNA was shown to reduce the latency, the duration as well as the intensity of the induced epilepsy in rodent models of telecephalon epilepsy. *miR-146a* is a known regulator of NF κ B,

Notch and Wnt/ β -catenin pathways and has been associated with cancers and inflammatory disorders but little is known about its functions in the brain. A body of *in vitro* work describes the role of *miR-146a* in neuron survival and apoptosis, axonal growth and AMPA receptor endocytosis. Our group also showed the proneuronal effects of *miR-146a* overexpression in a H9 model of human neural stem cells. Altogether, these data provide insight into the roles of *miR-146a* in cultured cells but give no indication on its functions in vivo during neurodevelopment. To investigate this aspect further, we studied a *Mir146a*^{-/-} mouse model using a combination of imaging, molecular and cell biology techniques as well as behavioral studies. We first demonstrated that neurogenesis is altered in *Mir146a*^{-/-} mice. At embryonic day 14 (E14), mutant embryos display increased number of neural progenitors committed towards a neuronal fate as well as more post-mitotic neurons in the neocortex compared to controls. Using primary cell cultures, we found that loss of *miR-146a* causes increased neurite outgrowth and impaired astrocyte glutamate uptake capacities and we proved the glutamate transporter GLT-1 to be a direct target of *miR-146a*. Transcriptomic analyses of brain samples at E14, P30 and P60 indicated spatial- and temporal-specific effects of *Mir146a* inactivation and, consistent with our findings, we observed that loss of *miR-146a* mainly impacts neuron development. Lastly, brain MRI and behavior investigations revealed an abnormal hippocampal anatomy as well as impaired learning capacities in mutant mice. This work reports one the first characterizations of a mouse model inactivated for a miRNA in the context of neurodevelopment. We demonstrated the role of *miR-146a* in brain development and its role in the control of the balance between neural progenitor cell renewal and neuronal differentiation. Lastly, we show the relevance of the *Mir146a*^{-/-} mouse model to study DBD as several aspects recapitulate the features observed in patients, including impaired neurogenesis, abnormal brain anatomy and learning deficits.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	5
RÉSUMÉ.....	9
ABSTRACT.....	11
TABLE DES MATIÈRES.....	13
TABLE DES FIGURES.....	17
ABBREVIATIONS.....	19
INTRODUCTION.....	22
I - Les microARNs: biosynthèse et modes d'action.....	23
1 - Introduction générale.....	23
2 - La voie de biosynthèse canonique.....	25
3 - Les voies de biosynthèse non canoniques.....	27
4 - Régulation de la biogenèse des microARNs.....	28
5 - Fonctions et modes d'action des microARNs.....	29
6 - Conclusion.....	31
II - Le neurodéveloppement normal et pathologique.....	33
A - Le neurodéveloppement physiologique chez la souris.....	33
1 - Introduction générale.....	33
2 - Le développement précoce et la neurulation.....	33
3 - La régionalisation du système nerveux.....	35
4 - La neurogenèse dans le néocortex.....	36
5 - Mise en place de l'architecture corticale et migration neuronale.....	38
6 - Formation et fonctionnement de la synapse.....	40
7 - Conclusion.....	42
B - Les maladies du neurodéveloppement.....	44

1 - Introduction générale.....	44
2 - Troubles du spectre autistique: historique et définition clinique.....	44
3 - Déficience intellectuelle: historique et définition clinique.....	45
4 - Anomalies génomiques impliquées dans les maladies du neurodéveloppement.....	47
5 - Facteurs non génétiques dans les maladies du neurodéveloppement.....	50
6 - Physiopathologie des maladies du neurodéveloppement.....	52
7 - Conclusion.....	53
III - MicroARNs et neurodéveloppement.....	55
A - Les microARNs dans le neurodéveloppement physiologique.....	55
1 - Introduction générale.....	55
2 - Les profils d'expression des miARNs au cours du neurodéveloppement.....	55
3 - Les microARNs dans la neurogenèse et la migration neuronale.....	57
4 - Les microARNs dans la synaptogenèse et la neurotransmission.....	59
5 - Rôle central de <i>miR-9</i> dans le neurodéveloppement.....	60
6 - Conclusion.....	62
B - Les microARNs dans les maladies neurologiques.....	63
1 - Introduction générale.....	63
2 - Les microARNs dans les maladies neurodégénératives.....	64
3 - Les microARNs dans les maladies du neurodéveloppement.....	65
4 - Conclusion.....	68
IV - Objectifs des travaux de thèse.....	70
RÉSULTATS.....	72
I - L'émergence du rôle des microARNs dans la survenue des troubles du spectre autistique.....	73

II - Caractérisation du rôle de <i>miR-146a</i> dans le neurodéveloppement.....	90
A - Organisation génomique, régulation de l'expression et fonctions connues de <i>miR-146a</i>	90
1 - Introduction générale.....	90
2 - Régulation de l'expression de <i>miR-146a</i>	91
3 - Les voies de signalisation auxquelles <i>miR-146a</i> participe.....	92
4 - <i>miR-146a</i> dans les maladies.....	95
5 - Conclusion.....	96
B - Rôle de <i>miR-146a</i> dans la différenciation des progéniteurs neuraux humains.....	97
C - Analyse d'un modèle murin <i>Mir146a</i> ^{-/-}	115
III - Étude du rôle de <i>miR-146a</i> dans les astrocytes.....	150
A - Introduction.....	150
1 - Développement et fonctions de la lignée astrocytaire.....	150
2 - Interactions entre astrocytes et neurones: régulation des synapses et capture du glutamate.....	151
3 - <i>miR-146a</i> et astrocytes: objectifs.....	152
B - Résultats.....	153
1 - La surexpression de <i>miR-146a</i> altère la prolifération et la capture du glutamate des astrocytes.....	153
2 - Les astrocytes <i>Mir146a</i> ^{-/-} arborent un défaut de prolifération et une anomalie de leur capacité de capture de glutamate GLT-1 dépendante.....	155
C - Conclusion.....	160
DISCUSSION.....	162
1 - Bilan des travaux de thèse.....	163
2 - Comparaison des effets de la sur-expression et de l'inactivation de <i>miR-146a</i>	163
3 - Modèles à développer afin de poursuivre l'étude des fonctions de <i>miR-146a</i> dans le neurodéveloppement.....	165

4 - La perte de <i>miR-146a</i> cause un défaut transitoire prévenant la formation de circuits neuronaux fonctionnels.....	168
5 - Perspectives offertes par les analyses transcriptomiques.....	170
6 - Les miARNs dans le neurodéveloppement: implication dans les maladies et cibles thérapeutiques.....	175
7 - Sur-expression de <i>miR-146a</i> dans les maladies du neurodéveloppement: cause ou conséquence ?.....	176
 MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	179
 ANNEXE.....	183
 BIBLIOGRAPHIE.....	192

TABLe DES FIGURES

Figure 1: Voie canonique de biosynthèse des miARNs.....	26
Figure 2: Voies de biosynthèse non canoniques des miARNs.....	28
Figure 3: Modes d'action convergents des miARNs.....	31
Figure 4: Évolution de la taille du cerveau chez les primates.....	32
Figure 5: Différenciation du neuroectoderme et neurulation.....	34
Figure 6: Régionalisation du cerveau embryonnaire.....	35
Figure 7: La neurogenèse dans le néocortex.....	37
Figure 8: Formation des couches corticales et migration neuronale.....	40
Figure 9: Composition d'une synapse.....	42
Figure 10: Organisation temporelle du développement neuronal chez la souris.....	43
Figure 11: Augmentation avec le temps du nombre de publications rapportant un diagnostic de DI réalisé grâce au séquençage à haut débit.....	48
Figure 12: Répartition des différents types d'étiologies des TSA et de la DI.....	50
Figure 13: Les gènes de MND sont impliqués dans la régulation de l'expression génique et les fonctions synaptiques.....	53
Figure 14: Profils d'expression des miARNs pendant le neurodéveloppement.....	56
Figure 15: Principaux miARNs impliqués dans la différenciation neuronale et leurs cibles.....	58
Figure 16: Identification d'une signature de 4 miARNs dans les TSA.....	69
Figure 17: Locus génétique de MIR146a.....	91
Figure 18: Régulation des voies NF κ B et TGF- β par <i>miR-146a</i>	93
Figure 19: Régulation des voies β -caténine et Shh par <i>miR-146a</i>	94
Figure 20: Interactions entre les voies majeures de croissance et différenciation cellulaire et <i>miR-146a</i>	95
Figure 21: Mesure du niveau d'expression de CTNNB1 par WB.....	149

Figure 22: Défauts de prolifération et de capture du glutamate dus à la surexpression de <i>miR-146a</i>	154
Figure 23: Défaut de prolifération mais pas de migration des astrocytes <i>Mir146a</i> ^{-/-}	157
Figure 24: Défaut de capture du glutamate GLT-1-dépendante.....	158
Figure 25: GLT-1 est une cible directe de <i>miR-146a</i>	159
Figure 26: Stratégie d'insertion afin de créer une souris transgénique conditionnelle sur-exprimant <i>miR-146a</i>	167
Figure 27: La perte de <i>miR-146a</i> altère l'identité des cellules neurales.....	172
Figure 28: Étapes de maturation de la lignée oligodendrocytaire.....	174
Figure 29: Causes et conséquences de la sur-expression de <i>miR-146a</i> dans le CNS.....	178

ABRÉVIATIONS

TSA : troubles du spectre autistique

DI : déficience intellectuelle

ARNr : ARN ribosomal

ARNi : interférence ARN

ARNdb : ARN double brin

miARN : microARN

nt : nucléotide

UTR : untranslated region

ARNm : ARN messenger

Pol-II : ARN polymérase II

Pol-III : ARN polymérase III

RNase : ribonucléase

AGO : argonaute

RISC : RNA-induced silencing complex

snoARN : small nucleolar RNA

shARN : short hairpine RNA

ARNt : ARN de transfert

E# : Jour de développement embryonnaire chez la souris

P# : Jour post-natal chez la souris

BMP : bone morphogenic protein

TGF- β : transforming growth factor β

Shh : sonic hedgehog

NE : neuroepithelial cell

FB : forebrain

MB : midbrain

HB : hindbrain

FGF : fibroblast growth factor

RA : retinoic acid

Hox : homeobox

aRG : apical radial glia

IP : intermediate progenitor

VZ : ventricular zone

INM : interkinetic nuclear migration

SVZ : subventricular zone

SNC : système nerveux central

PP : préplaque

CP : cortical plate

MZ : marginal zone

SP : sous plaque

GE : ganglionic eminence

MND : maladie du neurodéveloppement

DSM : diagnostic and statistical manual of mental disorders

CNV : copy number variant

SCZ : schizophrénie

GABBR1 : récepteur GABA B1

PBMC : peripheral blood mononuclear cell

OMSC : olfactory mucosal stem cell

FT : facteur de transcription

LPS : lipopolysaccharide

AMPA : récepteur AMPA

WB : western blot

BHE : barrière hémato-encéphalique

TNF α : tumor necrosis factor α

cpm : coups par minute

PDC : L-*trans*-2,4-PDC

ARAC : cytosine- β -D arabinofuranoside

WT : wild type

kb : kilobase

VEGF : vascular endothelial growth factor

HREM : high resonance episcopic microscopy

Poly-IC : acide polyinosinique-polycytidylique

LEM : L-leucine methyl ester

INTRODUCTION

Le laboratoire du Dr Laurence Colleaux étudie les bases moléculaires et pathophysiologiques des maladies du neurodéveloppement et notamment des troubles du spectre autistique (TSA) et de la déficience intellectuelle (DI). Ces désordres affectent 3% de la population générale et représentent 10% des dépenses de santé dans les pays développés, loin devant n'importe quelle autre pathologie.

Constituant donc un enjeu majeur de santé publique, ces maladies hautement invalidantes restent néanmoins difficiles à diagnostiquer et à traiter. Afin de faire face à cette complexité et de mieux appréhender leur étiologie, notre groupe a mis en place un projet innovant consistant à étudier la dérégulation de microARNs dans les maladies du neurodéveloppement.

S'inscrivant dans la logique de l'institut Imagine, l'équipe du Dr Colleaux a pour but d'établir un diagnostic et de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents des maladies du neurodéveloppement afin de retourner vers le patient et sa famille avec des propositions d'avancées dans leur prise en charge.

I – MicroARNs: biosynthèse et modes d'action

1 - Introduction générale

La notion d'interférence avec les fonctions cellulaires par l'action d'acides nucléiques est apparue pour la première fois il y a 40 ans lorsque des oligonucléotides complémentaires à l'ARN ribosomal (ARNr) ont été utilisés afin d'inhiber l'initiation de la traduction dans la bactérie *Escherichia coli*¹. En 1984, Izant et Weintraub sont les premiers à se servir d'un ARN antisens afin d'inhiber la traduction d'une protéine spécifique, la thymidine kinase². En 1990, le premier phénomène naturel d'interférence à ARN est découvert chez les plantes où ce mécanisme, encore inexpliqué, est alors appelé "co-suppression"³.

Il faudra cependant attendre les travaux d'Andrew Fire et Craig Mello en 1988 qui

décrivent pour la première fois le mécanisme d'interférence ARN (ARNi) chez le nématode *Caenorhabditis elegans* pour comprendre le mécanisme moléculaire sous-jacent. Leurs résultats montrent que l'expression de gènes endogènes est inhibée de manière spécifique et très efficace par l'injection d'ARN double brin (ARNdb) homologue au gène ciblé, tandis que l'ARN sens ou l'ARN antisens seuls sont relativement inefficaces⁴. Peu de temps après fut montré que le mécanisme de RNAi est également fonctionnel chez la drosophile où, dans l'embryon, de l'ARNdb est capable d'inactiver des gènes et mimer des phénotypes mutants⁵. Ces travaux furent récompensés en 2006 par le Prix Nobel de physiologie et de médecine attribué à Andrew Fire et Craig Mello.

Les microARNs (miARNs) sont de petits ARNs non codant d'environ 20-22 nucléotides (nt) régulant l'expression génique de façon post-transcriptionnelle^{6,7}. Le premier miARN fut découvert en 1993 chez le ver *C. Elegans* lorsque Lee et al. ont décrit *lin-4* comme une molécule capable de réguler négativement le niveau de la protéine LIN-14 en se fixant sur la région non traduite en 3' (3'UTR) de son ARN messager (ARNm)⁸. Depuis, 2654 miARNs matures ont été découverts chez l'homme et 1978 chez la souris, en faisant les deux espèces chez lesquelles le plus de microARNs ont été identifiés (mirbase.org)⁹. Les miARNs constituent un mode de régulation majeur de l'expression des protéines comme chacun peut cibler au moins cent gènes^{10,11} et plus de la moitié des gènes humains sont prédits comme cibles d'au moins un miARN^{7,11,12}.

La proportion du génome codant a diminué au cours de l'évolution, allant de 99% dans certaines bactéries à 1-2% chez l'homme¹³. Si les archées et les bactéries possèdent des snoARNs, les miARNs ne sont apparus que chez les premiers métazoaires^{13,14}. Des miARNs matures sont exprimés dans les métazoaires unicellulaires, les plantes, les champignons et les animaux (mirbase.org) et leur nombre évolue avec la complexité de l'organisme¹⁵. Par exemple, l'alvéolé *Symbiodinium microadriaticum* ne possède que 15 miARNs matures contre 428 chez *Arabidopsis thaliana* et 1948 chez la souris (mirbase.org).

Afin de faciliter la distinction entre les gènes de miARN et les miARNs matures, la nomenclature suivante a été adoptée. Les préfixes MIR et Mir sont attribués aux gènes/loci génétiques humains et souris respectivement. Les miARNs matures sont

annotés hsa-miR-#-5p ou -3p où les trois premières lettres désignent l'espèce (hsa pour Homo sapiens et mmu pour Mus musculus), le "#" désigne le numéro du miARN et le "5p" ou "3p" désigne le brin du duplex mature après digestion par DICER (voir Fig.1). Par exemple, mes travaux de thèse sont basés sur le *mmu-miR-146a-5p* qui sera noté *miR-146a* pour plus de simplicité.

2 - La voie de biosynthèse canonique

Les gènes de miARNs sont localisés soit dans des régions non codantes soit dans les régions introniques, ou plus rarement codantes d'un gène. On parle alors de gènes hôtes^{16,17}. Ils peuvent conduire à l'expression d'un seul miARN ou d'un groupe appelé "cluster" allant jusqu'à 50 miARNs¹⁷. L'expression des miARNs est régulée par des facteurs de transcription^{7,12,18} et des facteurs épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN ou les modifications d'histones¹⁹. Les miARNs venant d'un même cluster ont souvent un profil d'expression similaire. De même, un gène de miARN hébergé dans la séquence codante d'un gène hôte est généralement exprimé de la même manière que ce gène hôte^{16,17}.

Les miARNs sont produits de différentes manières. La voie de biosynthèse principale, aussi appelée voie canonique, est décrite en Figure 1. Les ARN polymérases II ou III (Pol-II ou Pol-III) transcrivent le gène de miARN en un précurseur appelé pri-miARN contenant des structures tige-boucle. Un pré-miARN de ~70nt est ensuite créé après clivage du pri-miARN par le complexe microprocesseur composé des sous unités DROSHA et DGCR8²⁰. Si plusieurs précurseurs de miARNs sont présents sur le même transcrit, ils sont chacun traités indépendamment.

Le pré-miARN est transporté dans le cytoplasme par l'EXPORTINE 5 où la ribonucléase (RNase) DICER interagit avec la protéine TRBP afin de cliver la structure en épingle à cheveux¹². Cette digestion mène à la formation d'un duplex de deux miARNs potentiellement matures qui est ensuite dissocié. Si les deux miARNs complémentaires

persistent parfois, généralement seul un des deux est fonctionnel tandis que l'autre est dégradé¹⁷. Chaque brin fonctionnel s'associe à DICER, TRBP et aux protéines ARGONAUTE (AGO 1-4) pour former le RNA-Induced Silencing Complex (RISC)²¹.

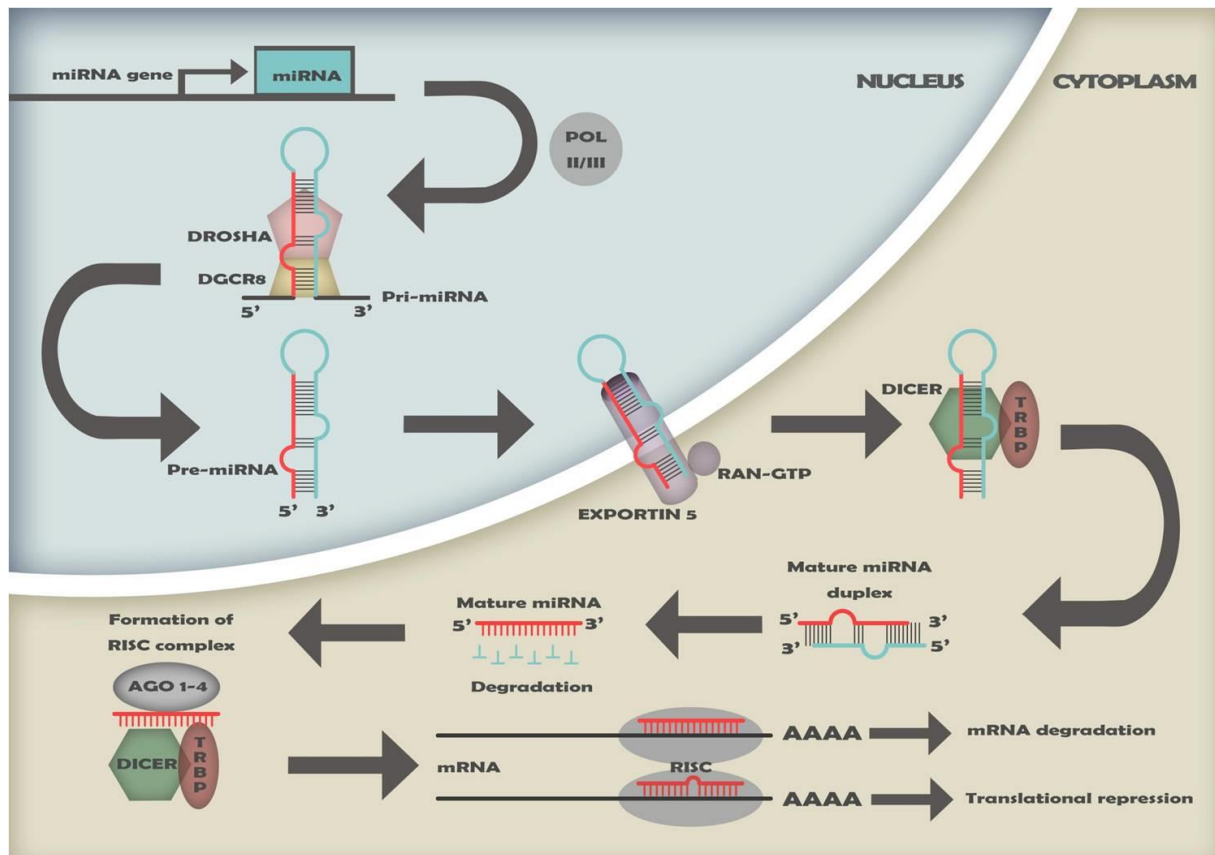


Figure 1: Voie canonique de biosynthèse des miARNs (extraite de Fregeac et al. 2016). Pol-II ou Pol-III transcrivent le gène de miARN en un pri-miARN clivé par DROSHA et DGCR8 en un pre-miARN de ~70nts. Après son transport dans le cytoplasme par l'EXPORTINE 5, le pre-miARN est clivé par DICER et TRBP, créant un duplex de miARNs matures. Généralement, un seul des deux brins est fonctionnel tandis que l'autre est dégradé. Ensuite, le miARN mature, les protéines AGO, DICER et TRBP s'associent pour former le RISC. En fonction de si la complémentarité entre le miARN et son ARNm cible est parfaite ou non, le RISC dégrade ou inhibe la traduction de l'ARNm respectivement.

3 - Les voies de biosynthèse non canoniques

Au cours des dernières années, plusieurs voies alternatives à la voie canonique ont été découvertes, décrivant notamment des voies de biosynthèse indépendantes du complexe microprocesseur ou de DICER^{7,22}. La Figure 2 décrit les principales voies non canoniques de biosynthèse de miARNs.

La voie des mirtrons fut la première décrite en 2007 chez la drosophile et *C. elegans*^{23,24}. Les mirtrons sont codés dans des introns de petite taille et produits sans l'intervention du complexe microprocesseur. Après épissage et débranchement du lasso, l'intron adopte une structure tige-boucle de type pre-miRNA. Ces pre-miARNs rejoignent alors la voie canonique en étant transporté dans le cytoplasme par l'EXPORTINE 5 et pris en charge par Dicer²⁴. Contrairement aux miARNs produits par la voie canonique, aucun mirtron n'est conservé entre vertébrés et invertébrés²². Aujourd'hui, environ 1000 mirtrons ont été identifiés chez les mammifères²⁵.

Les séquences de miARNs peuvent également être insérées dans des séquences d'ARNs non codant, comme les petits ARNs nucléolaires (snoARNs). Ce type de miARN peut être produit en suivant la voie canonique²⁶ ou indépendamment du complexe microprocesseur²⁷. Les petits ARNs en épingle à cheveux (shARNs) sont une autre source de miARNs produits sans nécessiter l'action de DROSHA ou DGCR8²⁸. Enfin, les ARNs de transfert (ARNt) constituent le dernier type d'ARN pouvant mener à la production de miARNs²⁹. La voie de synthèse à partir d'ARNt est rapportée comme la voie prévalente chez les virus^{30,31}.

Si toutes les voies non canoniques décrites jusqu'à présent peuvent se passer du complexe microprocesseur, elles nécessitent cependant la prise en charge du pre-miARN par DICER. Peu de miARNs ont été rapportés comme pouvant se passer du clivage par DICER. C'est le cas de *miR-451* dont le pri-miARN est digéré par le complexe microprocesseur mais dont le pre-miARN est directement chargé sur AGO2^{32,33} avant d'être clivé par AGO2 et PARN, une ribonucléase poly-A spécifique (Fig.2)³⁴.

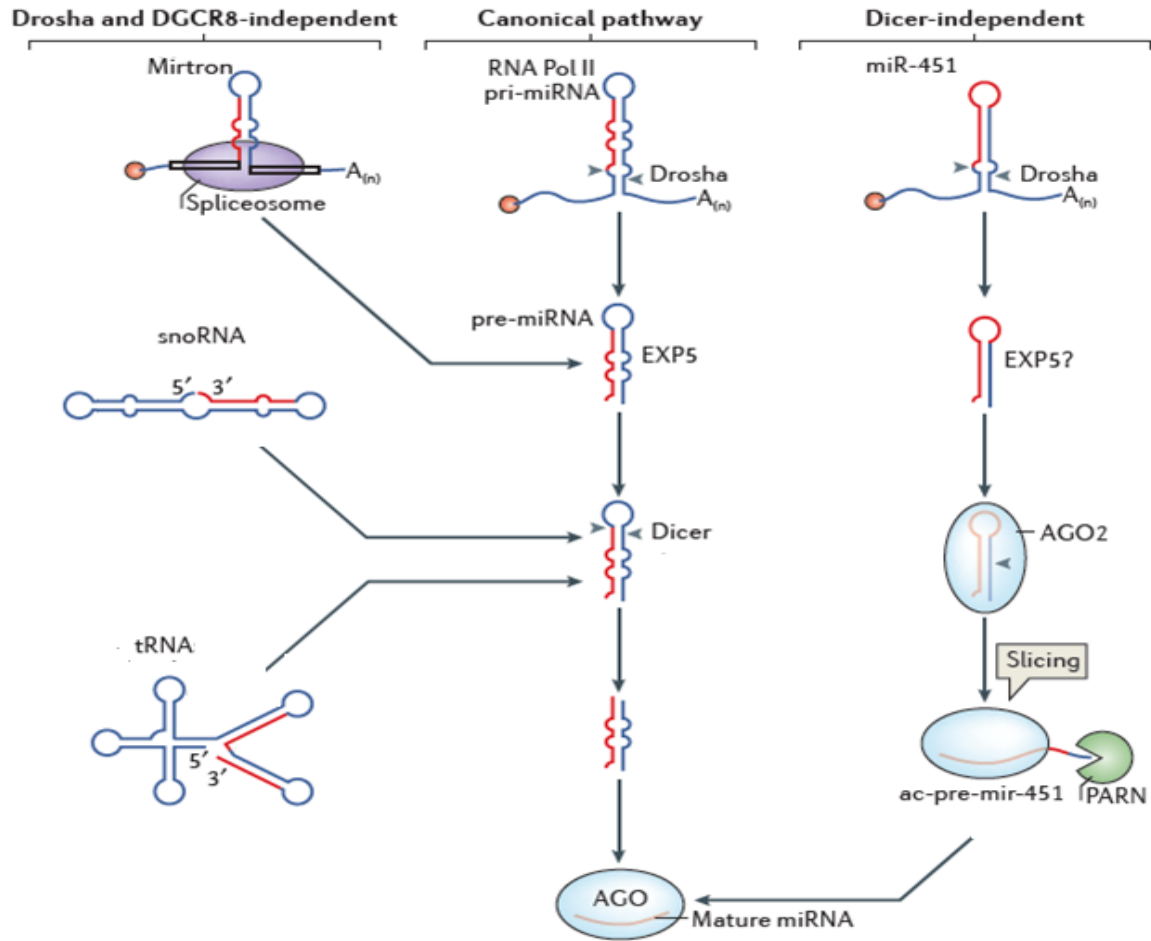


Figure 2: Voies de biosynthèse non canoniques des miARNs (modifié d'après Ha et al. 2014) Les miARNs provenant d'introns (mirtrons) ou d'ARNs non codant (snoARN ou ARNt) sont pris en charge par DICER mais ne nécessitent pas l'action de DROSHA et DGCR8. Plus rarement, certains miARNs comme *miR-451* peuvent se passer de DICER et être clivés directement par AGO2 et PARN.

4 - Régulation de la biogenèse des microARNs

Au-delà de la régulation de la transcription du pri-miARN par l'ARN polymérase II, chaque étape de biogenèse est finement contrôlée. L'activité et la localisation de DROSHA et DGCR8, les protéines formant le complexe microprocesseur, sont régulées par différentes modifications post-traductionnelles ainsi que par leurs interactions avec d'autres protéines^{35–38}. Par exemple, l'acétylation de DROSHA prévient sa dégradation³⁵

tandis que l'interaction de DGCR8 avec la forme phosphorylée de MECP2 inhibe l'activité du complexe microprocesseur³⁸. Indépendamment de ces mécanismes, des ribonucléases peuvent dégrader les miARNs immatures. C'est le cas de MCP1P-1, une endoribonucléase, dont la sur-expression conduit à la réduction de la quantité de pre-miARN sans affecter la quantité de pri-miARN³⁹.

De la même manière, les étapes de maturation se passant dans le cytoplasme dépendent de nombreux facteurs. Le miARN *let-7* a été décrit comme ciblant l'ARNm de DICER, induisant une boucle de régulation négative de la production de miARNs⁴⁰. La localisation et l'activité des protéines AGO peuvent être régulées par des événements de phosphorylation distincts^{41,42} tandis que leur interaction avec les miARNs les stabilise⁴³.

5 - Fonctions et modes d'action des microARNs

La majorité des miARNs régulent négativement la traduction des ARNm en se fixant sur leur région 3' terminale (3'UTR)^{6,8,11}. La région d'interaction entre le miRNA et l'ARNm cible ("seed" en anglais) est composée des nucléotides 2 à 8 du miARN mature⁴⁴. Cependant, de plus en plus d'exceptions sont décrites. Certains miARNs peuvent se fixer dans le 5'UTR ou la région codante⁴⁵, activer la traduction^{46,47} ou interagir avec leur ARNm cible indépendamment de la région seed⁴⁸.

En cas de complémentarité parfaite entre la seed du miARN et le site de fixation sur l'ARNm, ce dernier est directement dégradé par le RISC et plus particulièrement par l'endonucléase AGO2^{18,49}. Dans la majorité des cas cependant, les deux séquences ne sont pas entièrement complémentaires et leur appariement mène à l'inhibition de la traduction de l'ARNm cible (Fig.1). Cette inhibition se fait principalement par la déadénylation de l'ARNm et la dégradation de sa coiffe, le rendant incapable de s'associer aux ribosomes⁵⁰. Dans les deux cas, l'ARNm n'est pas traduit, menant à une réduction de la quantité de protéine pour laquelle il code.

Les miARNs sont exprimés et nécessaires dès le développement et tout au long de

la vie de la majorité des organismes^{45,51,52}. Les miARNs sont impliqués dans toutes les grandes fonctions et notamment l'apoptose⁵³, l'autophagie⁵³, la croissance cellulaire^{10,54}, la différenciation cellulaire⁵⁵ ou encore la réponse inflammatoire^{55,56}. Ils participent également à l'étiologie de nombreuses maladies. Dès 2002, des miARNs ont été incriminés dans le cancer⁵⁷ mais aussi dans les maladies cardiovasculaires⁵⁸, auto-immunes⁵⁹ ou encore neurodégénératives⁶⁰.

Chaque miARN a des fonctions qui lui sont propres et un profil d'expression spécifique à certains stades de développement, organes ou types cellulaires. La fonction de certains miARNs peut également dépendre de leur localisation dans la cellule. C'est par exemple le cas de *miR-134* qui a un rôle spécifiquement dans les dendrites des neurones¹⁷.

Bien que chaque miARN soit finement régulé, de nombreux cas d'actions en synergie afin de réguler les mêmes gènes ou fonctions cellulaires ont été décrits⁴⁵. Cela est notamment le cas durant le neurodéveloppement comme il sera discuté plus loin dans le manuscrit. Différents modèles d'actions convergentes sont proposés en Figure 3. Si plusieurs miARNs peuvent réguler le même gène (Fig.3A), il leur est également possible de cibler différents acteurs d'une même voie de signalisation (Fig.3B) ou de voies de signalisation distinctes ayant la même fonction biologique (Fig.3C).

Les miARNs et leur mode d'action (gènes/fonctions ciblés) sont souvent évolutivement conservés chez les plantes⁶¹ d'une part et les animaux¹⁴ de l'autre. Par exemple, *miR-146a*, principalement connu pour son rôle de régulateur de la voie NF κ B chez l'homme et la souris, est également un régulateur de la réponse inflammatoire chez le poisson zèbre⁶².

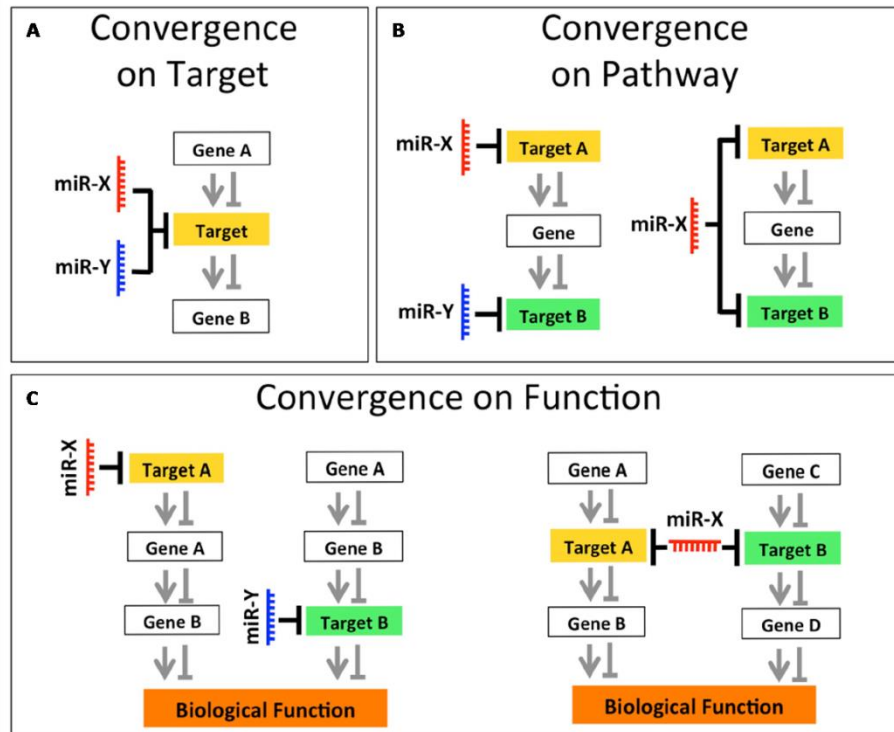


Figure 3: Modes d'action convergents des miARNs (extrait de Barca-Mayo et al. 2014). (A) Plusieurs miARNs s'apparient au même ARNm afin d'accroître son inhibition. (B) Un ou plusieurs miARNs ciblent différents gènes de la même voie de signalisation afin de moduler son activité. (C) Un ou plusieurs miARNs inhibent l'expression de protéines impliquées dans des voies distinctes ayant une fonction biologique commune.

6 - Conclusion

Quelque soit l'élément génomique codant pour un miARN (unité transcriptionnelle indépendante, autre ARN non codant ou ARNm), l'expression des miARNs est très finement contrôlée. Il n'est donc pas surprenant que le modèle souris mutant pour *Dicer* soit létal au stade embryonnaire⁶³. L'inactivation conditionnelle de *Dicer* cause également de sévères défauts dans le cerveau^{64,65} tandis que son ablation dans les muscles lisses vasculaires est létal⁶⁶. Ces observations soulignent l'importance des miARNs dans toutes les fonctions de l'organisme. Inversement, la dérégulation d'un seul miARN peut causer des défauts d'expression de plusieurs centaines de gènes et être en partie responsable de l'apparition de certaines maladies.

Les miARNs produits par les différentes voies non canoniques représentent une proportion importante des miARNs matures. De plus, ils ont un rôle très proche des

miARNs "classiques", même s'il est parfois possible de fonctionnellement distinguer les différentes sous classes. Par exemple, des miARNs non canoniques ont été spécifiquement associés à des pathologies telles que le psoriasis⁶⁷ ou le diabète⁶⁸. Il est important de noter que, si une partie non négligeable des miARNs matures peut-être produite indépendamment du complexe microprocesseur, le modèle murin inactivé pour *Dgcr8* est également létal²², indiquant un besoin de l'ensemble du réseau de miARNs pour assurer la survie de l'organisme. Il est également possible que la quantité de miARNs pouvant se passer du complexe microprocesseur ou de DICER soit encore-sous estimée.

Le nombre de miARNs chez un organisme est inversement corrélé à la proportion de son génome codant¹³. La majorité du génome codant est conservé et pourtant de grandes différences existent dans l'anatomie et le fonctionnement du cerveau entre l'homme et les grands singes (Fig.4). L'évolution des miARNs peut en revanche être beaucoup plus rapide que celle des gènes codant pour des protéines¹³. Les miARNs, et les ARNs non codant en général, ont donc été proposés comme ayant un rôle majeur dans la rapide évolution de la taille et de la complexité du cerveau chez les primates^{13,69}.

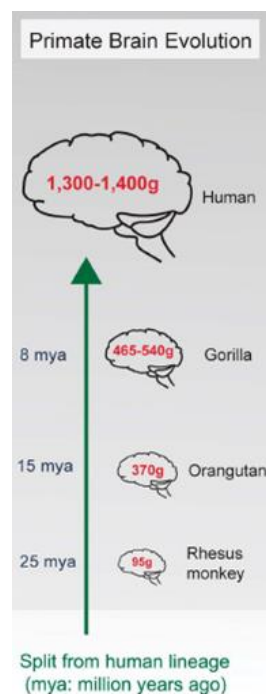


Figure 4: Évolution de la taille du cerveau chez les primates (modifié d'après Barry et al. 2014).

II – Le neurodéveloppement normal et pathologique

A - Le neurodéveloppement physiologique chez la souris

1 - Introduction générale

Le développement du cerveau chez les mammifères fait intervenir une succession de mécanismes complexes permettant d'assurer séquentiellement les étapes de neurulation, de régionalisation, de développement du cortex puis de la synaptogenèse. L'ensemble de ces processus s'étale sur une grande période de temps. Ainsi, chez la souris, la neurulation, la différenciation de l'ectoderme en deux feuillets distincts, l'ectoderme de surface et le neuroectoderme, débute au jour embryonnaire 7.5 (E7.5)⁷⁰. Par la suite, différents processus s'enchainent afin de former l'ébauche du système nerveux durant le reste de la vie embryonnaire et les premiers jours de vie, le cerveau n'atteignant 95% de sa taille finale qu'au moment du sevrage, soit 21 jours après la naissance (P21)⁷¹. Dans cette partie, je ne traiterai que des principales étapes en me focalisant sur les points pertinents pour la suite du manuscrit.

2 - Le développement précoce et la neurulation

L'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme constituent les trois feuillets embryonnaires précoces donnant naissance à tous les types cellulaires de l'organisme adulte. À l'issue de la gastrulation, la première ébauche de système nerveux se forme via un processus dit de neurulation. Les Bone Morphogenic Proteins (BMP) et NODAL font partie de la superfamille du facteur transformant β (TGF- β) et constituent les principaux effecteurs du développement neural précoce⁷². À E7.5, la présence de NODAL induit la

spécialisation de l'ectoderme et la perte de son potentiel endoderme/mésoderme. BMP4 promeut ensuite la différenciation en ectoderme de surface, qui deviendra plus tard la peau, tandis que l'inhibition de BMP4 par NOGGIN conduit à la formation du neuroectoderme (Fig.5A).

Ensuite, le neuroectoderme s'aplatit et s'épaissit afin de constituer la plaque neurale. La crête neurale, constituée de cellules multipotentes dont la majorité des neurones et cellules gliales du système nerveux périphérique sont issus, se forme à chacune des extrémités de la plaque neurale⁷³. Une elongation et convergence des cellules de la plaque neurale sont médiées par la voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh), activée dans la notochorde, et les protéines BMP, exprimées dans la crête neurale. De tels signaux induisant l'organisation des tissus sont appelés morphogènes. Ces comportements cellulaires créent une invagination avec un bourrelet neural à chaque bord se refermant progressivement afin de former le tube neural (Fig.5B)⁷⁴⁻⁷⁶. La fermeture du tube neural s'initie à E8.5 dans la région joignant le cerveau aux cervicales et se poursuit jusqu'à E10.5 dans la région la plus caudale de la moelle épinière^{75,76}. Les cellules neuroépithéliales (NE), dérivées du tube neural, constituent la première population de progéniteurs neuraux et induisent le début de la neurogenèse, un processus menant à la naissance des neurones et se déroulant entre E11 et E17⁷⁷⁻⁷⁹.

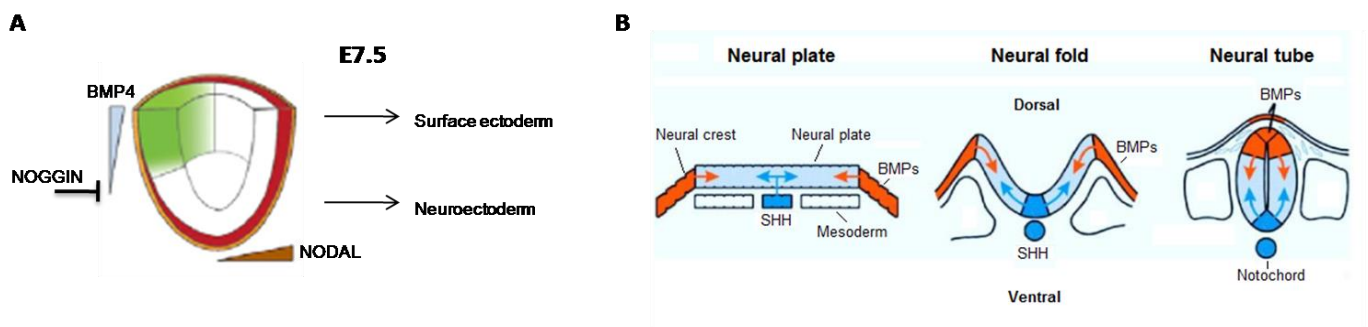


Figure 5: Différenciation du neuroectoderme (modifié d'après Li et al. 2013) et neurulation (modifié d'après un cours de l'université de l'Utah). (A) L'ectoderme se différencie de l'endoderme et du mésoderme suite à l'expression de NODAL. BMP4 induit ensuite la production d'ectoderme de surface tandis que son inhibition par NOGGIN permet au neuroectoderme de se former. (B) En réponse à la voie Shh en position ventrale et aux BMPs dans la crête neurale, la plaque neurale s'invagine et se referme afin de donner naissance au tube neural.

3 - La régionalisation du système nerveux

La neurulation constitue la première étape de régionalisation du système nerveux en établissant un axe dorso-ventral après invagination (Fig.5B) et un axe rostro-caudal en propageant la formation du tube neural vers le cerveau embryonnaire d'une part et le long de la moelle épinière d'autre part. Quatre régions principales se distinguent ensuite le long de l'axe rostro-caudal: le prosencéphale (forebrain ou FB en anglais) contenant notamment le néocortex, le mésencéphale (midbrain ou MB en anglais) dont seront issus la substantia nigra et le tectum entre autres, le rhombencéphale (hindbrain ou HB en anglais) qui deviendra la moelle allongée, le pont et le cervelet et la moelle épinière⁸⁰.

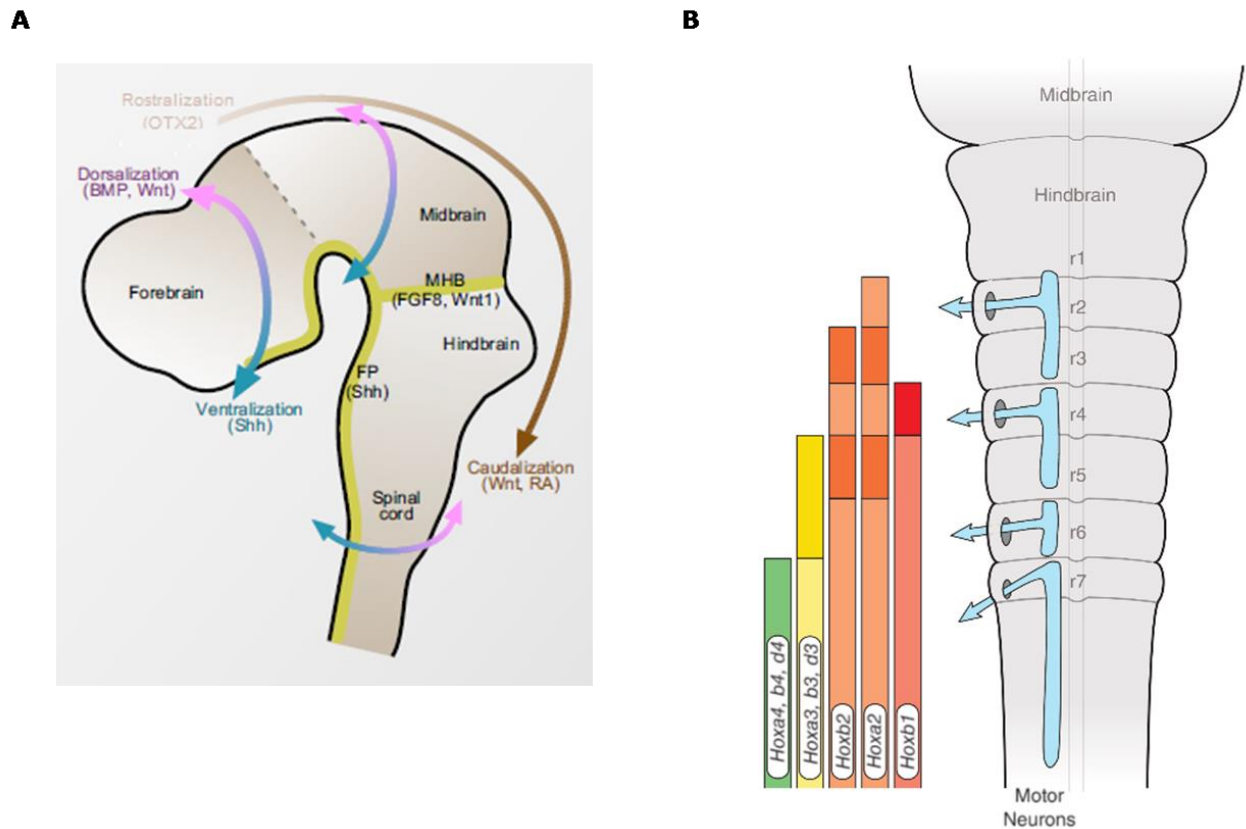


Figure 6: Régionalisation du cerveau embryonnaire (modifié depuis Suzuki et al. 2015 et Parker et al. 2017). (A) Représentation de la régionalisation du FB, du MB, du HB et de la moelle épinière selon les axes dorso-ventral et rostro-caudal en réponse aux morphogènes. (B) Régulation de la formation des rhombomères et de leur innervation par l'expression des gènes Hox. Le gradient de couleur pour chaque gène est proportionnel à son niveau d'expression.

Durant le processus de régionalisation, la voie Shh et les BMPs continuent à promouvoir un destin ventral et dorsal respectivement mais ne constituent pas les seuls morphogènes impliqués. L'activation de la voie Wnt induit une dorsalisation de la même manière que les BMPs mais également une caudalisation. La voie Wnt, en concomitance avec le facteur de croissance de fibroblastes 8 (fibroblasts growth factor 8 ou FGF8 en anglais), est également nécessaire pour la séparation du MB et du HB⁸⁰. OTX2, un facteur de transcription, est l'acteur majeur de la régionalisation rostrale du cerveau embryonnaire, la délétion du gène *Otx2* induisant une absence totale du FB et du MB⁸¹. L'acide rétinoïque (Retinoic acid ou RA en anglais), une molécule synthétisée à partir du rétinol, induit quant à lui un destin caudal⁸⁰. De plus, beaucoup de ces morphogènes sont antagonistes. Notamment, les voies Wnt et Shh s'inhibent mutuellement⁸² tandis que le RA réprime l'expression d'OTX2⁸¹. La Figure 6A résume l'action des principaux morphogènes lors de la régionalisation du cerveau murin.

Les gènes Hox (de l'anglais "homeobox") codent des facteurs de transcription responsables du développement des membres et de la colonne vertébrale notamment⁸³ et la dérégulation d'un seul de ces gènes peut causer des défauts morphologiques majeurs⁸⁴. Il existe 39 gènes Hox chez l'homme et la souris répartis en quatre clusters HOXA-D. Lors du neurodéveloppement, le HB se segmente en 7 parties appelées rhombomères sous le contrôle des gènes Hox. Le gradient d'expression des gènes Hox régule également l'innervation des neurones nés dans le HB (Fig6B)⁸⁵.

4 - La neurogenèse dans le néocortex

Dans le néocortex des mammifères, la neurogenèse est un mécanisme dynamique et finement régulé assurant la différenciation de plusieurs types de progéniteurs en neurones⁸⁶. Deux types principaux de progéniteurs neuronaux coexistent dans le néocortex de souris: les cellules de la glie radiaire apicale (apical radial glia ou aRG en anglais) et les progéniteurs intermédiaires (intermediate progenitors ou IP en anglais)^{87,88}.

Les aRG sont issues des cellules NE^{89,90} et sont localisées dans la zone

ventriculaire (ventricular zone ou VZ en anglais). Le noyau des aRG exécute le processus de migration nucléaire intercinétique (interkinetic nuclear migration ou INM en anglais): une migration de haut en bas le long de l'axe apico-basal dépendante de leur phase du cycle cellulaire. Les aRG ont leur position la plus basale, près de la zone subventriculaire (subventricular zone ou SVZ en anglais), en phase S tandis que leur mitose se déroule à la surface apicale de la VZ (Fig.7)^{88,91}. Bien qu'un groupe d'aRG non différenciés soit maintenu par division symétrique tout au long de la neurogenèse pour assurer la production de cellules gliales plus tard pendant le neurodéveloppement^{89,90,92,93}, la mitose des aRG peut également être asymétrique, donnant naissance soit à un neurone différencié soit à un IP⁸⁶.

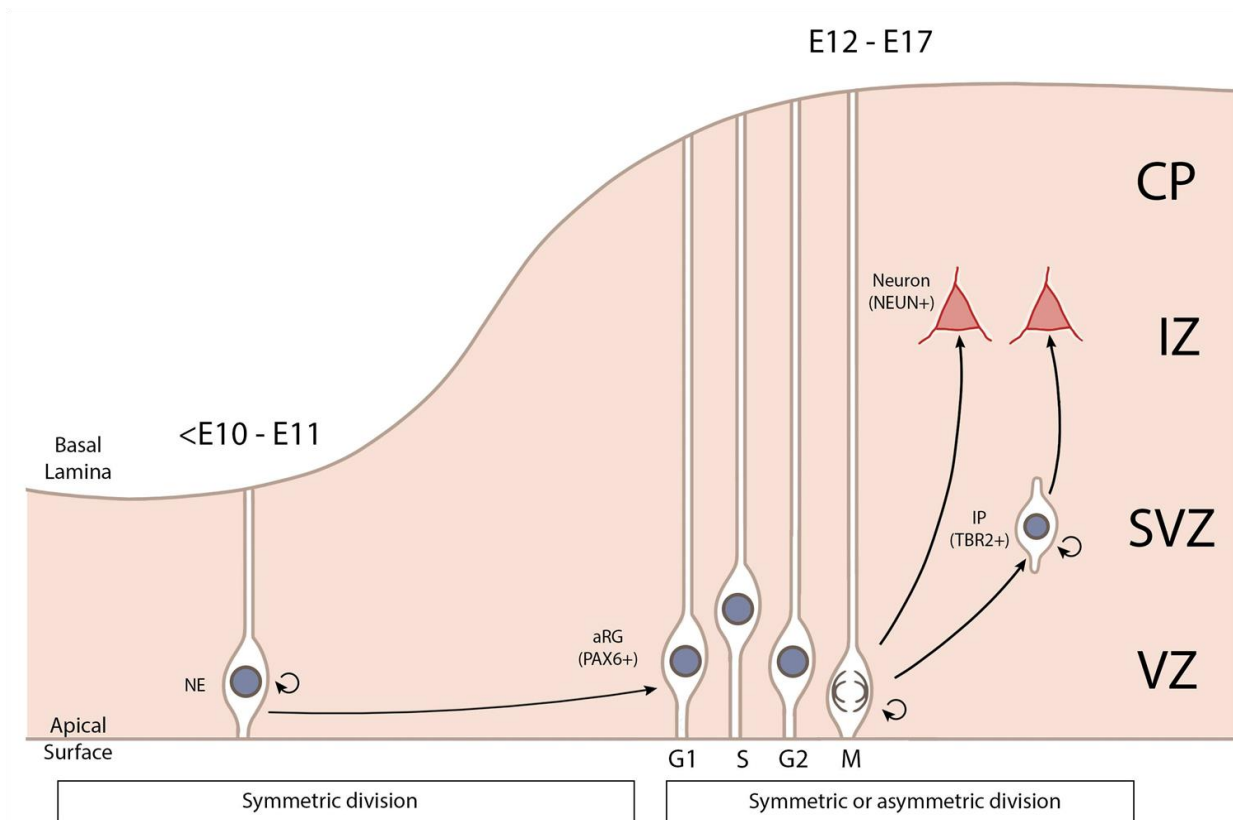


Figure 7: La neurogenèse dans le néocortex (extrait de Fregeac et al. 2018, soumis). Les NE se différencient en aRG entre E10 et E11. Les aRG, exprimant PAX6 et effectuant l'INM dans la VZ, peuvent effectuer une division symétrique afin de renouveler la population ou asymétrique en donnant naissance soit à un neurone soit à un IP. Les IP expriment TBR2 et restent dans la SVZ. Ils se différencient en neurones après un ou deux cycles cellulaires. Une fois différenciés, les neurones migrent vers la plaque corticale afin d'acquérir leur position et identité finales.

Les IP ne sont pas attachés à la surface apicale et ne font pas l'INM. Ils restent et se divisent dans la SVZ^{87,88,94}. Contrairement aux aRG, les IP ne donnent naissance qu'à des neurones et ne sont pas maintenus en tant que progéniteurs; ils se différencient après un cycle cellulaire ou deux au plus^{86,87}. Il est également possible de distinguer les deux types cellulaires par leur profil d'expression, les marqueurs les plus communément utilisés étant PAX6 pour les aRG et TBR2 pour les IP (Fig.7)⁸⁷. Après leur différenciation, les neurones migrent basalement vers leur position finale, acquièrent leur identité neuronale et expriment des marqueurs post-mitotiques tels que NEUN.

La progression et la sortie du cycle cellulaire doivent donc être finement coordonnées afin de générer un système nerveux central (SNC) fonctionnel. De nombreux régulateurs transcriptionnels et voies de signalisation sont impliqués dans la régulation de l'équilibre entre prolifération et différenciation des progéniteurs neuraux. Les voies Notch et NF κ B induisent l'expansion des aRG et inhibent la différenciation neuronale^{95,96}. De plus, elles semblent agir de façon concomitante puisque la signalisation NF κ B induit l'expression de TBR2 et la différenciation en IP des aRG quand la voie Notch est éteinte⁹⁵. La voie Shh régule de nombreux aspects de la prolifération et de la différenciation des cellules souches neurales tout au long de la neurogenèse⁸² tandis que la voie Wnt/ β -catenin favorise la prolifération des aRG lors de la corticogenèse précoce⁹⁷ mais induit la différenciation neuronale par la suite⁹⁸.

5 - Mise en place de l'architecture corticale et migration neuronale

Le cortex mature de souris est composé de 6 couches numérotées de 1 (zone la plus superficielle, proche du crâne) à 6 (zone la plus profonde, proche du corps calleux) (Fig.8a). Les premiers neurones, principalement des neurones de Cajal-Retzius, se différencient à E10.5 et migrent vers la position la plus basale du neocortex appelée la préplaque (PP)⁴⁵. La plaque corticale (cortical plate ou CP en anglais) se forme lorsque les premiers neurones de projection, nés à E11.5, atteignent la PP⁹⁹. Suite à l'arrivée de cette première vague de neurones, la PP se fracture en deux parties venant entourer la CP: la

zone marginale (marginal zone ou MZ en anglais) au-dessus et la sous-plaque (SP) en dessous (Fig8a). La CP s'étend ensuite progressivement au cours de la neurogenèse afin de former les couches 2 à 6 du cortex mature entre la MZ, qui deviendra la couche 1, et la SP^{100,101}.

Au moment de sa sortie du cycle cellulaire, le neurone nouvellement formé s'attache à un aRG qui lui sert de guide dans sa migration vers la CP¹⁰¹⁻¹⁰³. Cependant, peu de neurones migrent directement après leur différenciation. Dans la majorité des cas, la migration des neurones issus des aRG comporte plusieurs étapes. Le jeune neurone commence par migrer vers la SVZ où il reste immobile entre 24 et 36h avant d'étendre des extensions vers la VZ et de se déplacer vers la surface apicale. Ce n'est qu'après avoir été en contact avec la VZ qu'ils changent de polarité et initient leur migration finale¹⁰³. La majorité des neurones issus des IP, qui sont déjà dans la SVZ au moment de leur différenciation, effectuent également ce mouvement rétrograde vers la VZ avant de migrer vers la CP¹⁰³. Une fois sa destination atteinte, le neurone se détache du prolongement de l'aRG auquel il s'était fixé et acquiert son identité de neurone mature¹⁰⁴. Les neurones de la MZ et de la SP sont les premiers à acquérir leur morphologie mature et à former des synapses. Ils contribuent également à la migration et la synaptogenèse des neurones de la CP^{100,105}. Par la suite, le jour de naissance des neurones détermine la couche corticale dans laquelle ils migrent, les couches les plus profondes étant les premières à être peuplées. Par exemple, les neurones se différenciant à E12.5 intègrent la couche 6 tandis qu'un neurone né à E14.5 migre en couche 4 (Fig.8B)¹⁰⁶. Les neurones se différenciant aux stades plus tardifs de la neurogenèse doivent donc migrer à travers les couches de neurones matures afin d'atteindre leur destination finale.

La migration neuronale décrite dans cette section correspond au mécanisme spécifique des neurones de projection glutamatergiques du télencéphale dorsal qui représentent 75 à 85% de tous les neurones corticaux⁴⁵. Les 15-25% de neurones restant correspondent aux interneurones GABA-ergiques nés dans les éminences ganglionnaires (ganglionic eminence ou GE en anglais) du télencéphale ventral avant de migrer latéralement jusqu'au télencéphale dorsal, d'interagir avec les aRG et de migrer le long de l'axe apico-basal vers la VZ ou la CP (Fig.8C)¹⁰⁷.

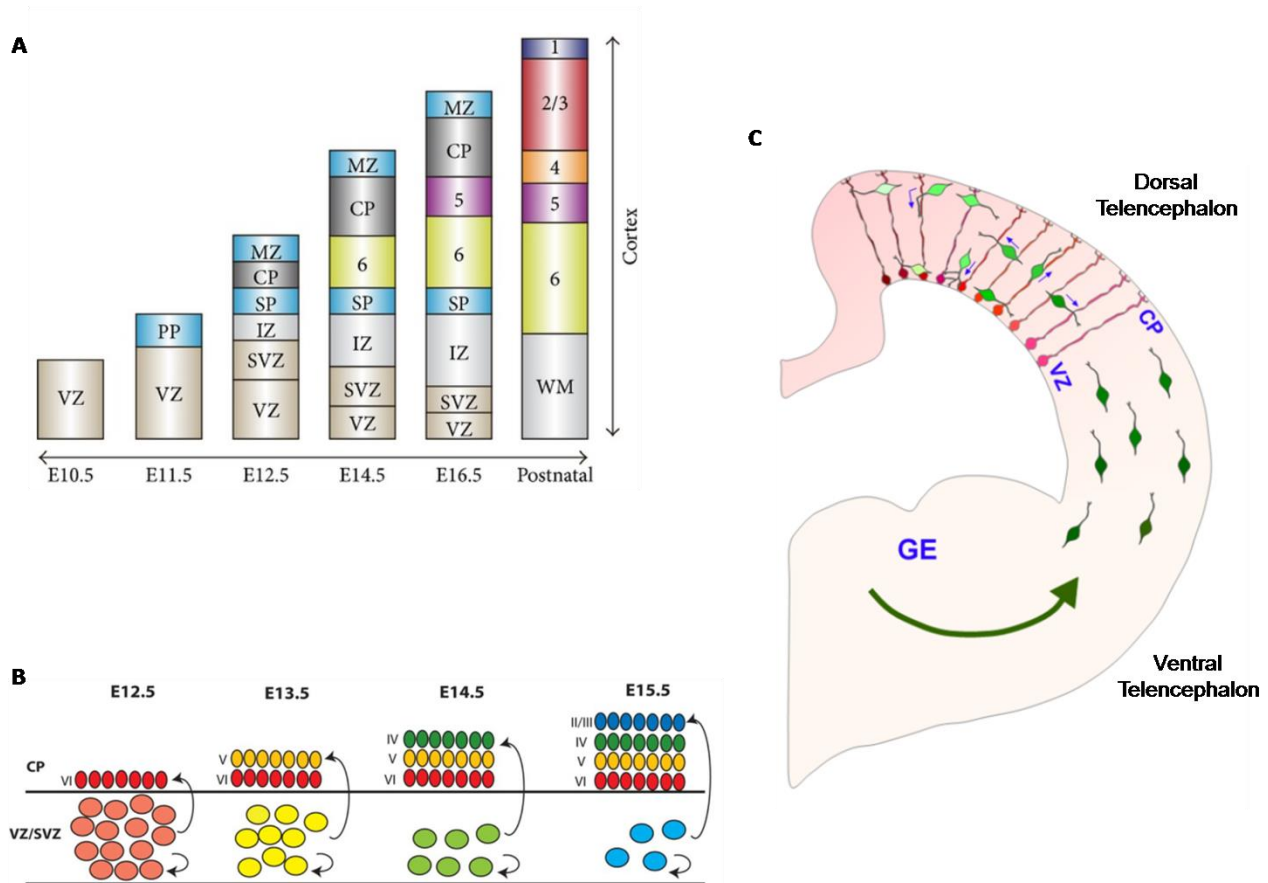


Figure 8: Formation des couches corticales et migration neuronale (modifié depuis Sakayori et al. 2013, Rodriguez et al. 2012 et Yokota et al. 2007). (A) Les premiers neurones formés migrent afin de former la PP. L'arrivée des premiers neurones de projection crée la CP, séparant la PP en deux parties: la MZ et la SP. Les couches corticales les plus profondes se forment ensuite en premier tandis que les couches superficielles n'apparaissent qu'à la fin de la neurogenèse. (B) Modélisation de la migration neuronale. Les premiers neurones à se différencier migrent dans les couches les plus profondes, forçant les neurones des couches plus superficielles à migrer au travers des neurones préexistants. (C) Les interneurones se différencient dans les GE avant de migrer longitudinalement jusqu'au neocortex puis selon l'axe apico-basal afin de prendre leur place dans les couches corticales.

6 - Formation et fonctionnement de la synapse

La formation d'un réseau neuronal fonctionnel dépend de l'établissement de nombreuses connexions synaptiques appropriées, un processus appelé synaptogenèse. Si les neurones étendent des projections peu de temps après leur différenciation, les premières synapses ne se forment qu'après la naissance¹⁰⁸. Les neurones commencent par développer des expansions cytoplasmiques: les neurites. Ces prolongements se

répartissent en deux classes: l'axone (un seul par neurone) et les dendrites. Dans la phase précoce du développement, axones et dendrites se confondent, puis ces prolongements se différencient en de nombreuses dendrites (réception de l'information) et un unique axone (propagation de l'information).

La guidance axonale est le mécanisme permettant la progression dirigée de l'axone vers sa cible. Il est médié par des gradients de molécules sécrétées telles que les nétrines ou par contact physique avec d'autres cellules¹⁰⁹. Lorsque des axones partagent la même origine spatiale et sont guidés vers la même destination, ils s'associent physiquement pour former des groupes d'axones appelés fascicules comme c'est le cas dans le corps calleux. À la fin du processus de guidance axonale, une synapse se forme à la jonction de l'axone avec les dendrites issues d'un autre neurone. Ainsi, la neurotransmission s'établit et le second neurone reçoit des informations du premier sous forme de stimuli électriques et chimiques¹⁰⁹.

Cependant, le bon fonctionnement d'une synapse nécessite plus que le contact entre deux neurones; les cellules gliales jouent également un rôle important (Fig.9). Les astrocytes participent à toutes les étapes de la vie d'une synapse, de la synaptogenèse à la neurotransmission. Notamment, ils fournissent de l'oxygène et du glucose aux neurones via leur connexion aux vaisseaux sanguins et préviennent la mort des neurones causée par une trop forte concentration de neurotransmetteurs en les capturant et en les métabolisant¹¹⁰. En produisant les gaines de myéline, constituées de lipides et de protéines, autour des axones, les oligodendrocytes sont indispensables à la transmission du signal électrique¹¹¹. Enfin, la microglie dégrade les connexions anormales en les phagocytant¹¹⁰.

Afin d'assurer la maturation finale des circuits neuraux, certaines projections dendritiques et axonales (et donc certaines synapses) doivent être éliminées; il s'agit de l'élagage synaptique¹¹². Il est important de noter que ces projections surnuméraires ne sont pas nécessairement créées par erreur et peuvent avoir un rôle dans le développement des connexions neuronales. L'élagage est régulé par différents mécanismes incluant une signalisation active des caspases induisant la dégradation des projections et la compétition pour les facteurs de survie, tels que les neurotrophines, auxquels seulement certains

neurones ont accès. De plus, un élagage anormal est associé au développement de maladies telles que la schizophrénie¹¹².

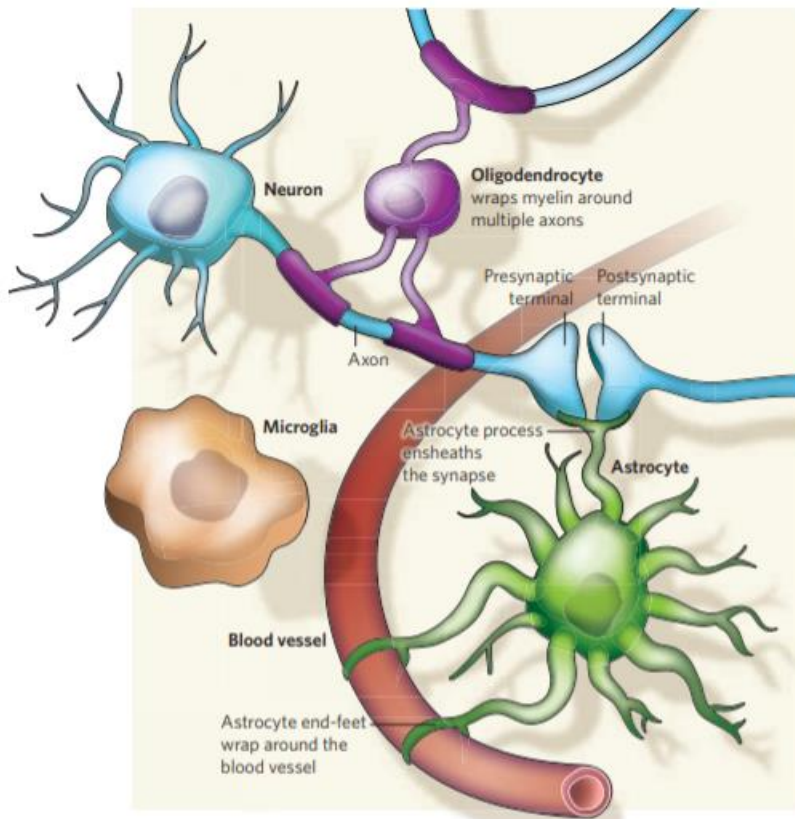


Figure 9: Composition d'une synapse (extrait de Allen et al. 2009). L'axone du neurone présynaptique entre en contact avec les dendrites du neurone post-synaptique afin de former une synapse. Les oligodendrocytes forment une gaine de myéline afin d'assurer une transmission correcte du signal électrique tandis que les astrocytes fournissent des nutriments aux neurones tout en capturant les neurotransmetteurs de la fente synaptique. La microglie aide à la formation de la synapse en dégradant les projections anormales.

7 - Conclusion

Les mécanismes intervenant durant le développement du cerveau, et notamment des neurones, se font de façon séquentielle, un processus en déclenchant un autre (Fig.10). L'altération d'un de ces mécanismes affecte également ceux à suivre, entraînant un défaut développemental comme il sera discuté par la suite.

Les progéniteurs neuraux, et particulièrement les aRG, apparaissent tôt dans le neurodéveloppement et sont impliqués dans toutes les étapes de différenciation et de migration neuronale ainsi que dans la formation des couches corticales. Ils donnent

également naissance aux cellules gliales une fois la neurogenèse terminée et constituent probablement le type cellulaire le plus important dans le développement du néocortex. Il n'est donc pas étonnant de constater que des défauts dans ces progéniteurs ont des conséquences délétères sur le nombre, la position et le fonctionnement des neurones matures^{113–115}. Par exemple, la délétion du gène *Afadin*, une protéine plateforme reliant les molécules d'adhérence telles que la nectine au cytosquelette d'actine, perturbe les jonctions adhérentes des aRG, ayant pour conséquence une migration neuronale anormale et un phénotype de double cortex chez la souris¹¹⁵.

La différenciation et la migration neuronale étant synchronisées, un défaut de sortie de cycle cellulaire conduit à un défaut de formation des couches corticales¹¹⁶. Cela est particulièrement important lorsque l'on sait que la position d'un neurone détermine la direction de ses projections¹¹⁷. Plus précisément, les neurones des couches 1 et 4 étendent leurs projections localement dans le cortex tandis que ceux des couches 2 et 3 envoient leurs axones à travers le corps calleux jusqu'à l'hémisphère controlatéral. Les neurones des couches 5 et 6 sont les seuls à entrer en contact avec d'autres régions du système nerveux telles que la moelle épinière ou le thalamus¹¹⁷.

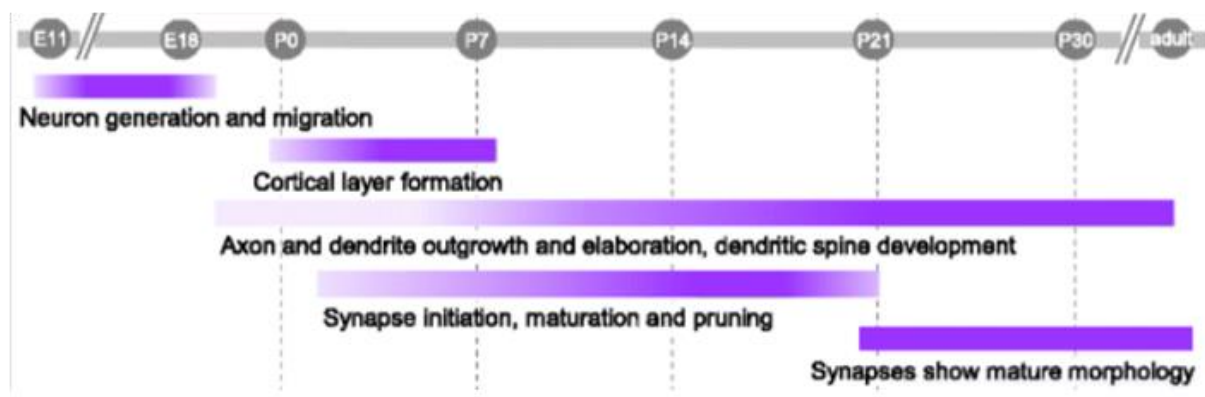


Figure 10: Organisation temporelle du développement neuronal chez la souris (extrait de Farhy-Tselnick et al. 2018)

B - Les maladies du neurodéveloppement

1 - Introduction générale

Les maladies du neurodéveloppement (MND) regroupent des pathologies extrêmement diverses telles que la déficience intellectuelle (DI), les troubles du spectre autistique (TSA), le trouble du déficit de l'attention, les dysphasies, les dyspraxies, les dyslexies ou la prosopagnosie qui ont en commun de résulter d'un développement atypique du SNC. Elles se manifestent dès l'enfance par des troubles du développement de la perception, de la mémoire, du langage, de l'attention, des fonctions exécutives et/ou de la cognition sociale notamment. Avec une prévalence globale de 3%, les MND sont responsables de 10% des dépenses de santé dans les pays développés et constituent donc un défi médical et socio-économique majeur. La suite du manuscrit ne traitera que des TSA et de la DI.

2 - Troubles du spectre autistique : Historique et définition clinique

Le mot "autisme", du grec *autós* signifiant "soi-même", fait son apparition en 1911 dans l'ouvrage du psychiatre suisse Eugene Bleuler où il est utilisé pour désigner le détachement de la réalité vécu par les patients schizophrènes. En 1943, le psychiatre américain Leo Kanner utilise ce terme pour décrire un nouveau syndrome, les "troubles autistiques du contact affectif" et rapporte le cas de huit garçons et trois filles qu'il a suivis pendant cinq ans¹¹⁸.

L'année suivante, le pédiatre Hans Asperger publie une étude décrivant quatre garçons chez lesquels il observe des troubles de la communication et de l'empathie, et une tendance à considérer les autres personnes comme des objets¹¹⁹. Il fait alors mention de "psychopathie autistique héréditaire", introduisant la notion de transmission de l'autisme

des parents à l'enfant. Ses travaux publiés en allemand resteront cependant méconnus jusqu'à ce que la psychiatre anglaise Lorna Wing les fasse connaître à la communauté scientifique en 1981¹²⁰.

Pour mieux rendre compte de l'extrême diversité des présentations cliniques des personnes autistes, la dernière et cinquième édition du manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders ou DSM-5) a choisi une approche plus dimensionnelle et fait disparaître les précédentes catégories du DSM4 (le trouble autistique, le syndrome d'Asperger, le trouble envahissant du développement non spécifié et le trouble désintégratif de l'enfant) au profit d'un spectre incluant toutes les formes d'autisme et en proposant de préciser le retentissement du trouble sur la vie sociale, les apprentissages et la vie professionnelle.

Les TSA, dont la prévalence est estimée à 1%^{121,122}, se caractérisent par des déficits persistants dans la communication et des interactions sociales dans de multiples contextes ainsi que par des modes restreints et répétitifs de comportements, d'intérêts ou d'activités. Ces symptômes apparaissent durant la période de développement précoce et les TSA sont généralement diagnostiqués avant l'âge de trois ans^{123,124} mais il arrive que le diagnostic ne soit posé qu'à l'adolescence ou l'âge adulte, en particulier en l'absence de déficience intellectuelle.

3 - Déficience intellectuelle : Historique et définition clinique

Historiquement, les personnes souffrant de DI étaient appelés "idiots" ou "imbéciles congénitaux". Ce n'est qu'au 19^{ème} siècle que les premières études cliniques sur ces patients sont rapportées. En 1842, Macartney étudie l'anatomie du cerveau de plusieurs "idiots" après leur mort et celui d'un chimpanzé dans l'espoir de comprendre leurs différences avec le "cerveau parfait de l'homme" (Macartney J. On the Minute Structure of the Brain, in the Chimpanzee and in The Human Idiot, [*Prov Med J Retrospect Med Sci*](#). 1842 Nov26; 5(113): 166–168). Trente ans plus tard, Bradley décrit un patient en prenant soin de ne pas s'intéresser qu'au cerveau; il rapporte son historique familial, les

étapes de son développement, son poids, ses habitudes etc... et constitue une des premières études de cas clinique moderne (Bradley S. Description of the Brain of an Idiot, [*J Anat Physiol*](#). 1871 Nov; 6(Pt 1): [65]-75, 512-9).

Au début du 20^{ème} siècle, la terminologie change et le retard mental est considéré comme une pathologie à part entière. Binet et Simon créent en 1905 le premier test psychométrique afin de mieux décrire et quantifier le retard de chaque patient. Les psychiatres cherchent alors non seulement à comprendre sa prévalence mais aussi à en déterminer les possibles causes et traitements. En 1907, Bryan propose un système afin de mesurer l'étendue du retard mental dans le système scolaire (Bryan J. A Method for Determining the Extent and Causes of Retardation in a City School System, [*Psychol Clin*](#). 1907 Apr 15;1(2):41-52). La même année, Witmer décrit le retard mental comme pouvant être causé uniquement par le manque d'évolution et de stimulation du cerveau, attribuant la maladie à de la "négligence" du développement des capacités plutôt qu'à un défaut de cerveau à la naissance¹²⁵. Peu de temps après, la notion de stimulation, physique cette fois, revient dans l'article de Blanche Sterling qui propose des séances de sport comme faisant partie intégrante du traitement du retard mental (Sterling B. Gymnastics as a Factor in the Treatment of Mental Retardation, [*Psychol Clin*](#). 1908 Dec 15;2(7):204-211).

La DI est aujourd'hui définie par le DSM-5 comme une faiblesse généralisée des capacités mentales avec un impact sur le fonctionnement adaptatif des trois domaines suivants : le domaine conceptuel (langage, lecture, écriture, mathématiques, raisonnement, connaissance, mémoire, temps, espace, argent...), le domaine social (empathie, responsabilité sociale, jugement social, compétences de communication interpersonnelle, méfiance/naïveté appropriée, capacité à créer et maintenir des relations amicales, capacité à résoudre les problèmes sociaux...) et le domaine pratique (autonomie : hygiène, utilisation de moyens de transport, responsabilités professionnelles, gestion du budget, gestion de l'emploi du temps, organisation du travail...).

Tout comme pour les TSA, le DSM-5 se propose de classer les cas de DI, touchant 2 à 3% de la population générale, en fonction de leur sévérité et du degré d'assistance dont les patients ont besoin. Quatre sous types ont été décrits en 2000: la DI légère, modérée, sévère ou profonde¹²⁶.

4 - Anomalies génomiques impliquées dans les maladies du neurodéveloppement

L'origine génétique des MND fut évoquée dès la fin du 19^{ième} siècle. La description en 1943 par Purdon Martin et Bell d'un arbre généalogique de DI liée à l'X avec une morphologie devenant caractéristique avec l'âge, puis la découverte en 1959 par Gautier, Lejeune et Turpin d'un chromosome 21 surnuméraire chez les patients atteints du syndrome de Down¹²⁷ marquent les débuts de la génétique médicale dans le domaine des MND. À partir de la fin des années 1980, les études de jumeaux et les études familiales ont également démontré le rôle de facteurs génétiques dans l'étiologie de l'autisme, jusqu'à majoritairement considéré comme une défaillance des interactions précoces mère-enfant.

Le développement des techniques d'analyse du génome à haut débit de plus en plus performantes au cours des dernières décennies a permis un immense gain en sensibilité pour la détection d'évènements génétiques, remaniements chromosomiques et mutations ponctuelles. Le nombre de publications reportant un diagnostic réalisé grâce à du séquençage à haut débit a augmenté de façon exponentielle entre le début des années 2000 et ces dernières années (Fig.11)¹²⁸.

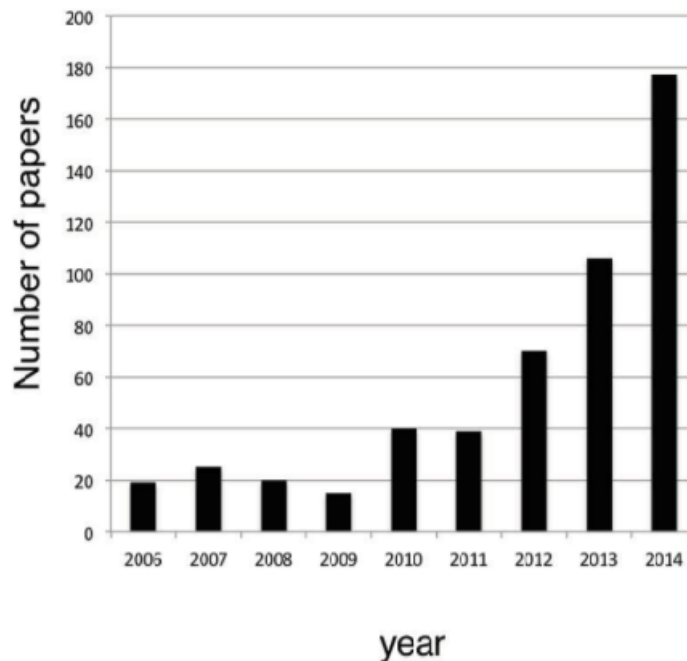


Figure 11: Augmentation avec le temps du nombre de publications rapportant un diagnostic de DI réalisé grâce au séquençage à haut débit (modifié depuis Chiurazzi et al. 2016)

La CGH array permet d'identifier dans environ 10-15% des cas de TSA^{121,129} et 25-30% des cas de DI¹³⁰ des anomalies chromosomiques telles que des variations du nombre de copies (copy number variants ou CNVs en anglais) mais aussi des aneuploïdies (nombre anormal de chromosomes), des inversions et des translocations. Plusieurs études ont notamment montré un enrichissement en CNVs *de novo* chez les patients avec TSA comparé aux témoins, suggérant une possible hérédité multigénique dans certains cas^{121,131,132}. La trisomie 21 est l'anomalie chromosomique la plus fréquente de DI avec une prévalence de 1/800 dans la population générale, tandis que la duplication 15q11-13 et les délétions 2q37 et 22q13.3 sont les anomalies chromosomiques les plus souvent retrouvées dans les TSA avec une prévalence moindre de l'ordre de 1% des cas de TSA¹³³. L'augmentation de la sensibilité des technologies de microarray permet de détecter des anomalies chromosomiques de plus en plus petites (~100kb) et jusqu'à 15-20% des cas de DI pourraient être expliqués par des CNVs de petite taille¹³⁴. La détection de micro-réarrangements comportant peu de gènes a également permis d'identifier de nouveaux

gènes candidats qui sont ensuite validés par la mise en évidence de mutations ponctuelles chez d'autres patients¹³⁵.

Les techniques de séquençage haut débit (whole exome et whole genome) ont permis de recenser près de 1000 gènes impliqués dans les TSA (base de données-SFARI, <https://www.sfari.org/resource/sfari-gene/>) et environ 900 pour la DI¹³⁶ (étude Deciphering Developmental Disorders menée par un consortium au Royaume-Uni, <https://www.ddduk.org/>). Il y a un très important chevauchement entre ces 2 bases de données car toutes les études ayant permis l'identification de ces mutations ont été réalisées sur des cohortes de patients ayant une DI avec ou sans autisme.

Tous les modes de transmission mendéliens ont été décrits: lié au chromosome X, autosomique dominant ou autosomique récessif. Ainsi, de nombreuses formes monogéniques rendant compte de 10-15% des cas de TSA et de DI ont été décrites¹³⁷⁻¹³⁹. Le syndrome de l'X fragile, dû à une expansion anormale et instable de triplets dans un intron du gène FMR1, constitue la forme monogénique la plus fréquente de DI et de TSA avec une prévalence de 1/4000 chez les hommes et 1/6000 chez les femmes (chiffres des fondations de l'X fragile américaine et européenne), représentant environ 0,5% des cas de DI et de TSA¹⁴⁰. Ce syndrome génétique de MND a été le premier dont la cause monogénique a été identifiée¹⁴¹ en 1991, soit près de 50 ans après la description de la famille rapportée par Purdon Martin et Bell. Au total, 141 gènes du chromosome X comme *MECP2*, *DCX* ou encore *CASK* ont été impliqués dans la DI depuis 1983 (<https://www.ggc.org/xlid-genetic-research>).

D'autres études ont mis en évidence des mutations rares dans les gènes codant pour les protéines NLGN3, NLGN4, NRXN1, SHANK3 et SHANK2 qui ont toutes un rôle dans la formation et le fonctionnement de la synapse¹⁴²⁻¹⁴⁵. Plus récemment, le séquençage d'exome chez plusieurs centaines de trios parents/enfants a permis d'identifier des gènes présentant une plus grande fréquence de mutations *de novo* tels que *SCN2A*, *CHD8*, *DYRK1A*, *POGZ*, *GRIN2B*, et *KATNAL2*¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. Collectivement, les mutations ponctuelles *de novo* pourraient rendre compte de 1% de la totalité des cas de TSA. Certains gènes sont néanmoins plus récurrents, le séquençage de 565 gènes candidats chez près de 1000 patients ayant montré une fréquence plus élevée de variants

dans les gènes *SETD5*, *ATRX*, *CUL4B*, *MECP2* et *ARID1B*¹⁴⁹.

La Figure 12 résume la répartition des différents types d'étiologies des TSA et de la DI. Malgré les avancées des techniques de séquençage à haut débit ces dernières années, plus de la moitié des cas restent sans diagnostic génétique. C'est pourquoi l'implication des facteurs non génétiques dans les MND fait l'objet de plus en plus d'études.

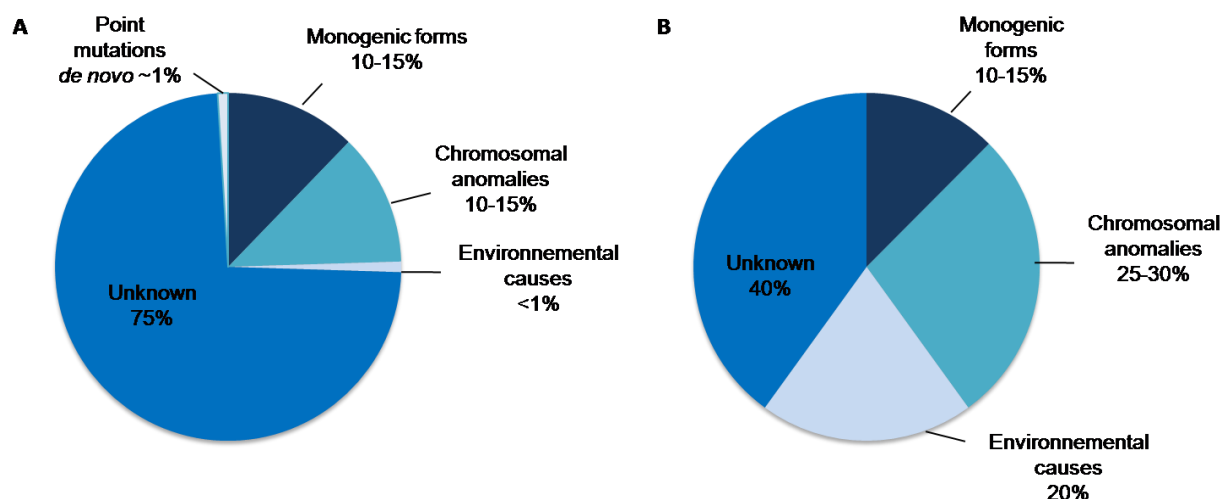


Figure 12: Répartition des différents types d'étiologies (A) des TSA et (B) de la DI

5 - Facteurs non génétiques dans les maladies du neurodéveloppement

De nombreux facteurs environnementaux ont été impliqués dans la survenue des MND. Les facteurs psychosociaux comme le statut socio-économique entrent notamment en jeu. Par exemple, les enfants dont les parents ont un faible niveau d'éducation sont plus à risque de développer une DI^{150,151}.

Les facteurs de risque anténataux tels que l'âge des parents à la naissance, les carences nutritionnelles, les infections fœtales, le diabète maternel, la prise de médicaments et l'exposition à la pollution (perturbateurs endocriniens)^{152,153} ainsi qu'aux

agents exogènes tels que l'alcool, le tabac ou les drogues¹⁵⁴ ont tous été associés à un risque accru de MND chez l'enfant à naître.

Enfin, les facteurs de risque périnataux comme la prématurité et postnataux tels que l'exposition aux infections (méningite, encéphalite) ou aux métaux lourds peuvent être responsable de l'apparition d'une DI¹⁵⁵.

La responsabilité de ces facteurs dans la survenue des MND reste cependant souvent difficile à établir car ils peuvent agir de façon cumulative (étude complexe) et leur effet peut-être retardé (études couteuses car prospectives sur plusieurs années). Ainsi, il a fallu attendre 30 ans pour que le valproate de sodium, un inhibiteur des histones déacétylases mis sur le marché en 1975 pour le traitement de l'épilepsie et bien connu comme agent tératogène, soit reconnu comme faisant courir un risque accru (jusqu'à 30 à 40%) de développer une DI et/ou des TSA¹⁵⁶ chez les enfants exposés *in utero*.

Le rôle des facteurs environnementaux explique en partie l'observation que seuls 60 à 90% de paires de jumeaux monozygotes soit concordantes pour le diagnostic de TSA; dans au moins un cas sur dix, un seul jumeau est atteint¹⁵². Plusieurs mécanismes physiopathologiques, en particulier les modifications épigénétiques, comme décrit plus haut avec le cas du valproate de sodium, peuvent être impliqués. Cette hypothèse est supportée par le fait que les duplications héritées de la mère du domaine chromosomique soumis à l'empreinte 15q11-13 font partie des CNVs les plus fréquents dans les TSA¹³². De même, l'établissement du profil d'expression génique de jumeaux monozygotes discordants pour le diagnostic de TSA a montré l'expression différentielle de gènes impliqués dans le neurodéveloppement tels que *ETS1* et *DUSP2*¹⁵⁷. Enfin, une altération des profils de méthylation de gènes candidats tels que *OXTR* et *HDAC4* a été observée chez des patients autistes^{158,159}. C'est également le cas dans la DI. Une altération des profils de méthylation a par exemple été observée dans la trisomie 21^{160,161}. Notamment, des défauts de remodelage de la chromatine ont été identifiés comme altérant spécifiquement l'expression de gènes impliqués dans l'arborisation dendritique pendant le développement ainsi que dans la plasticité synaptique dans des cas de DI¹⁶².

Il est important de noter que les causes environnementales avérées expliquent une plus grande proportion de cas de DI (20%) que de TSA (<1%)(chiffres issus de l'expertise

collective de l'INSERM "Déficiency intellectuelle" publiée en 2016)(Fig.12). De plus, ces facteurs sont d'autant plus prédominants dans les cas de DI légère (~85% des patients) qui sont aussi les cas où des causes génétiques sont le moins souvent trouvées tandis que cette tendance est inversée dans les DI plus sévères^{163,164}.

6 - Physiopathologie des maladies du neurodéveloppement

La complexité de l'ontogénèse du SNC explique l'extrême diversité des gènes impliqués dans les MND. Une convergence fonctionnelle des gènes de MND a cependant été décrite au cours des dernières années. Des méta-analyses de tous les gènes impliqués dans les MND ont montré un enrichissement pour des mécanismes tels que la régulation de l'expression génique (notamment par le remodelage de la chromatine), la synthèse et la dégradation des protéines, la dynamique du cytosquelette ainsi que la formation et le fonctionnement de la synapse^{121,130,165,166}.

Ebrahimi-Fakhari et al. proposent en 2015 de classer les gènes impliqués dans les MND en deux catégories fonctionnelles seulement: régulation de l'expression des gènes et des protéines ou formation et fonctionnement de la synapse. Par exemple, *UBE3a*, retrouvé muté dans le syndrome d'Angelman, code une ubiquitine ligase en charge d'induire la dégradation de protéines surnuméraires au niveau de la synapse (Fig.13A) tandis que *SHANK3* sert de protéine d'échafaudage régulant l'organisation spatiale des canaux ioniques et récepteurs de neurotransmetteurs à la synapse (Fig.13B)¹⁶⁷. Si cette classification est certainement trop simpliste pour être précise au vu de la complexité de l'étiologie des MND, elle permet de mettre en avant la convergence des mécanismes pathophysiologiques de ces maladies.

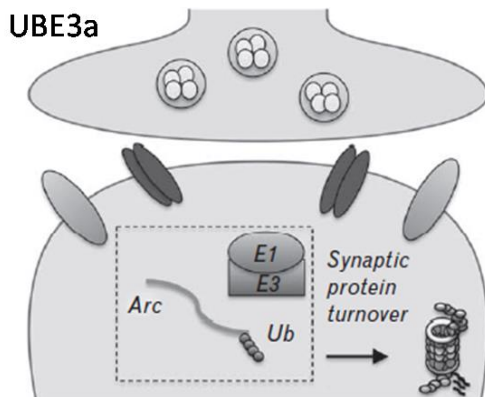
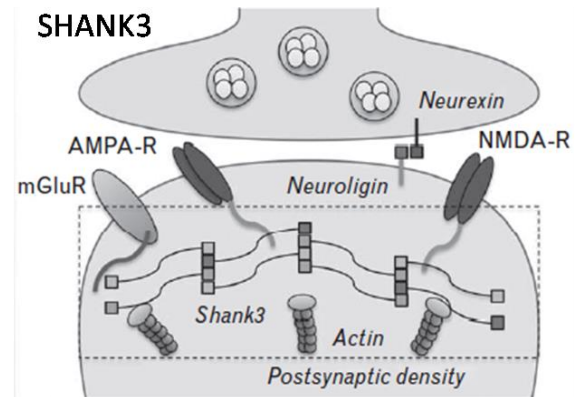
A**B**

Figure 13: Les gènes de MND sont impliqués dans (A) la régulation de l'expression génique et (B) les fonctions synaptiques (modifié depuis Ebrahimi-Fakhari et al. 2015).

7 - Conclusion

Si DI et TSA correspondent à des définitions distinctes, un grand chevauchement clinique et génétique existe entre ces deux pathologies. Ainsi, environ 30% des patients atteints de TSA présentent également une déficience intellectuelle¹⁶⁸. Ce chevauchement phénotypique est également observé au niveau génétique. Par exemple, les 100 gènes associés aux TSA recensés par Betancur en 2011¹⁶⁹ ont tous été également associés à des cas de DI¹⁷⁰. Enfin, les gènes mutés dans ces pathologies ont des fonctions souvent similaires. Collectivement, ces observations démontrent l'existence de mécanismes physiopathologiques communs à ces maladies du neurodéveloppement. Il est également important de noter que la majorité des publications rapportent des cas de patients atteints de DI avec ou sans TSA et que les cas de TSA isolés sont rarement inclus dans les études génétiques. Ce biais de recrutement peut en partie expliquer le chevauchement présent dans la littérature entre ces deux maladies.

Le chromosome X semble être enrichi en gènes de MND. Les dernières études montrent que plus de 10% des gènes codant pour des protéines sur le chromosome X sont des gènes de MND contre 4% en moyenne sur les autres chromosomes¹⁷⁰. Il est

néanmoins possible qu'il y ait un biais historique et technique dans cette observation. Le syndrome de l'X fragile a été la première forme monogénique de DI identifiée¹⁴¹ et de nombreux groupes s'y sont intéressés depuis. De plus, le mode de transmission génétique lié à l'X peut également rendre plus facile l'identification de mutations causatrices.

Environ 1/3 des gènes humains sont exprimés dans le cerveau, participant à son développement et fonctionnement. C'est sans doute l'une des explications de l'extrême hétérogénéité génétique des MND, l'altération d'un de ces gènes pouvant affecter le développement cognitif et comportemental. De plus, de nombreux facteurs environnementaux ont été incriminés dans les MND. Cependant, et malgré le développement rapide des outils de diagnostic, plus de la moitié des cas de MND restent inexpliqués. Les ARNs non codant, et particulièrement les miARNs, émergent comme facteurs de risque des MND et ce sujet fera l'objet d'une section indépendante.

III – MicroARNs et neurodéveloppement

A - Les microARNs dans le neurodéveloppement physiologique

1 - Introduction générale

Les miARNs sont impliqués dans toutes les fonctions de l'organisme mais sont particulièrement importants pour le développement et le fonctionnement du SNC^{13,45,171}. Chez les mammifères, 50% des miARNs de l'organisme sont exprimés dans le cerveau¹⁷² où ils assurent la régulation spatiotemporelle de l'expression des gènes impliqués dans la différenciation, la migration et la polarisation des cellules neurales mais aussi dans la neurogénèse adulte, la formation et la plasticité des synapses, le développement et la modification des circuits de réseaux neuronaux¹⁷. Seul le rôle des miARNs dans le développement des neurones et des circuits neuronaux sera abordé.

2 - Les profils d'expression des microARNs au cours du neurodéveloppement

L'expression des miARNs est un mécanisme finement contrôlé dans l'organisme. Le développement du cerveau étant un procédé complexe et extrêmement dynamique, la régulation du niveau d'expression des miARNs y est d'autant plus importante.

Quatre profils d'expression temporelle différents peuvent être observés (Fig.14).

Certains miARNs comme *miR-9* sont exprimés tout au long du neurodéveloppement embryonnaire et post-natal. D'autres sont exprimés au stade précoce du neurodéveloppement puis voient leur expression s'éteindre (*e.g. miR-125b*). À l'inverse, l'expression de certains miARNs débute à un stade plus tardif et persiste jusqu'après la naissance (*e.g. miR-124*). Enfin, le dernier profil correspond aux miARNs exprimés durant uniquement quelques stades particuliers du neurodéveloppement (*e.g. miR-125a*)⁴⁵.

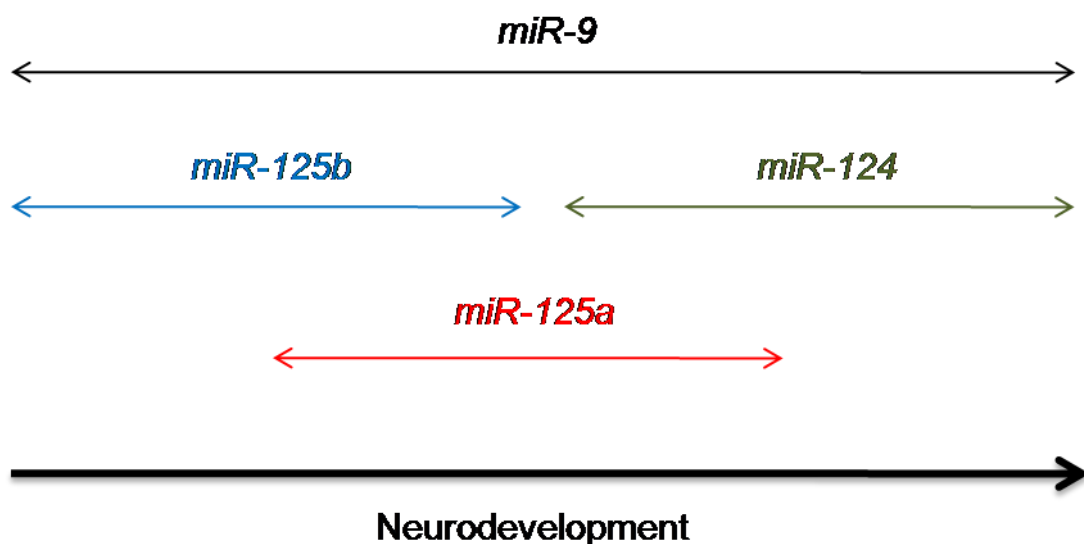


Figure 14: Profils d'expression des miARNs pendant le neurodéveloppement. Quatre profils temporels d'expression existent, un exemple de miARN est donné pour chaque.

Les miARNs, dont l'expression varie également selon le type cellulaire étudié, voire même selon la région de la cellule (*e.g. axone versus dendrite*), sont particulièrement importants pour la détermination du destin cellulaire. Ainsi, *miR-297c-5p*, en inhibant l'expression de la cycline T2, engage les aRG vers une voie de différenciation gliale⁵. La persistance de l'expression de *miR-297c-5p* induit la différenciation des précurseurs des cellules gliales en oligodendrocytes tandis que son extinction conduit à la production d'astrocytes¹⁷. Les miARNs sont également impliqués dans la détermination des sous-types cellulaire, par exemple pour déterminer si un neurone devient un neurone moteur par rapport à un interneurone, ou si une cellule gliale devient un astrocyte ou un

oligodendrocyte. C'est le cas de *miR-218* dont l'expression est restreinte aux neurones moteurs où il inhibe différents facteurs promouvant la différenciation en interneurones tels que *LHX1* ou *BCL11A*¹⁷³. En 2013, une méta-analyse a déterminé le niveau d'expression de 351 miARNs dans les différents types cellulaires présents dans le cortex de rat à P1: neurones, astrocytes, oligodendrocytes et cellules microgliales¹⁷². Cette étude démontre clairement la grande spécificité et l'extrême variabilité du niveau d'expression d'un miARN. En effet, un tiers des miARNs testés sont au moins cinq fois plus exprimé dans un type cellulaire que dans les autres¹⁷⁴. De plus, au sein d'un même type cellulaire, le niveau relatif d'expression des différents miARNs peut varier d'un facteur 1 à 50000.

Enfin, la localisation d'un miARN au sein de la cellule est également finement régulée. C'est particulièrement le cas dans les neurones où de nombreuses études montrent un enrichissement de certains miARNs tels que *miR-132* ou *miR-134* au niveau des synapses ou des dendrites en comparaison à la région périnucléaire^{175,176}. Cependant, les mécanismes d'enrichissement des miARNs ne sont pas encore entièrement élucidés. Un des mécanismes proposés est le transport des miARNs de la région périnucléaire à la synapse par des protéines capables de se lier à des ARNs. C'est par exemple le cas de la protéine FMRP, dont le gène correspondant, *FMR1*, est muté dans le syndrome de l'X fragile, et qui a été trouvée associée à *miR-125b* et *miR-132* au niveau de la synapse¹⁷⁵. La seconde théorie, une production locale de miARNs, est supportée par la présence de DICER et d'éléments du complexe RISC à la synapse^{177,178}.

3 - Les microARNs dans la neurogenèse et la migration neuronale

Durant la neurogenèse, de nombreux miARNs ont été décrits comme ayant un rôle « pro-neurogénique » ou « anti-neurogénique » de par leur action sur un gène cible particulier. Ainsi, *miR-15b* inhibe la prolifération des aRG et favorise leur différenciation en IP et neurones en réprimant directement *TET3*, un modulateur de la méthylation de l'ADN promouvant l'expression de la cycline D1¹². Le contrôle de la prolifération et de la spécifications des aRG via l'inhibition directe ou indirecte de la cycline D1 semble

d'ailleurs être un mécanisme d'action convergent de plusieurs miARNs tels que *let-7b*¹⁷⁹, *miR-9*¹⁸⁰, *miR-137*¹⁸¹, *miR-20a/20b*¹⁸² et *miR-23*¹⁸². D'autres mécanismes de contrôle de la neurogenèse font également intervenir les miARNs. Par exemple, le cluster *miR-17-92* cible les ARNm de TBR2 et PTEN afin d'induire l'expansion des aRG et de bloquer leur transition en IP¹⁸³. Dans le même temps, *miR-134* cible DCX, un inducteur de la différenciation neuronale. À l'opposé, l'expression la kinase cycline dépendante CDK47 est inhibée par *miR-210* afin de promouvoir la sortie du cycle cellulaire et la différenciation des aRG¹⁸⁴. Enfin, les trois miARNs *miR-369-3p*, *miR-496* et *miR-543* du cluster *miR-379-410* régulent l'expression de la N-CADHERINE non seulement dans les aRG pour bloquer leur prolifération mais aussi dans les neurones afin de promouvoir leur migration¹⁸⁵. La figure 15 rend compte des principaux miARNs impliqués dans la neurogenèse et de leurs cibles.

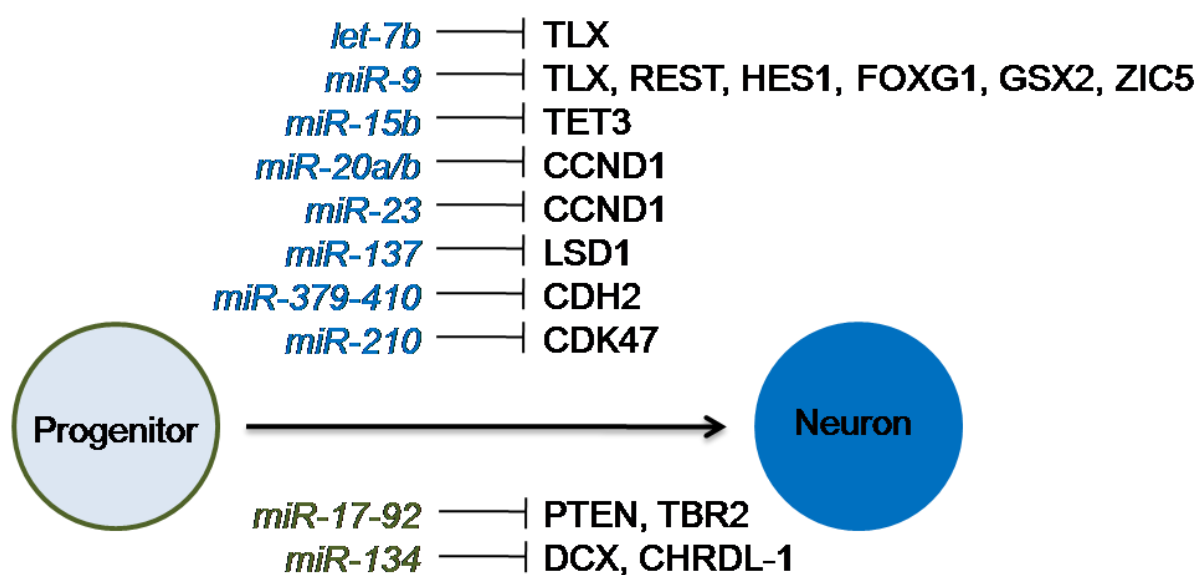


Figure 15: Principaux miARNs impliqués dans la différenciation neuronale et leurs cibles. Les miARNs écrits en bleu sont pro-neurogéniques tandis que les verts sont anti-neurogéniques.

Les miARNs interviennent également dans le contrôle de la migration des neurones nouveau-nés vers leur destination finale dans le cerveau, une condition préalable à l'établissement et au maintien des circuits neuronaux. Ainsi, un autre membre du cluster *miR-379-410*, *miR-134* inhibe la migration neuronale en ciblant directement la doublecortine (DCX), une protéine associée aux microtubules facilitant la migration des interneurons et neurones pyramidaux nouvellement formés¹⁸⁶. L'inhibition de la migration neuronale par diminution de l'expression de DCX peut également se faire de façon indirecte. C'est le cas de *miR-22* et *miR-124* qui ciblent le complexe CoREST/REST¹⁸⁷. Ce complexe agit comme répresseur de la transcription, inhibant l'expression de portions entières de chromosomes comportant jusqu'à 90% de gènes importants pour le développement des neurones et des circuits neuronaux tels que GAD1, DCX, NEUROD1 et GRIK-2, -3 et -4¹⁸⁸.

4 - Les microARNs dans la synaptogenèse et la neurotransmission

Des miARNs ont été identifiés comme promouvant ou inhibant la croissance axonale et dendritique. Par exemple, l'expression de *miR-124* dans des neurones hippocampiques réprime la petite GTPase RhoG, ce qui conduit à l'induction de l'arborisation axonale¹⁸⁹. Au contraire, *miR-101* prévient la croissance dendritique en bloquant l'action de NKCC1, un co-transporteur sodium/potassium/chlore jouant un rôle clé dans l'inversion développementale de la polarité de l'action GABA-ergique. De façon similaire, *miR-101* inhibe l'expression de KIF1A et ANK2 afin d'éviter une surproduction de synapses. Il est important de noter qu'une inhibition même transitoire de *miR-101* chez la souris induit une hyper-excitabilité durable¹⁹⁰.

La maturation des épines dendritiques est également régulée par les microARNs. Notamment, *miR-134* empêche la formation d'épines stables en inhibant l'expression de LIMK1, une protéine impliquée dans la polymérisation de l'actine¹⁹¹. De même, *miR-132*, dont le transport à la synapse est assuré par FMRP, contribue à la synaptogenèse en induisant la croissance dendritique, l'arborisation axonale et la maturation des épines

dendritiques en réprimant une seule cible: p250GAP¹⁷. En plus de réguler la structure synaptique, les miARNs peuvent intervenir directement dans la neurotransmission. Le miARN le plus étudié dans ce contexte est *miR-137*. GLU1A, une sous unité des récepteurs AMPA, et la Synaptotagmine-1, responsable de la sécrétion de certains neurotransmetteurs, comptent parmi les cibles de *miR-137*. *In vivo*, la sur-expression de *miR-137* réduit la libération de vésicules^{192,193}. Il est intéressant de noter que plusieurs études ont démontré l'association de variants de ce miARN à un risque accru de schizophrénie^{193,194}.

5 - Rôle central de *miR-9* dans le neurodéveloppement

Les mécanismes décrits précédemment démontrent l'action convergente de différents miARNs sur les mêmes cibles ou sur des cibles différentes mais participant aux mêmes processus biologiques. Cependant, peu de miARNs ont été impliqués dans différents mécanismes ou décrits comme agissant sur de multiples cibles. *miR-9*, un des miARNs les plus abondants dans le cerveau embryonnaire, est exprimé tout au long du neurodéveloppement et participe à la régulation de nombreux processus neuronaux¹⁹⁵. Au cours des stades précoces, *miR-9* promeut la différenciation des progéniteurs neuronaux en neurones en inhibant l'expression de différentes protéines induisant la prolifération des aRG telles que TLX¹⁸⁰ (homme, souris), HES1¹⁹⁶ (homme, souris, xénope), FOXG1¹⁹⁷ (homme, souris, xénope, poisson zèbre) et ZIC5¹⁹⁸ (poisson zèbre) (mirtarbase) (Fig.14). En retour, TLX, via son interaction avec l'histone déacétylase HDAC5, inhibe l'expression de *miR-9*, induisant ainsi une boucle de rétrocontrôle négatif¹⁸⁰. De telles boucles de rétrocontrôle sont également effectives entre *miR-9* et ses autres cibles précédemment décrites¹⁹⁵. Ce miARN joue également un rôle dans la spécification des progéniteurs neuronaux en neurones chez la souris en inhibant des facteurs gliogéniques tels que IL6ST et JAK1¹⁹⁹. De plus, l'expression de *miR-9*, en collaboration avec *miR-124*, est suffisante pour induire la différenciation de fibroblastes humains en neurones. Cette

différenciation *in vitro* se fait notamment par l'inhibition de BAF53a, un membre du complexe en charge d'établir la méthylation H3K27me3 réprimant l'expression de milliers de loci génétiques²⁰⁰.

Ce miARN est également impliqué dans les étapes du neurodéveloppement postérieures à la différenciation neuronale. L'homologue de *miR-9* chez *C. elegans*, *miR-79*, inhibe la migration des neurones en réprimant l'expression des enzymes SQV-5 et SQV-7, prévenant ainsi la synthèse des protéoglycanes²⁰¹. Chez la souris, après mutation de Mir9, les interneurones se différencient normalement dans les GE mais sont peu présents dans le néocortex, suggérant un défaut de migration mais pas de production des interneurones¹⁹⁷. La protéine FOXP2, connue pour son rôle dans le développement du langage, est présente dans les neurones matures post-migration²⁰². Si FOXP2 est exprimée plus précocement, les aRG ne démontrent pas de défaut de prolifération ou différenciation, mais la migration des neurones le long des extensions des aRG se fait de façon anormale et la croissance dendritique de ces neurones est retardée²⁰². *miR-9*, en association avec *miR-132*, est responsable de la répression de l'expression de FOXP2 aux stades précoces afin de contrôler ces mécanismes²⁰². Enfin, *miR-9* contrôle la croissance dendritique et la transmission synaptique en ciblant REST chez la souris²⁰³.

miR-9 a également été impliqué dans la physiopathologie de certaines affections neurologiques ou, au contraire, dans des mécanismes neuroprotecteurs. Ainsi, ce miARN est impliqué dans la progression de cancers tels que le médulloblastome²⁰⁴ ou le gliome²⁰⁵. Le niveau de *miR-9* a été trouvé diminué dans le plasma de patients souffrant de la maladie d'Alzheimer. De plus, il régule l'expression de l'amyloïde beta, une protéine fortement associée à la progression de cette pathologie²⁰⁶. Dans la chorée de Huntington, une autre maladie neurodégénérative, la quantité de *miR-9* est également inférieure dans le cortex de patients à celle observée chez des contrôles et l'activité d'une de ses cibles, REST, un inhibiteur de l'expression de nombreux gènes neuronaux, est augmentée¹⁹⁵. Enfin, *miR-9* pourrait également être impliqué dans les pathologies de l'œil telles que la dégénérescence maculaire et le glaucome²⁰⁷. À l'inverse, l'expression physiologique de *miR-9* assure la préservation des neurones et des fonctions cognitives chez les patients atteints de progéria, un syndrome extrêmement rare caractérisé par un vieillissement

accéléré des patients. En effet, il empêche la production d'une isoforme tronquée de la lamine A en ciblant le gène la codant. Or, l'accumulation de cette isoforme appelée progérine a des conséquences graves et est responsable des signes cliniques de la progeria²⁰⁸.

Collectivement, ces observations démontrent le rôle central de *miR-9* dans le neurodéveloppement. De plus, elles supportent l'hypothèse que la dérégulation d'un seul miARN puisse être suffisante pour conduire à un défaut majeur de développement cérébral.

6 - Conclusion

Il n'existe pas un profil d'expression unique pour les miARNs dans le neurodéveloppement. Chaque miARN est régulé spatio-temporellement et souvent en fonction de la cellule ou il s'exprime afin d'assurer sa ou ses fonctions. Le niveau d'expression des miARNs n'est pas seulement dynamique dans le temps, il varie également en réponse aux signaux auxquels la cellule est exposée. Par exemple, une dégradation plus importante des miARNs a été observée après stimulation de l'activité synaptique²⁰⁹.

Il en va de même avec le mode d'action. Certains miARNs comme *miR-9* ont différentes fonctions via l'inhibition de plusieurs cibles. À l'opposé, plusieurs miARNs peuvent cibler le même ARNm afin d'augmenter la répression de son expression. L'action convergente de miARNs sur la même cible/fonction est particulièrement frappante dans l'exemple de la cycline D1 durant la neurogenèse. Il est d'ailleurs intéressant de noter que la plupart des miARNs caractérisés dans cette étape du neurodéveloppement ont un rôle neurogénique (Fig.14). Le fait que l'inactivation conditionnelle de *Dicer*, nécessaire à la maturation de la majorité des miARNs, dans les aRG retarde la neurogenèse chez la souris²¹⁰ semble confirmer cette observation.

Le mode d'action peut s'avérer plus complexe dans le cas des clusters contenant

des miARNs transcrits en même temps mais ayant des fonctions opposées. Par exemple, plusieurs miARNs du cluster *miR-379-410* inhibent la N-CADHERINE afin de promouvoir la migration neuronale tandis que *miR-134*, qui fait partie du même cluster, inhibe la migration en réprimant l'expression de DCX. Le modèle retenu actuellement suggère que le mode d'action d'un miARN est dépendant de son environnement et plus particulièrement des ARNm auxquels il est exposé¹⁷¹. Une activité contexte-dépendant pourrait expliquer comment les miARNs de la même famille ou cluster puissent avoir des fonctions antagonistes.

Au vu des fonctions importantes des miARNs tout au long du neurodéveloppement et de la régulation complexe de leur expression et de leur activité, cette classe d'ARN non codant a fait l'objet de nombreuses études dans le contexte des maladies neurologiques durant ces dernières années.

B - Les microARNs dans les maladies neurologiques

1 - Introduction générale

Les miARNs ont été associés à la majorité des pathologies affectant le SNC. Ils ont ainsi été mis en cause dans des cancers du cerveau tels que le neuroblastome²¹¹ ou le glioblastome²¹². Ils participent également à la régulation de la capacité des tumeurs cérébrales à métastaser dans d'autres tissus et à former des adénocarcinomes gastriques²¹³ ou du poumon²¹⁴. Dans les accidents vasculaires cérébraux, des miARNs ont été identifiés à la fois comme à l'origine de la pathologie²¹⁵ et cibles thérapeutiques²¹⁶. Enfin, de nombreux miARNs ont été décrits dans le contexte des maladies neurodégénératives et des troubles du neurodéveloppement. Dans cette partie, seuls ces deux derniers cas seront abordés.

2 - Les microARNs dans les pathologies neurodégénératives

La maladie d'Alzheimer se caractérise par une perte de mémoire, une démence et une altération des fonctions exécutrices. Cette perte progressive des capacités cognitives s'explique par l'accumulation de plaques amyloïdes dans le cerveau, un agrégat de peptides provenant de la protéine APP, et un défaut de microtubule dans les neurones causé par une accumulation de la protéine TAU. Si les formes précoces ont une étiologie génétique bien caractérisée avec des mutations dans les gènes *APP*, *PSEN1* et *PSEN2*, ce n'est pas le cas des formes tardives²¹⁷. Des miARNs ayant un rôle dans la production d'APP et dans l'activation de TAU ont été trouvés dérégulés chez les patients²¹⁸. D'autres études ont porté sur de potentiels biomarqueurs détectables chez les patients vivants. C'est ainsi que *miR-15a* a été trouvé sur-exprimé dans le plasma des patients et qu'il a été démontré que son niveau d'expression était corrélé à l'accumulation des plaques amyloïdes²¹⁹. En tout, l'expression anormale de plus de 50 miARNs a été rapportée dans le serum des patients ou sur des échantillons de cerveau post-mortem²²⁰. Cependant, la majorité des études a été faite sur des cohortes de petite taille. En 2013, une méta-analyse a été réalisée sur l'hippocampe et le cortex préfrontal de plus de 40 patients²¹⁷. Sur 641 miARNs testés, 35 étaient significativement dérégulés et l'expression de *miR-132-3p* en particulier était fortement altérée dans les deux régions. De plus, ce miARN régule plusieurs facteurs de transcription, comme FOXO1, induisant l'expression de gènes impliqués dans l'activité de TAU²¹⁷. Si la maladie d'Alzheimer est la pathologie neurodégénérative la plus souvent associée à des altérations d'expression de miARNs, des avancées importantes ont également été faites dans des pathologies similaires. Notamment, *miR-7* exerce un rôle protecteur en inhibant la synucléine alpha dont le niveau d'expression est directement corrélé à la sévérité des présentations cliniques de la maladie de Parkinson²²¹ tandis que l'inactivation conditionnelle de DICER dans les neurones moteurs conduit à un phénotype proche de la sclérose amyotrophique latérale chez la souris²²².

3 - Les miARNs dans les maladies du neurodéveloppement

La schizophrénie (SCZ) est une maladie psychiatrique définie par une perte de contact avec la réalité se traduisant par une grande variabilité dans l'expression clinique. Le délire, les hallucinations, l'isolement social et un défaut de l'attention sont notamment des symptômes décrits dans la SCZ. L'étiologie de la SCZ est complexe. La maladie apparaît sur la base d'une vulnérabilité prémorbide à l'adolescence ou au début de l'âge adulte sous l'influence conjointe de facteurs génétiques et environnementaux^{194,223}.

Des études de profil d'expression de miARNs sur des échantillons post-mortem de cortex de patients schizophrènes ont identifié une dérégulation fréquente des familles de miARNs *miR-15* et *miR-30*²²⁰. Ces miARNs ont pour cibles des gènes associés à la SCZ tels que la neuréguline et la synaptotagmine²²⁰. Une étude d'expression de miARNs a été réalisée en 2015 sur le plasma de 400 cas de SCZ et seulement deux miARNs, *miR-130b* et *miR-193a-3p*, ont été retrouvés dérégulés de façon persistante, soulevant la possibilité d'utiliser les miARNs comme biomarqueurs de la SCZ²²⁴.

Biologiquement, des défauts de neurones GABA-ergiques, et plus précisément dans l'interaction entre la signalisation d'AKT1 et les récepteurs GABA, ont été identifiés dans la SCZ²²⁵. Or, AKT1 et le récepteur GABA B1 (GABBR1) ont récemment été identifiés comme cibles de plusieurs miARNs déjà incriminés dans la SCZ tels que *miR-335* et *miR-26b*²²⁶. Ces observations donnent une première piste pathophysiologique de l'implication des miARNs dans la SCZ.

Cependant, si ces études post-mortem permettent de faire avancer notre compréhension des mécanismes impliqués dans la pathologie, de nombreux progrès sont encore nécessaires. En effet, le diagnostic de SCZ reste difficile à établir et se fait principalement par l'analyse des symptômes des patients. L'utilisation de miARNs comme biomarqueurs pourrait donc contribuer à faciliter le diagnostic de la SCZ.

Connaissant l'importance des formes de MND liées au chromosomique X, les 13 miARNs présents sur ce chromosome et exprimés dans le cerveau ont été séquencés dans une cohorte de 464 patients afin de détecter d'éventuelles mutations²²⁷. Seules quatre

variations nucléotidiques, n'affectant pas la forme mature des miARNs, ont été identifiées dans les pre-miARNs, suggérant que les mutations ponctuelles de miARNs ne sont que très rarement impliquées dans les MND liées à l'X. Cela n'exclut cependant pas de possibles altérations d'expression menant à un défaut fonctionnel de ces miARNs.

Les CNVs sont également fréquemment incriminés dans l'étiologie des MND. Ces dix dernières années, trois études à grande échelle ont été menées afin de déterminer quels miARNs étaient enrichis dans les CNVs impliqués dans les MND²²⁸⁻²³⁰. Le premier élément important fut l'observation d'un enrichissement dans le nombre de miARNs dans les CNVs *de novo* en comparaison de ceux hérités des parents dans les cas de TSA et de DI^{229,230}. Ensuite, seuls deux miARNs, appartenant à la même famille, *miR-200a* et *miR-200b*, ont été retrouvés dans les trois études comportant pourtant chacune plusieurs dizaines de CNVs. La famille *miR-200* a été caractérisée comme induisant la différenciation neuronale *in vitro* via la répression de SOX2²³¹, confirmant sa pertinence dans l'étiologie des MND. Enfin, certains des miARNs identifiés dans ces études avaient déjà été trouvés dérégulés dans divers tissus de patients²³².

Les études d'expression constituent l'approche la plus fréquemment utilisée afin d'associer d'éventuelles anomalies de la fonction des miARNs à la survenue des MND. Ce sujet sera revu plus en détails dans la première partie des résultats de mon manuscrit, je ne discuterai donc ici que de l'étude d'expression menée par notre groupe.

Jusqu'en 2015, cinq types de tissus ou cellules avaient été utilisés afin de déterminer quels miARNs étaient dérégulés dans les MND: du sérum, des cellules mononucléaires du sang périphérique (peripheral blood mononuclear cells ou PBMC en anglais), des fibroblastes primaires, des lignées de cellules lymphoblastoïdes et des échantillons de cerveau post-mortem⁶. Or, la pertinence de ces tissus reste à établir dans le contexte des MND. Si le sérum, les PBMCs et les fibroblastes peuvent être obtenus directement des patients de façon peu invasive, les profils d'expression des gènes codants et des miARNs y sont très différents de ceux du cerveau. Les lignées lymphoblastoïdes quant à elles, en plus de ne pas provenir du SNC, ont été transformées afin d'être immortalisées, causant ainsi de nombreuses modifications du profil d'expression génique non représentatif de la physiologie des patients²³³⁻²³⁵. Enfin, si les prélèvements de

cerveau post-mortem sont pertinents en termes de tissu, une variation de l'expression génique dépendante de la cause du décès et des conditions de conservation de l'échantillon a été identifiée, pouvant apporter un biais important des résultats obtenus²³⁶.

Afin de s'affranchir de ces limites, peu de temps avant mon arrivée au laboratoire, notre groupe a choisi d'utiliser des cellules souches issues de biopsies de muqueuse olfactive (Olfactory Mucosa Stem Cells ou OMSCs en anglais). En effet, ce neuro-épithélium contient des cellules souches multipotentes capables de se différencier en différents types cellulaires neuraux (neurones, astrocytes, oligodendrocytes...etc) et représentatives d'un stade précoce de développement. De plus, les OMSCs de patients atteints de maladie de Parkinson, du syndrome de Rett ou de schizophrénie miment, *in vitro*, les anomalies observées dans des neurones dérivés de ces patients^{237,238}, attestant de la pertinence de ce modèle pour l'étude des MND.

Le niveau d'expression de 667 miARNs a été évalué chez 8 patients atteints de TSA et 6 contrôles sains²³⁹. Cette analyse a permis de démontrer l'expression différentielle de 4 miRs chez les patients par rapport aux contrôles. Trois de ces miRs sont sous-exprimés dans les cellules de patients (*hsa-miR-221* ; *hsa-miR-654-5p* et *hsa-miR-656*) tandis que le quatrième montre une sur-expression (*hsa-miR-146a*)(Fig.16a). *mir-656* et *miR-654-5p* semblent spécifiques du lignage des primates et, s'ils ont été associés à différents cancers^{240,241}, ils sont peu exprimés dans le cerveau et leur rôle dans le SNC reste inconnu.

Au contraire, *miR-221* et *miR-146a* sont 100% conservés chez la souris et ces deux miARNs sont fortement exprimés dans le cerveau²³⁹. Si les fonctions de *miR-221* dans le cerveau sont peu connues, ce miARN a été associé à des pathologies du SNC telles que l'astrocytome²⁴², les accidents vasculaires cérébraux²⁴³ ou la maladie d'Alzheimer²⁴⁴. De plus, il est localisé sur le chromosome X, fréquemment impliqué dans les MND, et *FMR1*, dont l'inactivation est responsable du syndrome de l'X Fragile, est l'une des cibles connues de *miR-221*. Enfin, dans une étude de corrélation génotype/phénotype portant une forme de dystrophie rétinienne liée à l'X (DRLX), deux familles ont été rapportées avec une DRLX isolée liée à une délétion de la région Xp11.3-p11.23²⁴⁵ emportant le gène ZNF674 mais n'altérant pas le locus voisin de MIR221. À l'inverse, des délétions plus grande de cette région comprenant cette fois le locus MIR221 ont été rapportées

précédemment dans deux autres familles avec DRLX et DI, suggérant que la survenue de la DI chez ces patients puisse être la conséquence, du moins en partie, de l'absence de MIR221²⁴⁵.

Les fonctions de *miR-146a* feront quant à elles l'objet d'une partie indépendante.

4 - Conclusion

De nombreux miARNs ont été impliqués dans des pathologies du SNC. En dehors des miARNs localisés dans les CNVs associés aux MND, les études se font principalement au niveau de leur expression. Peu de miARNs sont retrouvés en commun dans les différentes publications, en partie à cause d'un biais biologique et technique important: les miARNs sont extraits de tissus différents par des méthodes différentes et la méthode d'analyse de leur expression est également propre à chaque publication. Deux études sur des pathologies distinctes mais utilisant les mêmes tissus trouvent parfois plus de miARNs en commun que des études portant sur la même maladie mais dont la source des échantillons varie.

Le travail mené par notre groupe en est une bonne illustration. La signature identifiée dans les OMSCs n'est pas conservée dans les PBMCs des patients où aucun des 4 miARNs n'est dérégulé (Fig.16B). En revanche, seule la sous-expression de *miR-656* n'est pas retrouvée dans les fibroblastes de patients TSA (Fig.16C). L'expression de ces miARNs a également été analysée sur des fibroblastes de patients avec DI sans TSA et la sur-expression de *miR-146a* est conservée tandis que *miR-221* et *miR-656* sont sur-exprimés (Fig.16C). Le choix du tissu utilisé pour mener ce type d'études est donc crucial et une harmonisation des techniques d'extraction et d'analyse rendrait les résultats plus faciles à comparer.

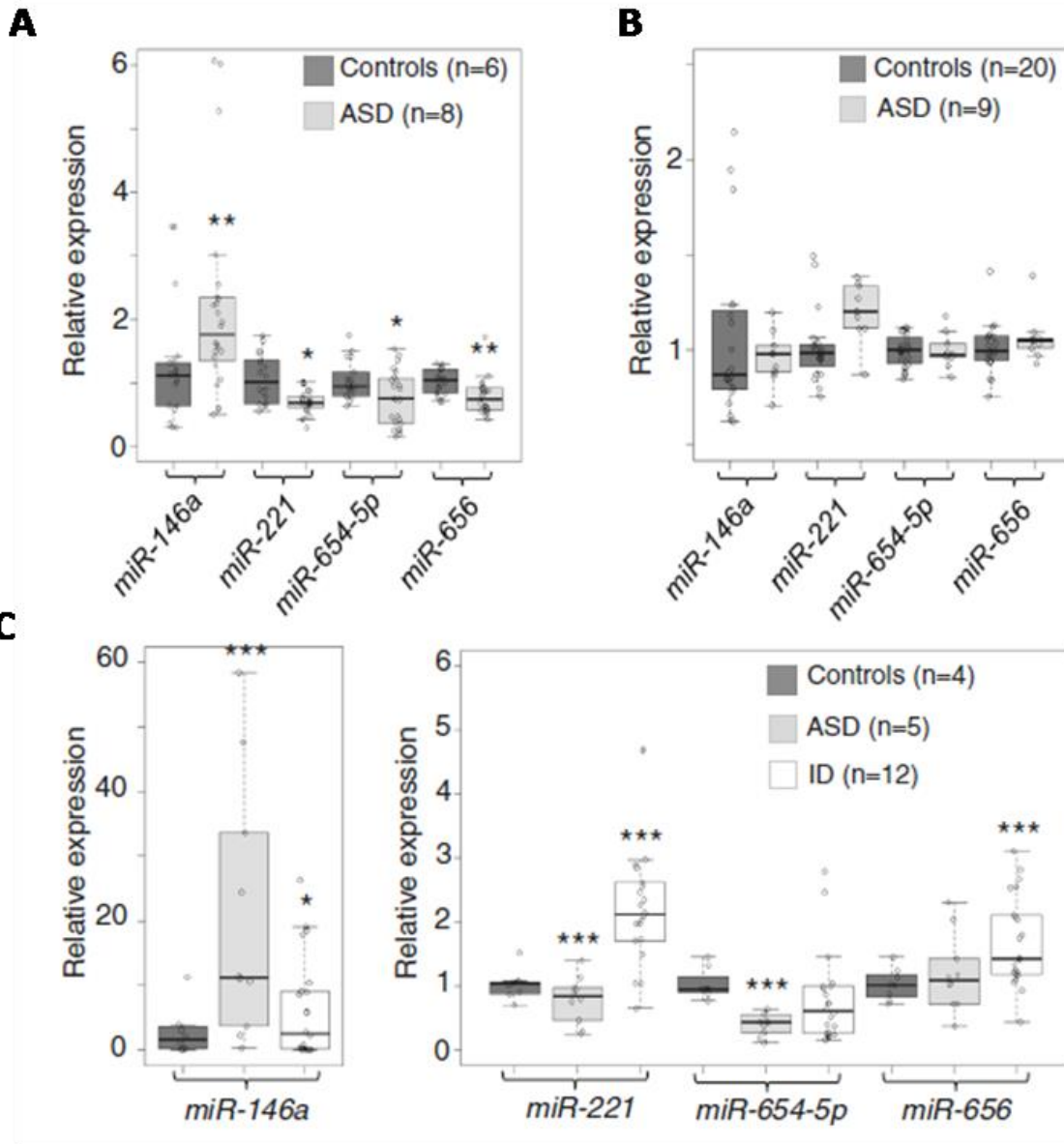


Figure 16: Identification d'une signature de 4 miARNs dans les TSA (extrait de Nguyen et al. 2016). Les boxplots représentent le niveau d'expression des quatre miARNs *miR-146a*, *miR-221*, *miR-654-5p* et *miR-656* dans (A) les OMSCs de patients TSA, (B) le sérum de patients TSA et (C) les fibroblastes de patients TSA et DI.

IV – Objectifs des travaux de thèse

Les MND sont des maladies fréquentes et très handicapantes avec une prévalence de ~3% dans la population générale et très handicapantes. Elles constituent donc l'un des plus grands défis socio-médico-économiques de notre époque. Les avancées technologiques dans le domaine de la génomique ont permis un rapide progrès dans l'identification de variants génétiques responsables. Pourtant, la moitié des cas de MND restent aujourd'hui inexpliqués. Cela s'explique en partie par le fait que les facteurs non génétiques tels que les facteurs environnementaux et les modifications épigénétiques constituent une part importante de l'étiologie des MND.

Peu avant mon arrivée au laboratoire, notre groupe a identifié une signature de 4 miARNs dérégulés de façon persistante dans les OMSCs de patients atteints de TSA. La conservation de *miR-656* et *miR-654-5p* étant restreinte aux primates, il est difficile de les étudier dans un contexte pertinent, particulièrement *in vivo*. *miR-146a* et *mir-221* sont en revanche conservés chez la souris, rendant leur étude dans un modèle vivant possible.

Mes travaux de thèse ont eu deux principaux objectifs. Le premier fut d'identifier les miARNs les plus fréquemment dérégulés dans les TSA, ce que j'ai fait par recherche bibliographique, et comparer ces observations à la signature miARN que notre groupe a identifié. Mon second et principal objectif fut de caractériser le rôle de *miR-146a* dans le neurodéveloppement en utilisant une combinaison de modèles *in vitro* et *in vivo* humains et souris.

La première partie de mes travaux s'appuie sur une méta-analyse regroupant toutes les études d'expression de miARNs dans les TSA et confirme la pertinence de *miR-146a* dans l'étiologie des MND.

Une seconde partie rapporte l'étude de l'impact de la sur-expression de *miR-146a* dans un modèle *in vitro* de progéniteurs neuraux humains et plus particulièrement sur leurs capacités de prolifération et différenciation.

La troisième partie porte sur l'analyse d'un modèle murin invalidé pour le gène

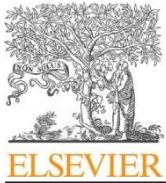
Mir146a dans le contexte du neurodéveloppement mais aussi au niveau neuro-anatomique et comportemental chez l'adulte.

Enfin, l'effet de la dérégulation de *miR-146a* sur les fonctions astrocytaires murins en culture est décrit dans la dernière partie.

RÉSULTATS

I – L'émergence du rôle des microARNs dans la survenue des troubles du spectre autistique

Notre groupe s'intéresse à l'implication des miRNAs dans l'étiologie des MND et a identifié peu avant mon arrivée au laboratoire une signature de quatre miARNs dérégulés dans des cas de TSA. Par ailleurs, cette signature miARNs est partiellement partagée avec des patients souffrant de DI. Afin de savoir si cette signature était représentative des observations faites par d'autres groupes, nous avons réalisé une méta-analyse de l'ensemble des études d'expression de miARNs dans les TSA publiées avant 2016. Cette analyse a fait l'objet d'un article dans *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* dont je suis premier signataire.



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience and Biobehavioral Reviews

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neubiorev

Review article

The emerging roles of MicroRNAs in autism spectrum disorders

Julien Fregeac^{a,b}, Laurence Colleaux^{a,b}, Lam Son Nguyen^{a,b,*}^a INSERM UMR 1163, Laboratory of Molecular and Pathophysiological Bases of Cognitive Disorders, Imagine Institute, Necker-Enfants Malades Hospital, 24 Boulevard du Montparnasse, 75015 Paris, France^b Paris Descartes—Sorbonne Paris Cité University, 12 Rue de l'École de Médecine, 75006 Paris, France

a r t i c l e i n f o

a b s t r a c t

Article history:

Received 15 February 2016

Received in revised form 27 May 2016

Accepted 22 October 2016

Available online 25 October 2016

Keywords:

Autism spectrum disorders

microRNA

Epigenetic

Biomarkers

Autism spectrum disorders (ASD) are heritable neurodevelopmental conditions characterized by impairment in social interaction and communication and restricted, repetitive, stereotyped patterns of behavior. ASD likely involve deregulation of multiple genes related to brain function and development. MicroRNAs (miRNAs) are post-transcriptional regulators that play key roles in brain development, synapse formation and fine-tuning of genes underlying synaptic plasticity and memory formation. Here, we review recent studies providing genetic and molecular links between miRNA deregulation and ASD pathophysiology. These findings highlight the potential of miRNAs as both biomarkers and therapeutic tools in ASD.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	730
Genetic architecture of ASD	730
miRNA biogenesis and function	730
2. Genomic variants in miRNA genes in ASD	732
miRNA genes mapping to autism-associated copy number variants	732
Contribution of rare single nucleotide variants (SNVs) to ASD susceptibility	732
3. miRNA deregulation in ASD	732
Summary of miRNA profiling studies	732
Relevant miRNAs for ASD pathology	734
Roles of miR-146a in ASD pathology	734
4. ASD genes involved in miRNAs biogenesis and function	735
5. miRNAs as biomarkers for ASD	736
6. miRNA-based therapy of ASD: opportunities and challenges	736
7. Concluding remarks	737
Competing interests	737
Acknowledgments	737
Appendix A. Supplementary data	737
References	737

* Corresponding author at: INSERM UMR 1163, Institut Imagine, 24 Boulevard du Montparnasse, 75015 Paris, France.

E-mail addresses: julien.fregeac@inserm.fr (J. Fregeac), laurence.colleaux@inserm.fr (L. Colleaux), lam-son.nguyen@inserm.fr (L.S. Nguyen).

1. Introduction

Autism spectrum disorders (ASD) encompass a wide range of neurodevelopmental disorders of early onset generally before three years old (Geschwind, 2009). The main clinical presentations are impaired communication and social skills as well as stereotypic and repetitive behaviors (Bourgeron, 2015; Ronemus et al., 2014). For instance, the patients can show a lack of non-verbal interaction such as eye contact or body movement and posture. The patients can also be easily stressed by a change of habit or environment. All features are described in the Mental Disorders DSM-V Fifth Edition (DSM-V). Different types of autism with multiple levels of severity exist. People suffering from Rett syndrome display profound language alteration and severe psychomotor defects, whereas Asperger patients exhibit stereotypic behaviors and social interaction alteration but no delay in language learning and tend to show curiosity towards their environment (DSM-V). Many children and adults with a diagnosis of ASD have comorbid features such as intellectual disability (ID) and/or epilepsy. Altogether, ASD is relatively common with a prevalence of 4% worldwide (Bourgeron, 2015; Ronemus et al., 2014).

Genetic architecture of ASD

Over the last two decades, much progress has been made to unravel the genetics of ASD. Approximately 10%–15% of individuals with ASD have an identifiable Mendelian condition or genetic syndrome such as Fragile X syndrome, Rett syndrome or tuberous sclerosis (Harris et al., 2008; Jeste et al., 2008; Moretti and Zoghbi, 2006). Cytogenetic studies demonstrated that rare (<1% frequency) inherited or *de novo* copy number variants (CNVs) are 10 times more frequent in the autistic population than in the general population (Bourgeron, 2015; Marshall et al., 2008; Sebat et al., 2007), and account for 10–15% of ASD cases (Bourgeron, 2015; Schaaf and Zoghbi, 2011) (Table 1). The most frequent chromosome abnormalities include 15q11–13 duplication, 2q37 and 22q13.3 deletion (Jacquemont et al., 2006). Lastly, an increasing number of *de novo* point mutations associated with ASD are being discovered. Earlier studies found rare mutations in genes encoding for *NLGN3*, *NLGN4*, *NRXN1*, *SHANK3*, and *SHANK2*, all of which take part in the formation and function of synapses (Autism Genome Project et al., 2007; Berkel et al., 2010; Durand et al., 2007; Jamain et al., 2003). More recently, whole exome sequencing in hundreds of trios or quartets identified *de novo* mutations in an enriched set of genes including *SCN2A*, *CHD8*, *DYRK1A*, *POGZ*, *GRIN2B*, and *KATNAL2* (Jossifov et al., 2012; Neale et al., 2012; O’Roak et al., 2012b). Collectively, *de novo* single gene mutations may account for 1% of ASD cases. More than 120 genes and 50 genomic loci have been reported to be associated with ASD, accounting for only 20–30% of cases (Table 1); the vast majority remains unexplained. The current hypothesis proposes that ASD is caused by complex interaction between genetic, epigenetic and environmental factors (Bourgeron, 2015; Hu, 2013; Loke et al., 2015; Schaaf and Zoghbi, 2011).

Interestingly, ASD associated genes have been shown to be involved in a restricted number of pathways. For example, O’Roak et al. identified 6 genes with recurrent disruptive *de novo* mutations out of 44 tested candidate genes (O’Roak et al., 2012a,b); among these 6 genes, 5 are involved in the β -catenin/chromatin remodeling network. Meta analysis of all ASD genes found that they are enriched for pathways involving gene expression regulation, protein synthesis and degradation, cytoskeleton dynamics, and synaptic structure and function (Bourgeron, 2015; O’Roak et al., 2012a,b).

Different studies have focused on the implication of environmental risk factors and epigenetics in ASD during the past years. Firstly, children exposed *in utero* to sodium valproate (a potent

inhibitor of histone deacetylase activities used for decades in the treatment of epilepsy and migraine) have significant increased risk to develop behavioral and neuroanatomical abnormalities similar to those seen in ASD (Williams et al., 2001). Secondly, epigenetic modification has been proposed through gene expression profiling of monozygotic twins discordant for ASD diagnosis in which differentially expressed and neurologically relevant genes were identified (Geschwind, 2009). This hypothesis is also supported by the observation that the most common recurrent cytogenetic abnormalities in ASD involve maternally derived duplications of the imprinted domain on chromosome 15q11–13 (Marshall et al., 2008). Finally, abnormal methylation patterns have been detected at several candidate genes in ASD patients (Gregory et al., 2009). Taken altogether, these studies demonstrate that epigenetic modifications have a significant role in ASD etiology.

Other non-genetic factors are currently being explored in the context of ASD pathology. Studies on microRNA (miRNA), one of such factors, have shown promising results, which indicate that miRNAs have direct roles in ASD. This review discusses all evidence linking miRNA genes and miRNA deregulation to ASD to date. Focus is then drawn onto the miRNAs most relevant for ASD pathology and suggestive directions for future researches.

miRNA biogenesis and function

miRNAs are small non-coding RNAs of 20–22 nucleotides (Kim et al., 2009). They function as post-transcriptional regulators by targeting the 3′ untranslated region (UTR) of messenger RNAs (mRNAs) (Mellios and Sur, 2012), resulting in translation inhibition or mRNA degradation. There are currently 2588 annotated miRNA genes in the human genome (<http://www.mirbase.org>). Each miRNA can potentially target hundreds of mRNAs (Huntzinger and Izaurralde, 2011). Overall, up to 50% of the human genes are predicted to be regulated by miRNAs. Moreover, they are involved in all important functions of the cell: differentiation, proliferation and apoptosis as well as developmental and metabolic mechanisms (Huntzinger and Izaurralde, 2011; Kim et al., 2009; Olive et al., 2015).

miRNAs undergo a series of maturation steps before being functional. RNA Polymerases II or III first transcribe the miRNA gene into a precursor form called pri-miRNA which contains a hairpin loop (Fig. 1). A significant number of miRNAs (~25%) form clusters and are transcribed together in a single poly-cistronic pri-miRNA. The pri-miRNA is then cleaved into pre-miRNA by the microprocessor complex composed of two subunits: DROSHA and DGCR8 (Fig. 1) (Winter et al., 2009). When several miRNA precursors are present on the same transcript, each of them is processed independently. The pre-miRNA of 70 nucleotides is then transported to the cytoplasm by EXPORTIN 5 (Fig. 1). In the cytoplasm, the RNase DICER interacts with the RNA binding protein TRBP to cleave the hairpin loop of the pre-miRNA (Fig. 1). As a result, a duplex of two potentially mature miRNAs is created. This duplex is then dissociated; and the functional strand of the mature miRNA together with the ARGONAUTE proteins (AGO 1–4), DICER and TRBP form the RNA-Induced Silencing Complex (RISC) that performs gene silencing (Fig. 1) (Meister, 2013). Only one strand is usually incorporated into the RISC, whilst the other is degraded (Fig. 1).

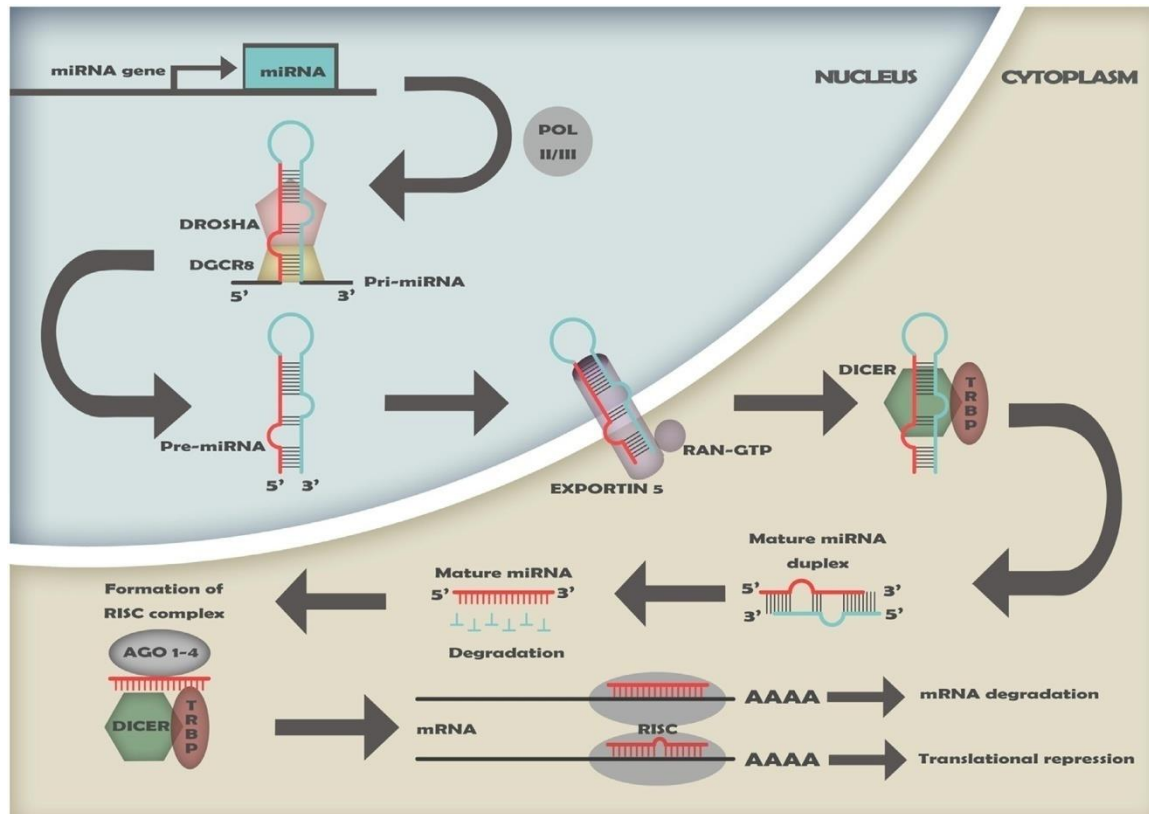
Interestingly, new “non-canonical” biogenesis pathways are being discovered (Abdelfattah et al., 2014; Winter et al., 2009). Most of them do not involve the microprocessor complex but need DICER to function (Abdelfattah et al., 2014; Cheloufi et al., 2010). Little is known regarding the proportion of miRNAs that are processed in these non-canonical fashions. All known non-canonical biogenesis pathways of miRNAs and other functionally and structurally related small RNAs have been recently reviewed by Abdelfattah et al. (2014).

Table 1

Genetic architecture of ASD.

Genetic causes of ASD	Percentage of cases	Examples
Syndromes with autistic traits	10–15%	Fragile × syndrome, Rett syndrome
Copy number variations	10–15%	15q11–13 duplication, 22q13.3 deletion
<i>De novo</i> point mutations	~1%	<i>NRXN1</i> , <i>SHANK3</i> , <i>SCN2A</i> , <i>CHD8</i>
Unknown	70–80%	

20%–30% of ASD cases can be explained by genetic events: Monogenic syndromes with autistic traits account for 10–15% of the cases. Inherited and *de novo* CNVs are the cause of the pathology in 10–15% of ASD patients. Finally, ~1% of cases are due to *de novo* point mutations.

**Fig. 1.** The canonical miRNA biogenesis and mode of action.

Polymerases II or III transcribes the miRNA gene into a pri-miRNA that is cleaved by the microprocessor complex to give a pre-miRNA of ~70 nucleotides. After its transport into the cytoplasm by EXPORTIN 5, the pre-miRNA is processed by the RNase DICER and TRBP. This process creates a mature miRNA duplex that will unwind. One of the two mature miRNAs is degraded to leave only one functional miRNA. Then, the RISC complex assembles, composed of the mature miRNA, the ARGONAUTE proteins, DICER and TRBP. Depending on the complementarity between the miRNA seed and the mRNA binding site, the RISC complex either degrades the mRNA target or prevents its translation.

To allow easy distinction between miRNA genes and mature miRNA, the following official nomenclatures have been adopted by the field. Gene and/or genomic locus names are given the pre-fix *MIR*. Mature miRNAs are called *hsa-miR-1-5p* or *3p* wherein the first 3 letters indicate the species (*hsa* stands for *Homo sapiens*, *mmu* stands for *Mus musculus*), and the '5p' and '3p' indicate the strand from which the mature miRNA is produced (see Fig. 1). Sometimes, the mature miRNA that is degraded and likely to be non-functional is also marked with the symbol '*'.¹

miRNA relies on its seed region to find its mRNA targets. The miRNA seed is defined as the region between positions 2–7 from the miRNA 5'-end (Filipowicz et al., 2008). The level of complementarity between the miRNA and the mRNA sequence decides the fate of the mRNA. Perfect base pairing between the miRNA seed and the mRNA target sequences leads to degradation of the

targeted mRNA by the RISC complex and the AGO2 endonuclease (Hammond, 2015; Kim et al., 2009). In most cases, however, the base pairing is imperfect leading to translational repression of the targeted protein (Fig. 1).

miRNAs play vital roles during development and throughout life. It is therefore not surprising that a significant number of miRNAs has been found deregulated in a wide range of maladies including psychiatric, neurodevelopmental and neurodegenerative disorders (Feng et al., 2009; Hebert and De Strooper, 2009; Mellios and Sur, 2012; Nguyen et al., 2016), cardiovascular diseases (Zhao et al., 2007) and different types of cancers (Croce, 2009). However, the underlying causes of miRNA deregulation remained unresolved in most cases. The stability of these small RNAs does not follow a general pattern, the turnover rate is dependent on each miRNA (Bail et al., 2010). Considering that a large portion of the miRNAs is transcribed in cluster, it is believed that the pathological deregulation of miRNAs is caused by events affecting the maturation steps rather than by differential expression. It is possible that the newly or yet to be discovered non-canonical miRNA processing pathways are responsible for the observed deregulation.

¹ WHO International Program on Chemical Safety Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation, 2001. Retrieved from <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>.

2. Genomic variants in miRNA genes in ASD

miRNA genes mapping to autism-associated copy number variants

Since 2006, CNVs have been recognized as important genetic factors in ASD (Jacquemont et al., 2006; Sebat et al., 2007). Since this original finding, the majority of CNV studies in ASD have focused on the functional impact of rare CNVs in ASD and the biological networks altered in the patients carrying these CNVs. However, only protein-coding genes but not miRNAs contained within the aneusomic fragments were considered for these studies. miRNAs present in deleted and duplicated CNV loci may cause dosage imbalance of their gene targets. These CNV-miRNAs could also impair the global processing and biogenesis of all miRNAs by targeting key proteins in this pathway. Surprisingly, only 2 reports have tried to elucidate the biological and functional significance of miRNAs present in autism-associated CNV loci.

Using the information available from the Autism Database (AutDB) (Basu et al., 2009), Vaishnavi and collaborators analyzed the gene content of 378 CNVs consistently reported to be associated with ASD for the presence of miRNA genes. 42 CNV loci (12 deletions, 8 duplications and 22 mixed) harboring 72 miRNAs were identified (Table S1). Interestingly, some of the corresponding miRNA transcripts (such as *hsa-miR-484*, *hsa-miR-598*, *hsa-miR-7*, *hsa-miR-195* and *hsa-miR-211*) were previously found to be deregulated in post-mortem brain and lymphoblastoid cell lines derived from ASD patients (Abu-Elneel et al., 2008; Ghahramani Seno et al., 2011; Sarachana et al., 2010).

The second study, carried out by Marrale and collaborators (Marrale et al., 2014), investigated the association between *de novo* CNVs and miRNA genes using computational method based on Monte Carlo randomization. The aim of this study was to test for over-representation of miRNA genes in ASD-associated *de novo* CNVs. Of the total 178 *de novo* CNVs from 192 examined ASD patients, 64 were found to overlap with at least one miRNA gene. In majority of the cases, the number of miRNA genes associated with CNVs is proportional to the CNV length. However, some chromosomes do not follow such linear trend and are characterized by a large number of miRNA genes associated with CNVs; 24 miRNA genes were found over-represented in such *de novo* CNVs. Two miRNA genes from this group, *MIR4436b-1* and *MIR4436b-2*, likely play significant roles in ASD since they have not been reported in CNVs from unaffected individuals. Of note, 8 miRNA genes are shared between the two studies (*MIR429*, *MIR200a*, *MIR200b*, *MIR149*, *MIR85*, *MIR1306*, *MIR1286* and *MIR649*). Collectively, these studies support the hypothesis that miRNA expression defects caused by CNV of the corresponding gene may contribute to the etiology of ASD.

Contribution of rare single nucleotide variants (SNVs) to ASD susceptibility

Polymorphisms within miRNA genes have been reported to be rare with only approximately 10% of human pre-miRNAs having documented SNPs (miRNA-SNP) and <1% of miRNAs having SNPs in the seed region (Iwai and Naraba, 2005; Saunders et al., 2007). Besides, variants in pre-miRNA genes that locate outside the seed regions may also affect miRNA expression and maturation (Li et al., 2010; Sun et al., 2009). As an example, a G–U transition identified in the human mature *MIR125a* seed region significantly blocked the processing of pri-miRNA to pre-miRNA, and reduced miRNA-mediated translational suppression (Duan et al., 2007). Variants in the miRNA seed regions can have dramatic consequences by abolishing the interaction between the miRNA and its many target genes. Genotype–phenotype analysis of an A>G

SNP located within the mature *mmu-miR-717* seed region showed associations with growth quantitative trait locus and was identified in the lean mouse strain 129/Sv (Kunej et al., 2010). The first Mendelian disease caused by a mutation in the seed region of *MIR96*, responsible for hearing loss in human and mouse, was reported a few years ago (Lewis et al., 2009; Mencia et al., 2009). Lastly, convincing evidence for the contribution of miRNA-SNP to neuropsychiatric diseases came from a Genome-Wide Association Study in schizophrenia showing strong association with the common variant *rs1625579*, mapping within an intron of the *MIR137* transcript, a known regulator of neural stem cell proliferation and differentiation (Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study, 2011).

The possible contribution of variants in miRNA genes in ASD has been only very recently explored (Toma et al., 2015). A case–control association study was performed by genotyping 350 common SNPs (Minor Allele Frequency > 0.05) targeting 163 miRNA genes and clusters selected on the basis of their validated target genes, their function in the brain or their known association with psychiatric diseases. 1085 ASD cases and 1088 controls were genotyped and suggestive associations were reported for five SNPs in *MIR219-1*, cluster *MIR133b/MIR206*, cluster *MIR106b/MIR93/MIR25* and cluster *MIR17/MIR18a/MIR19a/MIR20a/-MIR19b-1/MIR92a-1*. An additional sample of 241 ASD patients was screened for putative pathogenic rare variants in eight of these pre-miRNA genes (*MIR133b*, *MIR206*, *MIR17*, *MIR18a*, *MIR19a*, *MIR20a*, *MIR19b-1* and *MIR92a-1*). However, only one rare variant was found in the *MIR133b* gene, which was predicted to be neutral. Lastly, the same group investigated the presence of rare variants in 701 pre-miRNA genes by whole exome sequencing (WES) in 101 individuals from 30 ASD families. No variant within the seed region was found but 9 changes, which are located within the mature miRNAs and predicted to alter the hairpin stability, were identified. It is worth noting that 3 variants are mapped to ASD-associated CNVs (Table S1). While awaiting further replication studies, these results support the hypothesis that genomic miRNA variations may contribute to the etiology of ASD.

3. miRNA deregulation in ASD

Summary of miRNA profiling studies

While genomic evidence infers only an association between certain miRNAs and ASD, miRNA expression profiling studies have been able to provide a more direct interaction. Since 2008, there have been 10 studies looking at miRNAs deregulated in different tissue sources derived from ASD patients (Table 2). The tissue sources range from lymphoblastoid cell lines (Ghahramani Seno et al., 2011; Sarachana et al., 2010; Talebizadeh et al., 2008), blood serum (Mundalil Vasu et al., 2014), peripheral blood mononuclear cells (Huang et al., 2015), to different post mortem brain regions (Abu-Elneel et al., 2008; Ander et al., 2015; Mor et al., 2015; Stamova et al., 2015), olfactory mucosal stem cells (OMSC) and primary skin fibroblasts (Nguyen et al., 2016). Each of which presents its own advantages and disadvantages relevant for neurodevelopmental disorders. Blood based sources are easily obtainable and share some transcriptomic similarity with that of the brain but certainly they do not share the same developmental milestones; post mortem brain tissues are clinically relevant but prone to defects introduced by cause of death and post-death handling; finally OMSC, being a neural stem cell, may provide a window into the early differentiation process of the brain but are subjected to variability caused by *in-vitro* culturing techniques.

In addition to the use of different tissue sources, three other main parameters make the comparison of these studies difficult.

Table 2
Summary of all miRNAs profiling studies and the different methodologies used.

Code	Reference	Sampling method			Age Group	Processing methods			Analysis methods			
		Tissue Source	# ASD	# Control		Extraction Methods	Assay Type	# miRNA studied	Calculation	Statistic	Threshold	#miRNA Reported
1	Nguyen et al. (2016)	OMSC	8	6	Adult	Small RNA enrichment using miRVana miRNA Isolation kit (Ambion)	Taqman microRNA Arrays (Life Technologies)	667	OOCT method using geometric mean of 7 reference miRNAs and average of controls	Wilcoxon rank sum test, Bonferroni correction	Adjusted $P < 0,05$	4
		Primary Skin Fibroblast	5	4	Children			4		Student's 2 tailed t -test	$P < 0,05$	3
2	Stamova et al. (2015)	Post mortem, STS and PAC	8	6	Children Ado Adult	Total RNA extraction using RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion)	Affymetrix miRNA 3.0 microarray	1733	RMA normalisation, Partek Genomic Suite V.6.6	ANOVA, Spearman rank correlation	$P < 0,005$, fold change $> 1,2$	58 ^a
3	Mor et al. (2015)	Post mortem, frontal cortex BA10	12	12	Adult	Total RNA extraction using miRNeasy Kit (QIAGEN), Illumina's TruSeq Small RNA Prep Kit	miRNA-Seq	All inmiRBase	DESeq Algorithm in miRAnalyzer	DESeq Algorithm	FDR $\leq 0,05$	23
4	Ander et al. (2015)	Post mortem, STS and PAC BA 41/42	10	8	Children Ado Adult	Total RNA extraction using RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion)	Affymetrix miRNA 3.0 microarray	1733	RMA normalisation, Partek Genomic Suite V.6.6	ANOVA	$P < 0,005$, fold change $> 1,2$	6
5	Huang et al. (2015)	Peripheral blood mononuclear cell	5	5	Children	Total RNA extraction using Trizol	RiboArray miDETECT Human Array (RIBOBIO)	2578	Quantile normalisation	Rank Product Method	$P < 0,05$	44
6	Mundalil Vasu et al. (2014)	Blood serum	55	55	Children Ado	Total RNA extraction using miRNeasy Serum/Plasma kit (QIAGEN)	Human Neurological Development & Disease miRNA PCR array and a custom made array (SABiosciences)	125	OOCT method	Student's 2-tailed t -test	$P < 0,05$	13
7	Sarachana et al. (2010)	Lymphoblastoid cell line	5	9	Children Ado	Trizol extraction followed by miRVana miRNA Isolation Kit (Ambion)	miRNA labeling using miRNQa Labeling Kit (Ambion) and hybridized on custom microarray	716	Quantile-quantilenormalisation	Pavlidis template matching in TIGR Multiexperiment Viewer V3.1	$P < 0,05$	43
8	Ghahramani Seno et al. (2011)	Lymphoblastoid cell line	20	22	Not specified	Total RNA extraction using miRVana miRNA Isolation kit (Ambion)	Illumina Universal-12 BeadChips	1536	Normalised using Bead Studio Software (Illumina) and quantile normalisation	Generalised estimating Equations	$P < 0,05$	25
9	Abu-Elneel et al. (2008)	Post mortem, cerebellar tissue	13	13	Children Ado Adult	Total RNA extraction using miRVana miRNA Isolation kit (Ambion)	Multiplex Taqman assays (Life Technologies)	466	Normalization to constant and to a base sample	Kolmogorov-Smirnov z-test, Bonferroni Correction	$P < 0,05$	28
10	Talebizadeh et al. (2008)	Lymphoblastoid cell line	6	6	Children Ado	Total RNA extraction using miRVana miRNA Isolation kit (Ambion)	μ Paraflo™ miRNA microarray (LC Sciences)	NS	LOWESS normalisation	Student's 2 tailed t -test, Bonferroni Correction	$P < 0,0003$	9

Abbreviation: OMSC, olfactory mucosal stem cell; Ado, adolescence; STS, superior temporal sulcus; PAC, primary auditory cortex; FDR, false discovery rate; BA, Brodmann's area, PMI, post mortem interval; NS, not specified.

^a miRNAs differentially expressed by regions (STS vs PAC) or age in ASD or control cohort.

Firstly, neuroanatomical evidence suggests that the ASD brain undergoes a period of accelerated growth during the first 2–3 years of life, followed by a period of growth arrest or impairment during later years (Amaral et al., 2008); the miRNA profiles from ASD patients of different age groups recruited in these studies, therefore, could reflect those of different developmental stages. Secondly, not all miRNAs were assessed by all studies, and the sensitivity and the ability to measure the miRNA expression depend greatly on the type of assays employed: Taqman assay is the most specific, miRNA-Seq could be hampered by mis-mapping of closely related miRNA species, and microarray suffers from background noise. Lastly, the formulas and the stringency of the normalisation and statistical algorithms applied to each dataset can drastically affect the final outcome i.e. the identification of the significantly deregulated miRNAs in ASD; it is possible that there are miRNAs that were deregulated in the same trend in some studies but did not reach the statistical cutoffs. Taken altogether, it is impossible to directly compare these 10 studies to each other since no consistent methodology in cohort sampling, type of assay nor analysis was employed (Table 2). As such, we need to exert careful consideration while determining the miRNAs most relevant for ASD. For subsequent meta-analyses, the study by Stamova and colleagues was not included; this study reported miRNAs whose expressions differ between the superior temporal sulcus and primary auditory cortex or change with age within the ASD or control cohorts and not between ASD patients and controls (Stamova et al., 2015). This analysis is thus difficult to integrate to that of the remaining 9 studies, which reported miRNAs differentially expressed between the two cohorts (ASD patient and control).

Relevant miRNAs for ASD pathology

Upon examining the results from the nine compatible studies closely, there appears to be a lack of consensus. Of the 156 unique miRNAs reported, only 7 miRNAs were found by 3 different studies while only 19 miRNAs overlapped between 2 studies (Table 3). Of these 26 recurrent miRNAs, only 12 (<50%) were found deregulated in the same trend in all reports. 12 of the 14 miRNAs, which were found deregulated in opposite directions, can be seen in any combination of cell types, for examples, post mortem brain and LCL (*hsa-miR-23a-3p*), LCL and serum (*hsa-miR-181b-5p*) or PBMC and LCL (*hsa-miR-195-5p*) etc, which could reflect the effects of tissue or developmental stage specific regulation; 2 of these 14 miRNAs were found deregulated in opposite trend in LCL (*hsa-miR-219-2-3p* and *hsa-miR-455-5p*), thus, could be false positives. Interestingly, eight of these 26 miRNAs were reported by Stamova and colleagues to be differentially expressed with age in their ASD cohort (*hsa-miR-93-5p*, *hsa-miR-92a-3p* and *hsa-miR-146b-5p*) and control cohort (*hsa-miR-654-5p*, *hsa-miR-219-2-3p*, *hsa-miR132-3p*, *hsa-miR-103* and *hsa-miR-320a*); this potentially provide an additional explanation for the lack of coherent reported trend of deregulation among these studies (Stamova et al., 2015). Further assessment of their profiles in the dorsal frontal cortex of the human brain throughout development reveals that 6 of these recurrent miRNAs are expressed at a low level (blue profiles, Table 3), *hsa-miR-16-2-3p* and *hsa-miR-663a* are almost undetectable; whereas the others are maintained at high and constant level (red profiles, Table 3) (Ziats and Rennert, 2014). Of note, *hsa-let-7a-5p* is the most highly expressed in the brain, with a 3 to 100-fold excess relative to other expressed miRNAs, followed by *hsa-miR-103-3p* and *hsa-miR-146b-5p*. While the apparent weak overlap could be explained by the three main differences mentioned in the previous section, it complicates the identification of which miRNAs are the most relevant to ASD pathology. More effort is needed to functionally validate these findings.

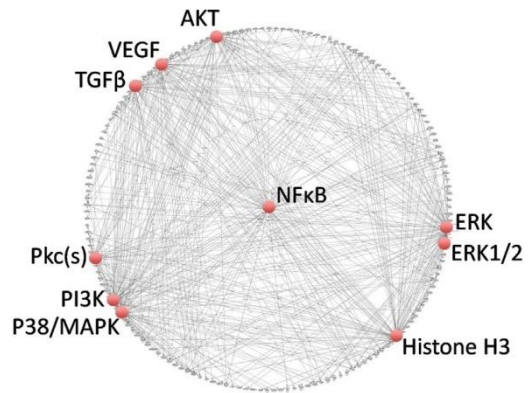


Fig. 2. Top 10 upstream regulators of the 286 validated miRNA targets.

Each line represents a validated interaction between the targets (small dots) and their upstream regulators (red dots). Graph was generated using Ingenuity Pathway Analysis tool. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

To gain insight into the functional consequences of the deregulated miRNAs, we integrated their known targets compiled in MiRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/index.php>) and Ingenuity Pathway Analysis. The 26 overlapping miRNAs have been experimentally demonstrated to target 283 genes, amongst which, 136 are involved in the development and function of the nervous system (adjusted enrichment $P = 4.13E-26$) (Table S2). Many of these genes play fundamental roles in the development of the brain including *FMR1* (*hsa-miR-221*) (Zongaro et al., 2013), *MECP2* (*hsa-miR-132-3p*) (Haenisch et al., 2015), *NEUROD1* (*hsa-miR-19b-3p*) (Zhang et al., 2011) etc. Misregulation of one or several of these genes could negatively impact the function of the brain. Unfortunately, this also points out the complexity and the challenge confronting therapy development, which of course needs to be able to specifically restore the function of these genes without perturbing others. In addition, it is interesting that *DICER1*, a gene which encodes for an essential component of the miRNA processing complex (Fig. 1), is itself targeted by three different miRNAs: *hsa-let-7a*, *hsa-miR-103a-3p* and *hsa-miR-221-3p*, potentially impairing the entire miRNA machinery. Investigation into the upstream transcriptional regulators of these 283 target genes revealed that many of them are effectors of immune response. The top ten upstream regulators (adjusted enrichment $P < 1.34E-29$) are mostly complexes in the classical inflammatory pathways such as NFκB, TGF-β, PI3K, P38/MAPK, AKT, ERK and VEGF (Fig. 2). This suggests that these 26 miRNAs intertwine closely with these processes, further advocating for the involvement of inflammation in ASD, an emerging concept which is gaining increasing support (Voineagu and Eapen, 2013).

Roles of miR-146a in ASD pathology

One miRNA, *hsa-miR-146a-5p*, stands out as the strongest candidate for ASD pathology. This miRNA is the only miRNA that has been found significantly upregulated by 3 studies in 4 different cohorts of ASD patients and in 4 different cell types including post mortem brain (Mor et al., 2015), OMSC and primary skin fibroblast (Nguyen et al., 2016) and LCL (Talebzadeh et al., 2008). The patients examined belong to distinct age groups ranging from children to adolescents and adults, suggesting that deregulation of this miRNA is constant throughout development. More interestingly, as OMSC used by Nguyen et al. (2016) is a neural stem cell which could provide a window into early progenitor cell development, one can speculate that deregulation of *hsa-miR-146a-5p* occurs much earlier during embryonic development and, thus,

Table 3

miRNAs recurrently reported to be deregulated in ASD by more than one study.

miRNA	References	Tissues in which deregulation were reported							Deregulation Reported	Expression in Dorsal Frontal Cortex				Validated targets with neuronal functions
		Count	Br	OMSC	LCL	Fib	PBMC	Ser		Infancy	EC	LC	Ado	
miR-146a-5p	(1) (8) (10)	4	◆	◆	◆	◆			Up					BRCA2, CD40LG, CFH, CXCR4, EGFR, ERBB4, FADD, FAS, GRIA3, KCNK2, IFNG, L1CAM, MED1, NFKB1, NLGN1, NOS2, NOTCH1, ROCK1, TLR2, TLR4, SYT1, WASF2
miR-106b-5p	(6) (7) (9)	3	◆		◆			◆	Mixed					BCL2L11, CCND1, EOMES, MAPK14, RBL1, RBL2
miR-132-3p	(7) (9) (10)	3	◆		◆				Mixed					ARHGAP32, BTG2, CRK, EP300, HBEGF, MECP2, MMP9, NR4A2, RASA1, SIRT1
miR-195-5p	(5) (6) (7)	3			◆		◆	◆	Mixed					BACE1, BCL2, BCL2L2, CCND1, CDC42, CDK4, CDK6, E2F3, SIRT1
miR-19b-3p	(3) (5) (6)	3	◆		◆		◆		Mixed					ATXN1, CYP19A1, GCM1, MYCN, NEUROD1, PTEN, TLR2
miR-23a-3p	(7) (9) (10)	3	◆		◆				Mixed					ATAT1, CHUK, CXCL12, FOXO3, HES1, IL6R, LMNB1, POU4F2, PPARGC1A, PTPN11
miR-320a	(6) (9) (10)	3	◆		◆			◆	Mixed					AQP4, MAPK1, TAC1
let-7a-5p	(3) (5)	2	◆				◆		Down					CASP3, CASP9, DICER1, FOXA1, HRAS, IGF2, IL6, ITGB3, KRAS, LIN28A, NF2, PRDM1
miR-103	(5) (7)	2			◆		◆		Mixed					CAV1, CDK2, CREB1, DICER1, ID2, NF1
miR-146b-5p	(9) (10)	2	◆		◆				Up					NFKB1
miR-148b-3p	(7) (9)	2	◆						Down					CAMK2A, CSF1, PIK3CA, ROCK1
miR-15a	(5) (9)	2	◆				◆		Mixed					AKT3, APP, BCL2L1, BMI1, BRCA1, CCND1, CCDN2, MYB, TP53, WNT3A
miR-15b-5p	(5) (9)	2	◆		◆		◆		Mixed					CCND1
miR-16-2-3p	(5) (7)	2			◆		◆		Down					RARB
miR-181b-5p	(6) (8)	2			◆			◆	Mixed					GRIA2, IGF1R, SIRT1, VSNL1, XIAP
miR-211-5p	(3) (7)	2	◆		◆				Down					IL11, KCNMA1, POU3F2, RAB22A
miR-219-2-3p	(3) (7)	2			◆				Mixed					
miR-221	(1)	2		◆		◆			Down					CDKN1B, DDIT4, DICER1, DVL2, ERS1, FMR1, GRIA3, KCNK2, KIT, MEOX2, TCF12, TP53, ZEB2
miR-23b-3p	(7) (10)	2			◆				Up					LMNB1, MET, SMAD3, SMAD4, SMAD5, SRC, VHL
miR-451a	(3) (5)	2	◆				◆		Mixed					AKT1, MMP2, MYC
miR-455-5p	(7) (8)	2			◆				Mixed					
miR-494	(3) (5)	2	◆				◆		Up					HSF2
miR-654-5p	(1)	2		◆		◆			Down					
miR-663a	(6) (10)	2			◆		◆	◆	Mixed					CDK1, HSPG2
miR-92a-3p	(5) (10)	2			◆		◆		Down					ERS2, MAP2K4, MYLIP, TGFB2, TP63
miR-93-5p	(7) (9)	2	◆		◆				Up					CDKN1A, E2F1, ITGB8, LATS2, MAPK9, PURA, STAT3, VEGFA

Abbreviation: Br, post mortem brain; OMSC, olfactory mucosal stem cell; LCL, lymphoblastoid cell line; Fib, primary fibroblast; PBMC, peripheral blood mononuclear cell, Ser, blood serum; EC, early childhood; LC, late childhood; Ado, adolescence

The miRNAs are ranked based on their reported occurrence; reference codes are given according to those used in Table 2. Expression data were extracted from Ziats and Rennett (2014); deepening blue colors indicate decreasing expression value (RNA-Seq read counts less than 200), deepening red colors indicate increasing expression value (RNA-Seq read counts superior to 200). Validated targets were compiled from MirTarBase and functionally classified using Ingenuity Pathway Analysis.

contributes to the emergence of ASD. Deregulation of this miRNA could lead to deregulation of a number of its validated targets such as *NOTCH1*, *GRIA3*, *SYT1*, *NLGN1* etc; all of which are essential for brain development and function. Deregulation of *hsa-miR-146a-5p* leads to detrimental effects on neuroprogenitor cell differentiation into neurons and astrocytes (Jovicic et al., 2013; Mei et al., 2011), dendritic cell extension in mature neurons (Nguyen et al., 2016) and impaired long term potentiation of the synapses through endocytosis of AMPA receptors (Chen and Shen, 2013). *hsa-miR-146a-5p* also controls growth, development and migration of astrocytes, a major cell type in the brain which function to support neurons (Molofsky et al., 2012). Interestingly, upregulation of *hsa-miR-146a-5p* leads to increase uptake of extracellular glutamate, the most abundant neurotransmitter in the brain, potentially tipping the homeostasis of glutamate at the synapses and further impairing synaptic transmission (Nguyen et al., 2016).

The observation of increased *hsa-miR-146a-5p* levels in temporal lobe epilepsy (Aronica et al., 2010) and frontal cortical dysplasia (Iyer et al., 2012) hints at the hypothesis of shared pathophysiological mechanisms between ASD and these disorders. One candidate mechanism is altered inflammatory responses in either a persistent manner throughout development in ASD (McDougle et al., 2015), or an acute state at the site of the insult in epilepsy (Aronica et al., 2010; Taganov et al., 2006). *hsa-miR-146a-5p* was first identified as a regulator of innate immune responses (Taganov et al., 2006). First, its 5' regulatory region harbors NF- κ B binding sites and its expression is upregulated by pro-inflammatory signals (Lukiw et al., 2008). Second, through down-regulation of the NF- κ B transcriptional activators *TRAF6* and *IRAK1*, it suppresses NF- κ B transcriptional activity (Li et al., 2011), thus negatively regulating the duration and the intensity of the immune responses. Two mouse models have been developed for this miRNA: one transgenic model ubiquitously overexpressing *hsa-miR-146a-5p* (Guo et al., 2013) and a constitutive knockout model (Boldin et al., 2011). Both

models developed spontaneous and severe autoimmune diseases, enlarged spleen, paralysis at early ages and eventually premature death, demonstrating that uncontrolled *hsa-miR-146a-5p* regulation has devastating consequences. Unfortunately, these features complicate behavioral studies, and the impact of *hsa-miR-146a-5p* on brain development and function has not been investigated so far. A more relevant model, specifically overexpressing *hsa-miR-146a-5p* in the brain, is needed for this purpose.

4. ASD genes involved in miRNAs biogenesis and function

ASD and the miRNA pathway have also been linked through the demonstration that several ASD-associated genes may act as regulators of miRNA biogenesis or exert their function via the RNA interference pathway. This is indeed the case for *FMR1* (Fragile X mental retardation 1) and *MECP2* (methyl CpG binding protein 2) whose mutations are responsible for respectively the Fragile X syndrome (MIM 300624) and the Rett syndrome (MIM312750), two conditions commonly associated with ASD.

FMR1 codes for a protein called Fragile X Mental Retardation Protein, or FMRP. FMRP is an RNA-binding protein involved in synaptic plasticity through the regulation of mRNA transport and local protein synthesis at synapses (Jin et al., 2004a). Several studies have demonstrated that FMRP shows both biochemical and genetic interactions with components of the miRNA pathway. The *Drosophila* FMRP was reported to be part of a ribonucleoprotein (RNP) complex that also contains AGO2 and DMP68, two essential components for RNAi in *Drosophila* (Caudy et al., 2002; Ishizuka et al., 2002). In mammalian cells, FMRP was found to interact with endogenous miRNAs and with EIF2C2, an argonaute family protein (Jin et al., 2004b). Further biochemical analyses using recombinant proteins demonstrated that FMRP can act as a miRNA acceptor protein for the ribonuclease DICER. FMRP can accept miRNAs derived from DICER cleavage and facilitate the

assembly of specific miRNA:mRNA target complexes *in vitro* (Plante et al., 2006). Previous reports have also demonstrated that FMRP associates with polyribosomes at synapses in brain and that the FMRP-polyribosome association is sensitive to puromycin, a drug that targets actively translating ribosomes suggesting that FMRP functions as a translational suppressor (Lu et al., 2004; Stefani et al., 2004). Collectively, these data suggest that the RNA interference pathway is likely the major molecular mechanism by which FMRP regulates translation.

MECP2 is a transcriptional repressor that binds to methylated CpG islands and recruits chromatin-remodeling complexes or regulates higher-order chromatin structures (Bird, 2008). The involvement of MECP2 in regulating miRNA expression was first reported in adult neural stem cells where the expression of *miR-137*, an intrinsic modulator of adult neurogenesis, was found to be subject to MECP2-mediated epigenetic regulation (Szulwach et al., 2010). Further studies analyzed the expression profiles of miRNAs in the whole brain or cerebellum of *Mecp2*-null mice and found that the levels of many miRNAs were altered (Urduinguio et al., 2010; Wu et al., 2010). Interestingly, further deep sequencing analysis revealed that while most pre-miRNA and mature miRNA levels are increased in the hippocampus of *Mecp2*-null mice, normal pri-miRNA levels are observed, suggesting that MECP2 can also regulate miRNA expression post-transcriptionally (Cheng et al., 2014b). MECP2 interacts with DGCR8 and promotes the release of DROSHA from DGCR8, thus inactivating miRNA processing (Cheng and Qiu, 2014; Cheng et al., 2014b). These authors demonstrated that phosphorylation of MECP2 at Ser80, a modification controlled by neuronal activity, facilitates MECP2 binding with DGCR8. Thus, MECP2 regulates gene expression by suppressing nuclear miRNA processing through direct interaction with DGCR8. Altogether, these observations provide further evidence for a mechanistic link between dysfunction of the miRNA machinery and ASD.

5. miRNAs as biomarkers for ASD

For its stability and detectability in most tissue types, the use of miRNA as disease biomarkers has been extensively investigated. Defined by the World Health Organization, biomarkers are “any substance, structure, or process that can be measured in the body or its products and influence or predict the incidence of outcome or disease”.¹ Indeed, a large number of miRNAs can be cheaply, accurately and easily measured from small amount of tissue, blood or even plasma. The ability to test multiple assays simultaneously also improves the statistical power to predict the disease. As examples, a panel of 13 miRNAs has been proposed to detect smoking induced lung cancer from the patients’ plasma with 75% accuracy (Montani et al., 2015); from meta-analysis of 19 different studies, *hsa-miR-499* and *hsa-miR-133a* have been proposed to be the best biomarkers for myocardial infarction (Cheng et al., 2014a); finally, a panel of 16 miRNAs was developed to predict Alzheimer’s disease from the patient’s serum with up to 87% accuracy (Cheng et al., 2015).

Given the high prevalence rate of ASD, the search for potential biomarkers for ASD has been extensively investigated by various means. Several genetic panels for the 115 genes associated with ASD are currently implemented; however, they could only predict the pathology in a very small number of cases (see Section 1.1). Numerous other studies have proposed markers based on measurements of gene/protein expression in serum/saliva/urine, metabolites, cytokines as well as brain structures by magnetic resonance imaging etc (reviewed by Goldani et al. (2014)); yet, currently there is not a single test approved for clinical use. Goldani et al. attribute the common constraints of published studies to the relative small sample size employed in most studies and the lack of

means to distinguish ASD from other related neurodevelopmental disorders. These are the exact limitations imposing on the 9 studies of miRNA profiles in ASD thus far (Section 3.1).

The analysis of miRNA levels remains however a highly promising approach for developing minimally invasive screening tests for ASD. A well-designed study assessing the diagnostic performance of the 156 miRNAs previously reported to be deregulated in ASD (Section 3) is an absolute requirement. The study should include large cohorts of controls, patients with ASD as well as patients with other neurodevelopmental disorders. Other variable criteria such as age, sex and ethnicity will also have to be taken into consideration. Such a diagnostic tool would provide a means for detecting early signs of the disease and allowing early therapeutic interventions.

6. miRNA-based therapy of ASD: opportunities and challenges

In the past few years, miRNAs have been found deregulated in a wide range of maladies and miRNA-based therapies have been considered in some cases. miRNAs are short molecules which can each regulate entire pathways. This makes them ideal therapeutic targets since we can potentially modulate complex mechanisms by acting on a single small molecule. Moreover, the majority of mature miRNA sequences are 100% identical between human and rodents (van Rooij and Kauppinen, 2014), allowing the use of animal models for extensive pre-clinical evaluations of efficacy, toxicity and pharmacokinetics.

miRNA-based therapies can be developed either to restore the normal level of an underexpressed miRNA or to inhibit the function of an overexpressed miRNA. Synthetic construction of mature miRNA duplex, known as miRNA mimic, has been used successfully to restore *miR-29* function and partially reverse symptoms associated with pulmonary fibrosis in a mouse model and patient fibroblasts (Montgomery et al., 2014). The same purpose can also be achieved by vector based overexpression of miRNA; as an example, adenoviral induced overexpression of *miR-26a* was used to cause apoptosis of human liver tumors but not healthy cells *in vitro* (Kota et al., 2009). In theory, using the same vectors *in vivo* might also be possible (van Rooij and Kauppinen, 2014). On the other hand, complementary antisense oligonucleotides called anti-miRs (van Rooij and Kauppinen, 2014) can trap miRNAs by binding to them and thus inhibiting their action. Intravenously delivered *anti-miR-122* treatment for Hepatitis C was shown to be effective without any side effect in primates (Lanford et al., 2010) as well as in humans through subcutaneous injection (Janssen et al., 2013).

A single example of miRNA-based therapy in the brain was recently published (Halle et al., 2016). The authors reported on an efficient *in vivo* anti-miRNA targeting *let-7a* treatment against glioblastoma in mice. In order to deliver the molecule into the brain, they used the convection-enhanced delivery (CED) system, which consists of a direct injection in a chosen area of the brain. Similar catheter systems for humans have been developed and some have entered into clinical trials.² If approved, this kind of technology could significantly improve the efficiency of drug delivery to the brain for a wide variety of applications including miRNA-based therapies.

At the present time, issues related to delivery, dosage, and specificity of miRNA-based therapies still remain to be addressed. To obtain efficient *in vivo* delivery, several synthetic vehicles including cationic liposomes, polymers, inorganic (gold) nanoparticles,

² Cleveland Clinic—Consult QD, 2015. Retrieved from: <http://consultqd.clevelandclinic.org/2015/10/the-cleveland-multiport-catheter-a-new-take-on-convection-enhanced-delivery-to-the-cns/>.

dendrimers, and micelle have been generated and are being investigated (van Rooij and Kauppinen, 2014). These modifications aim either to improve the stability of the anti-miRNAs and miRNA mimics or to facilitate cellular entrance. However, some of them may hamper the ability of the miRNA mimics to be incorporated into the RISC complex, thus preventing their effectiveness (Montgomery et al., 2014). The second challenging issue is the delivery dosage of miRNA-based drugs that is needed to restore the miRNA level to a physiological and functional amount. Anti-miRNAs have often been administered at high concentrations and we still don't know yet the long-term effect of the treatment. Indeed, administering too much anti-miRNAs or miRNA mimics could lead to more damages than benefits. These challenges have been partly or completely overcome in a few example cases mentioned above. These studies demonstrated that while much progress still needs to be made, it is possible to surmount the difficulties facing miRNA-base therapies.

7. Concluding remarks

This review highlights the current evidence for the contribution of miRNA deregulation to the pathology of ASD. Yet, many questions remain unanswered: 1. How miRNAs are differentially expressed spatially and temporally throughout development; 2. At what stages during development and in which cell types do they exert their effects; 3. What are the molecular mechanisms mediating miRNA deregulation in ASD? These limitations should not make us forget the two clinical applications of miRNAs as a diagnostic tool and as novel treatment. Several studies have identified a number of miRNAs deregulated in ASD; these miRNAs could potentially serve as relevant biomarkers for ASD. However, a large-scale miRNA profiling study is urgently warranted in order to identify a consensus set of miRNAs to be used for clinical diagnosis. Similarly, preclinical studies have demonstrated long lasting and reversible effects of microRNA-based therapies without any adverse side effects or histopathological changes in the experimental animals. Effective delivery system to the brain will be the key issue to bring miRNA-based therapy to the clinic in the case of ASD.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

This work received a state subsidy managed by the National Research Agency under the “Investments for the Future” program bearing the reference ANR-10-IHU-01 and the “ANR-SAMENTA 2012” program. This work was also supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20120323702) and the Fondation de France. LC is supported by the Centre National de la Recherche Scientifique. JF is supported by Crédit Agricole d'Ile-de-France Mécénat. We would like to thank Pedro Antonio Pallàs Monter for his help with the figures as well as Yanick Crow, Mario Gomes-Pereira and Vincent Cantagrel for their contribution in reviewing this manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.10.018>.

References

Abdelfattah, A.M., et al., 2014. Update on non-canonical microRNAs. *Biomol. Concepts* 5, 275–287.

- Abu-Elneel, K., et al., 2008. Heterogeneous dysregulation of microRNAs across the autism spectrum. *Neurogenetics* 9, 153–161.
- Amaral, D.G., et al., 2008. Neuroanatomy of autism. *Trends Neurosci.* 31, 137–145.
- Ander, B.P., et al., 2015. Atypical miRNA expression in temporal cortex associated with dysregulation of immune, cell cycle, and other pathways in autism spectrum disorders. *Mol. Autism* 6, 37.
- Aronica, E., et al., 2010. Expression pattern of miR-146a, an inflammation-associated microRNA, in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Eur. J. Neurosci.* 31, 1100–1107.
- Autism Genome Project, C., et al., 2007. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat. Genet.* 39, 319–328.
- Bail, S., et al., 2010. Differential regulation of microRNA stability. *RNA* 16, 1032–1039.
- Basu, S.N., et al., 2009. AutDB: a gene reference resource for autism research. *Nucleic Acids Res.* 37, D832–836.
- Berkel, S., et al., 2010. Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. *Nat. Genet.* 42, 489–491.
- Bird, A., 2008. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 and neurological disease. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 575–583.
- Boldin, M.P., et al., 2011. miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *J. Exp. Med.* 208, 1189–1201.
- Bourgeron, T., 2015. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 551–563.
- Caudy, A.A., et al., 2002. Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev.* 16, 2491–2496.
- Cheloufi, S., et al., 2010. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* 465, 584–589.
- Chen, Y.L., Shen, C.K., 2013. Modulation of mGluR-dependent MAP1B translation and AMPA receptor endocytosis by microRNA miR-146a-5p. *J. Neurosci.* 33, 9013–9020.
- Cheng, T.L., Qiu, Z., 2014. MeCP2: multifaceted roles in gene regulation and neural development. *Neurosci. Bull.* 30, 601–609.
- Cheng, C., et al., 2014a. MiRNAs as biomarkers of myocardial infarction: a meta-analysis. *PLoS One* 9, e88566.
- Cheng, T.L., et al., 2014b. MeCP2 suppresses nuclear microRNA processing and dendritic growth by regulating the DGCR8/Drosha complex. *Dev. Cell* 28, 547–560.
- Cheng, L., et al., 2015. Prognostic serum miRNA biomarkers associated with Alzheimer's disease shows concordance with neuropsychological and neuroimaging assessment. *Mol. Psychiatry* 20, 1188–1196.
- Croce, C.M., 2009. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 10, 704–714.
- Duan, R., et al., 2007. Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA. *Hum. Mol. Genet.* 16, 1124–1131.
- Durand, C.M., et al., 2007. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat. Genet.* 39, 25–27.
- Feng, J., et al., 2009. Evidence for X-chromosomal schizophrenia associated with microRNA alterations. *PLoS One* 4, e6121.
- Filipowicz, W., et al., 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* 9, 102–114.
- Geschwind, D.H., 2009. Advances in autism. *Annu. Rev. Med.* 60, 367–380.
- Ghahramani Seno, M.M., et al., 2011. Gene and miRNA expression profiles in autism spectrum disorders. *Brain Res.* 1380, 85–97.
- Goldani, A.A., et al., 2014. Biomarkers in autism. *Front. Psychiatry* 5, 100.
- Gregory, S.G., et al., 2009. Genomic and epigenetic evidence for oxytocin receptor deficiency in autism. *BMC Med.* 7, 62.
- Guo, Q., et al., 2013. Forced miR-146a expression causes autoimmune lymphoproliferative syndrome in mice via downregulation of Fas in germinal center B cells. *Blood* 121, 4875–4883.
- Haenisch, S., et al., 2015. SOX11 identified by target gene evaluation of miRNAs differentially expressed in focal and non-focal brain tissue of therapy-resistant epilepsy patients. *Neurobiol. Dis.* 77, 127–140.
- Halle, B., et al., 2016. Convection-enhanced delivery of an anti-miR is well-tolerated, preserves anti-miR stability and causes efficient target de-repression: a proof of concept. *J. Neurooncol.* 126, 47–55.
- Hammond, S.M., 2015. An overview of microRNAs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 87, 3–14.
- Harris, S.W., et al., 2008. Autism profiles of males with fragile syndrome. *Am. J. Mental Retard* 113, 427–438.
- Hebert, S.S., De Strooper, B., 2009. Alterations of the microRNA network cause neurodegenerative disease. *Trends Neurosci.* 32, 199–206.
- Hu, V.W., 2013. The expanding genomic landscape of autism: discovering the ‘forest’ beyond the ‘trees’. *Future Neurol.* 8, 29–42.
- Huang, F., et al., 2015. Investigation of gene regulatory networks associated with autism spectrum disorder based on MiRNA expression in China. *PLoS One* 10, e0129052.
- Huntzinger, E., Izaurralde, E., 2011. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* 12, 99–110.
- Iossifov, I., et al., 2012. De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron* 74, 285–299.
- Ishizuka, A., et al., 2002. A Drosophila fragile protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev.* 16, 2497–2508.
- Iwai, N., Naraba, H., 2005. Polymorphisms in human pre-miRNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 1439–1444.
- Iyer, A., et al., 2012. MicroRNA-146a: a key regulator of astrocyte-mediated inflammatory response. *PLoS One* 7, e44789.

- Jacquemont, M.L., et al., 2006. Array-based comparative genomic hybridisation identifies high frequency of cryptic chromosomal rearrangements in patients with syndromic autism spectrum disorders. *J. Med. Genet.* 43, 843–849.
- Jamain, S., et al., 2003. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat. Genet.* 34, 27–29.
- Janssen, H.L., et al., 2013. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N. Engl. J. Med.* 368, 1685–1694.
- Jeste, S.S., et al., 2008. Characterization of autism in young children with tuberous sclerosis complex. *J. Child Neurol.* 23, 520–525.
- Jin, P., et al., 2004a. RNA and microRNAs in fragile mental retardation. *Nat. Cell Biol.* 6, 1048–1053.
- Jin, P., et al., 2004b. Biochemical and genetic interaction between the fragile mental retardation protein and the microRNA pathway. *Nat. Neurosci.* 7, 113–117.
- Jovicic, A., et al., 2013. Comprehensive expression analyses of neural cell-type-specific miRNAs identify new determinants of the specification and maintenance of neuronal phenotypes. *J. Neurosci.* 33, 5127–5137.
- Kim, V.N., et al., 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 126–139.
- Kota, J., et al., 2009. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell* 137, 1005–1017.
- Kunej, T., et al., 2010. The glypican 3-hosted murine mir717 gene: sequence conservation, seed region polymorphisms and putative targets. *Int. J. Biol. Sci.* 6, 769–772.
- Lanford, R.E., et al., 2010. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 327, 198–201.
- Lewis, M.A., et al., 2009. An ENU-induced mutation of miR-96 associated with progressive hearing loss in mice. *Nat. Genet.* 41, 614–618.
- Li, L., et al., 2010. Single nucleotide polymorphism associated with nonsyndromic cleft palate influences the processing of miR-140. *Am. J. Med. Genet. A* 152A, 856–862.
- Li, Y.Y., et al., 2011. Differential expression of miRNA-146a-regulated inflammatory genes in human primary neural, astroglial and microglial cells. *Neurosci. Lett.* 499, 109–113.
- Loke, Y.J., et al., 2015. The role of epigenetic change in autism spectrum disorders. *Front. Neurol.* 6, 107.
- Lu, R., et al., 2004. The fragile protein controls microtubule-associated protein 1B translation and microtubule stability in brain neuron development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15201–15206.
- Lukiw, W.J., et al., 2008. An NF-kappaB-sensitive micro RNA-146a-mediated inflammatory circuit in Alzheimer disease and in stressed human brain cells. *J. Biol. Chem.* 283, 31315–31322.
- Marralle, M., et al., 2014. Assessing the impact of copy number variants on miRNA genes in autism by Monte Carlo simulation. *PLoS One* 9, e90947.
- Marshall, C.R., et al., 2008. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 477–488.
- McDougle, C.J., et al., 2015. Toward an immune-mediated subtype of autism spectrum disorder. *Brain Res.* 1617, 72–92.
- Mei, J., et al., 2011. MicroRNA-146a inhibits glioma development by targeting Notch1. *Mol. Cell. Biol.* 31, 3584–3592.
- Meister, G., 2013. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat. Rev. Genet.* 14, 447–459.
- Mellios, N., Sur, M., 2012. The emerging role of microRNAs in schizophrenia and autism spectrum disorders. *Front. Psychiatry* 3, 39.
- Mencia, A., et al., 2009. Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyndromic progressive hearing loss. *Nat. Genet.* 41, 609–613.
- Molofsky, A.V., et al., 2012. Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev.* 26, 891–907.
- Montani, F., et al., 2015. miR-Test: a blood test for lung cancer early detection. *J. Natl. Cancer Inst.* 107, djv063.
- Montgomery, R.L., et al., 2014. MicroRNA mimicry blocks pulmonary fibrosis. *EMBO Mol. Med.* 6, 1347–1356.
- Mor, M., et al., 2015. Hypomethylation of miR-142 promoter and upregulation of microRNAs that target the oxytocin receptor gene in the autism prefrontal cortex. *Mol. Autism* 6, 46.
- Moretti, P., Zoghbi, H.Y., 2006. MeCP2 dysfunction in Rett syndrome and related disorders. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 276–281.
- Mundalil Vasu, M., et al., 2014. Serum microRNA profiles in children with autism. *Mol. Autism* 5, 40.
- Neale, B.M., et al., 2012. Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature* 485, 242–245.
- Nguyen, L.S., et al., 2016. Profiling olfactory stem cells from living patients identifies miRNAs relevant for autism pathophysiology. *Mol. Autism* 7, 1.
- O’Roak, B.J., et al., 2012a. Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. *Science* 338, 1619–1622.
- O’Roak, B.J., et al., 2012b. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature* 485, 246–250.
- Olive, V., et al., 2015. Outside the coding genome, mammalian microRNAs confer structural and functional complexity. *Sci. Signal.* 8, re2.
- Plante, I., et al., 2006. Dicer-derived microRNAs are utilized by the fragile mental retardation protein for assembly on target RNAs. *J. Biomed. Biotechnol.* 2006, 64347.
- Ronemus, M., et al., 2014. The role of de novo mutations in the genetics of autism spectrum disorders. *Nat. Rev. Genet.* 15, 133–141.
- Sarachana, T., et al., 2010. Investigation of post-transcriptional gene regulatory networks associated with autism spectrum disorders by microRNA expression profiling of lymphoblastoid cell lines. *Genome Med.* 2, 23.
- Saunders, M.A., et al., 2007. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 3300–3305.
- Schaaf, C.P., Zoghbi, H.Y., 2011. Solving the autism puzzle a few pieces at a time. *Neuron* 70, 806–808.
- Sebat, J., et al., 2007. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* 316, 445–449.
- Stamova, B., et al., 2015. Specific regional and age-related small noncoding RNA expression patterns within superior temporal gyrus of typical human brains are less distinct in autism brains. *J. Child Neurol.* 30, 1930–1946.
- Stefani, G., et al., 2004. Fragile mental retardation protein is associated with translating polyribosomes in neuronal cells. *J. Neurosci.* 24, 7272–7276.
- Sun, G., et al., 2009. SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. *RNA* 15, 1640–1651.
- Szulwach, K.E., et al., 2010. Cross talk between microRNA and epigenetic regulation in adult neurogenesis. *J. Cell Biol.* 189, 127–141.
- Taganov, K.D., et al., 2006. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12481–12486.
- Talebizadeh, Z., et al., 2008. Feasibility and relevance of examining lymphoblastoid cell lines to study role of microRNAs in autism. *Autism Res.* 1, 240–250.
- Toma, C., et al., 2015. Common and rare variants of microRNA genes in autism spectrum disorders. *World J. Biol. Psychiatry*, 1–11.
- Urdinguio, R.G., et al., 2010. Disrupted microRNA expression caused by Mecp2 loss in a mouse model of Rett syndrome. *Epigenetics* 5, 656–663.
- van Rooij, E., Kauppinen, S., 2014. Development of microRNA therapeutics is coming of age. *EMBO Mol. Med.* 6, 851–864.
- Voineagu, I., Eapen, V., 2013. Converging pathways in autism spectrum disorders: interplay between synaptic dysfunction and immune responses. *Front. Hum. Neurosci.* 7, 738.

- Williams, G., et al., 2001. Fetal valproate syndrome and autism: additional evidence of an association. *Dev. Med. Child Neurol.* 43, 202–206.
- Winter, J., et al., 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* 11, 228–234.
- Wu, H., et al., 2010. Genome-wide analysis reveals methyl-CpG-binding protein 2-dependent regulation of microRNAs in a mouse model of Rett syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 18161–18166.
- Zhang, Z.W., et al., 2011. MicroRNA-19b downregulates insulin 1 through targeting transcription factor NeuroD1. *FEBS Lett.* 585, 2592–2598.
- Zhao, Y., et al., 2007. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell* 129, 303–317.
- Ziats, M.N., Rennert, O.M., 2014. Identification of differentially expressed microRNAs across the developing human brain. *Mol. Psychiatry* 19, 848–852.
- Zongaro, S., et al., 2013. The 3' UTR of FMR1 mRNA is a target of miR-101, miR-129-5p and miR-221: implications for the molecular pathology of FXTAS at the synapse. *Hum. Mol. Genet.* 22, 1971–1982.

CNV Locus	miRNA	CNV type	SNV identified by WES	# Cases	Infancy	EC	LC	Ado
10q21.1	MIR548F1	Deletion-Duplication		2				
10q21.1	MIR605	Duplication		3				
12p12.1	MIR920	Deletion		3				
15q11.2	MIR1268	Deletion-Duplication		8				
15q13.3	MIR211	Deletion-Duplication		3				
15q23	MIR629	Deletion		4				
15q24.1	MIR630	Deletion		4				
16p13.11	MIR1972-1	Deletion-Duplication		9				
16p13.11	MIR484	Deletion-Duplication		14				
16q24.1	MIR1910	Deletion		3				
17p11.2	MIR1180	Deletion-Duplication		14				
17p11.2	MIR33b	Deletion-Duplication		14				
17p13.1	MIR195	Duplication		2				
17p13.1	MIR324	Duplication		2				
17p13.1	MIR497	Duplication		2				
19p13.3	MIR7-3	Deletion-Duplication		5				
1p34.3	MIR552	Duplication		2				
1p36.23	MIR34a	Deletion-Duplication		5				
1p36.32	MIR551a	Deletion-Duplication		5				
1p36.33	MIR200a	Deletion-Duplication		5				
1p36.33	MIR200b	Deletion-Duplication		5				
1p36.33	MIR429	Deletion-Duplication		5				
1q42.2	MIR1182	Deletion	chr1:231019835G>A	2				
20q13.33	MIR124-3	Deletion-Duplication		9				
20q13.33	MIR1914	Deletion-Duplication	chr20:63941477 C>T	9				
20q13.33	MIR647	Deletion-Duplication		9				
20q13.33	MIR941-1	Deletion-Duplication		9				
20q13.33	MIR941-2	Deletion-Duplication		9				
20q13.33	MIR941-3	Deletion-Duplication		9				
22q11.21	MIR1286	Duplication		47				
22q11.21	MIR1306	Duplication		47				
22q11.21	MIR185	Duplication		47				
22q11.21	MIR3618	Deletion-Duplication		47				
22q11.21	MIR649	Duplication		6				
2p16.1	MIR216a	Deletion		4				
2p16.1	MIR216b	Deletion		4				
2p16.1	MIR217	Deletion		4				
2q37.3	MIR149	Deletion-Duplication		13				
3p21.31	MIR564	Deletion		3				
3p21.32	MIR138-1	Deletion		3				

3p25.1	MIR563	Deletion		2	
3q27.3	MIR1248	Deletion		2	
3q28	MIR28	Deletion		2	
3q28	MIR944	Deletion		2	
4p16.3	MIR571	Deletion-Duplication		8	
4p16.3	MIR943	Duplication		2	
5q23.1	MIR1244-1	Deletion-Duplication		19	
6p21.33	MIR1236	Deletion-Duplication		7	
7p22.1	MIR589	Deletion-Duplication	chr7:5495838 G>A	17	
7p22.3	MIR339	Deletion-Duplication			
7q11.23	MIR590	Deletion-Duplication		14	
7q21.2	MIR1285-1	Duplication		1	
7q21.3	MIR489	Duplication		2	
7q21.3	MIR591	Duplication		2	
7q21.3	MIR653	Duplication		2	
7q36.1	MIR671	Deletion-Duplication		7	
8p23.1	MIR124-1	Deletion-Duplication		29	
8p23.1	MIR1322	Deletion-Duplication		29	
8p23.1	MIR597	Deletion-Duplication		29	
8p23.1	MIR598	Deletion-Duplication		29	
9p21.1	MIR873	Deletion-Duplication		5	
9p21.1	MIR876	Deletion-Duplication		5	
9q21.12	MIR204	Deletion		2	
Xp11.23	MIR188	Duplication		9	
Xp11.23	MIR362	Duplication		9	
Xp11.23	MIR500A	Duplication		9	
Xp11.23	MIR500B	Duplication		9	
Xp11.23	MIR501	Duplication		9	
Xp11.23	MIR502	Duplication		9	
Xp11.23	MIR532	Duplication		9	
Xp11.23	MIR660	Duplication		9	
Xp22.31	MIR651	Deletion-Duplication		31	

Table S1: List of miRNAs genes located in De Novo CNVs associated with ASD (compiled from autDB).

Abbreviation: DFC, Dorsal Frontal Cortex; EC, Early Childhood; LC, Late Childhood; Ado, Adolescence.

Expression data for available miRNAs were extracted from Ziats et al. 2013; blue colours indicate expression value (raw RNA-Seq read counts) less than 200, increasingly darker red colours indicate expression superior to 200.

Function Annotation	P Value	# Genes	Gene Symbols
Proliferation of neuronal cells	4,88E-37	68	AKT1, APP, ARHGAP32, BCL2, CAMK2A, CAV1, CCND1, CDC42, CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, CDKN1A, CDKN1B, CREB1, CRK, CSF1, CXCL12, CYP19A1, DVL2, E2F1, E2F3, EGFR, EP300, ERBB4, ESR1, ESR2, FAS, HRAS, IFNG, IGF1R, IGF2, IL6, IL6R, ITGB3, KIT, KRAS, L1CAM, MAPK1, MAPK9, MET, MMP2, MMP9, MYB, MYCN, MYLIP, NF1, NF2, NFKB1, NOTCH1, PIK3CA, POU4F2, PTCH1, PTEN, PTPN11, PURA, RAB22A, RB1, RBL1, ROCK1, SIRT1, SRC, STAT3, TGFB2, TP53, VEGFA, VHL, WNT3A
Development of central nervous system	7,46E-36	70	AKT1, APP, ATAT1, ATXN1, BCL2, BCL2L1, BRCA2, BTG2, CASP3, CASP9, CCND1, CCND2, CDK6, CDKN1B, CREB1, CXCL12, CXCR4, CYP19A1, DDIT4, DICER1, E2F1, EGFR, EOMES, ERBB4, ESR2, FMR1, FOXO3, HES1, HSPG2, ID2, IFNG, IGF1R, IL11, IL6, L1CAM, LIN28A, LMNB1, MAP2K4, MAPK1, MAPK9, MECP2, MED1, MEOX2, MET, MYC, MYCN, NEUROD1, NF1, NF2, NOS2, NOTCH1, NR4A2, POU3F2, PTCH1, PTEN, PTPN11, PURA, RARB, RBL1, SMAD4, SMAD5, SRC, TGFB2, TLR2, TP53, VEGFA, VSNL1, WASF2, WNT3A, ZEB2
Formation of brain	4,51E-35	62	APP, ATAT1, ATXN1, BCL2, BCL2L1, BRCA2, BTG2, CASP3, CASP9, CCND1, CCND2, CDK6, CREB1, CXCL12, CXCR4, CYP19A1, DDIT4, DICER1, E2F1, EGFR, EOMES, ERBB4, ESR2, FOXO3, HES1, HSPG2, ID2, IFNG, IGF1R, IL6, L1CAM, LIN28A, MAP2K4, MAPK9, MECP2, MED1, MEOX2, MET, MYCN, NEUROD1, NF1, NF2, NOS2, NOTCH1, NR4A2, POU3F2, PTCH1, PTEN, PTPN11, PURA, RARB, RBL1, SMAD4, SMAD5, SRC, TGFB2, TLR2, TP53, VEGFA, WASF2, WNT3A, ZEB2
Cell viability of neurons	5,45E-32	42	AKT1, APP, ATXN1, BCL2, BCL2L1, BCL2L11, BCL2L2, BMI1, CDK1, CREB1, CSF1, CXCL12, DICER1, E2F1, E2F3, EGFR, FADD, HBEGF, HRAS, IFNG, IGF1R, IGF2, IL11, IL6, IL6R, L1CAM, MAPK9, MET, MYCN, NEUROD1, NF1, POU4F2, PTCH1, RB1, SIRT1, SMAD3, SRC, STAT3, TLR4, TP53, VEGFA, XIAP
Morphology of nervous system	1,34E-30	71	AKT1, AKT3, APP, AQP4, ATAT1, BACE1, BCL2L1, BCL2L11, BRCA1, CAMK2A, CASP3, CASP9, CAV1, CCND1, CCND2, CD40LG, CDKN1B, CFH, CHUK, CREB1, CXCL12, CXCR4, DICER1, DVL2, E2F1, EGFR, ERBB4, ESR1, ESR2, FMR1, GRIA2, HES1, HSPG2, ID2, IGF1R, IGF2, IL6, ITGB8, L1CAM, LATS2, LMNB1, MAPK9, MECP2, MEOX2, MET, MIF, MYC, MYCN, NEUROD1, NF1, NFKB1, NOS2, NOTCH1, NR4A2, PEA15, POU3F2, POU4F2, PPARGC1A, PTEN, PURA, RARB, RASA1, RB1, RBL1, SMAD5, TAC1, TLR2, TLR4, TP53, VEGFA, WNT3A

Morphology of central nervous system	5,2E-27	54	AKT1, AKT3, APP, AQP4, ATAT1, BACE1, BCL2L11, CASP3, CASP9, CAV1, CCND1, CCND2, CD40LG, CDKN1B, CHUK, CXCL12, CXCR4, EGFR, ERBB4, ESR1, ESR2, FMR1, GRIA2, HES1, HSPG2, ID2, IGF1R, IL6, ITGB8, L1CAM, LATS2, LMNB1, MECP2, MYC, MYCN, NEUROD1, NF1, NOS2, NOTCH1, NR4A2, PEA15, POU3F2, POU4F2, PPARGC1A, PTEN, PURA, RASA1, RB1, RBL1, SMAD5, TLR2, TP53, VEGFA, WNT3A
Growth of neurites	1,65E-29	54	AKT1, APP, ARHGAP32, BCL2, CAV1, CDC42, CDK1, CDK2, CDKN1A, CREB1, CRK, CSF1, CXCL12, CYP19A1, DVL2, E2F1, EGFR, EP300, ERBB4, ESR1, ESR2, FAS, HRAS, IFNG, IGF1R, IGF2, IL6, IL6R, ITGB3, KIT, KRAS, L1CAM, MAPK1, MAPK9, MET, MMP2, MMP9, MYLIP, NF1, NF2, NFKB1, NOTCH1, PIK3CA, POU4F2, PTEN, PTPN11, RAB22A, ROCK1, SIRT1, SRC, STAT3, TP53, VEGFA, WNT3A
Differentiation of neurons	3,28E-27	49	AKT1, APP, ARHGAP32, BCL2, BCL2L1, BMI1, BTG2, CAV1, CDC42, CDKN1B, CREB1, CXCL12, DDIT4, DICER1, EGFR, EOMES, FMR1, FOXA1, GCM1, HES1, ID2, IFNG, IGF2, IL6, KCNMA1, LIN28A, LMNB1, MAPK1, MAPK14, MECP2, MED1, MYC, NEUROD1, NF1, NOTCH1, NR4A2, POU3F2, POU4F2, PTCH1, RARB, RB1, RBL2, SRC, STAT3, TCF12, TLR2, TP53, VEGFA, VHL
Abnormal morphology of nervous system	5,54E-27	64	AKT1, AKT3, APP, BACE1, BCL2L11, BRCA1, CAMK2A, CASP3, CASP9, CAV1, CCND1, CCND2, CD40LG, CDKN1B, CFH, CHUK, CREB1, CXCL12, CXCR4, DVL2, E2F1, EGFR, ERBB4, ESR1, ESR2, FMR1, GRIA2, HES1, HSPG2, ID2, IGF1R, IGF2, IL6, ITGB8, L1CAM, LATS2, LMNB1, MAPK9, MECP2, MEOX2, MET, MIF, MYCN, NEUROD1, NF1, NFKB1, NOS2, NOTCH1, NR4A2, PEA15, POU3F2, POU4F2, PPARGC1A, PTEN, PURA, RARB, RASA1, RB1, RBL1, SMAD5, TLR2, TP53, VEGFA, WNT3A
Quantity of neurons	4,13E-26	48	AKT1, APP, ATXN1, BACE1, BCL2, CAMK2A, CASP3, CASP9, CCND2, CDC42, CDKN1A, CDKN1B, CREB1, CXCL12, CXCR4, DICER1, DVL2, E2F1, EGFR, ERBB4, ESR1, ESR2, FMR1, FOXA1, HES1, HSF2, IFNG, IGF1R, L1CAM, LMNB1, MAP2K4, MECP2, MET, MIF, NEUROD1, NOTCH1, NR4A2, POU4F2, PRDM1, PTEN, PTPN11, PURA, RBL1, SMAD4, TLR4, TP53, TP63, VEGFA

Table S2: Enrichment of validated miRNA targets in neuronal relevant pathways.

La méta-analyse rapportée ci-dessus indique que *miR-146a* est le miARN le plus fréquemment sur-exprimé dans les TSA. De plus, nous avons montré que ce miARN est également sur-exprimé chez les patients atteints de DI. Enfin, *miR-146a* a été trouvé sur-exprimé dans le sérum de patients épileptiques ainsi que dans l'hippocampe dans un modèle d'épilepsie du lobe temporal chez le rat²⁴⁶. La sur-expression de *miR-146a* induit donc probablement des voies communes sous-jacentes aux différentes MND, ce qui nous a conduits à étudier plus en détail le rôle de ce miARN dans le développement cérébral.

II - Caractérisation du rôle de *miR-146a* dans le neurodéveloppement

A - Organisation génomique, régulation de l'expression et fonctions connues de *miR-146a*

1 - Introduction générale

Le gène codant *miR-146a* est localisé sur le chromosome 5 humain, dans l'exon 2 du gène LOC285628 (Fig.17)²⁴⁷ aussi appelé gène hôte de MIR3142 (MIR3142HG), et dans une région non codante du chromosome 11 murin (genome.ucsc.edu). La séquence du miARN mature est conservée à 100% entre les deux espèces. Le gène codant *miR-146b*, l'autre miARN de la famille *miR-146*, est localisé sur les chromosomes 10 et 19 chez l'homme et la souris respectivement. Seuls deux nucléotides diffèrent entre les deux miARNs matures *miR-146a* et *miR-146b* qui partagent plusieurs cibles dont notamment *NFκB*, *TRAF6* et *IRAK1* (mirtarbase). Si *miR-146a-3p* a été décrit comme fonctionnel et ayant plusieurs cibles identifiées chez l'homme, mes travaux ont uniquement porté sur sa forme complémentaire, *miR-146a-5p*, qui sera appelé *miR-146a* dans le reste du manuscrit. 202 cibles validées de *miR-146a* sont connues chez l'homme dont certaines, notamment les gènes associés à la voie *NFκB*, sont conservées chez la souris (Table annexe 1, extraite de <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>).

La première caractérisation fonctionnelle de *miR-146a* fut réalisée en 2006²⁴⁷. Dans cette étude, *miR-146a* a été identifié comme régulateur de la voie *NFκB* et de la réponse inflammatoire dans des monocytes humains. Depuis, ce miARN a été décrit comme

régulant plusieurs voies de signalisation majeures de l'organisme et a été impliqué dans de nombreuses maladies.

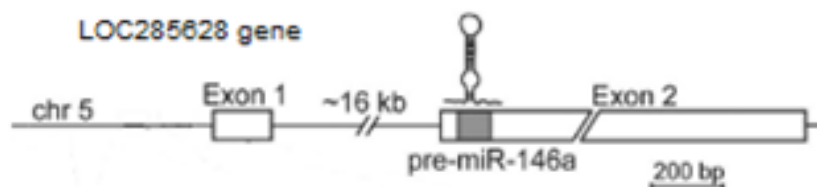


Figure 17: Locus génétique de MIR146a (modifié depuis Taganov et al. 2006)

2 - Régulation de l'expression de *miR-146a*

Le niveau d'expression de *miR-146a* est contrôlé par les facteurs de transcription (FTs) se fixant sur son promoteur. NF κ B est le régulateur transcriptionnel de *miR-146a* le plus souvent rapporté chez l'homme et la souris^{247,248}. De plus, sa présence est requise pour permettre à d'autres FTs, tels que C-JUN²⁴⁹ ou LMP1²⁵⁰, de se fixer sur le promoteur de MIR146a dans des cellules humaines. L'expression du gène MIR146a humain est également régulée par d'autres FT dont c-MYC²⁵¹, STAT3²⁵², ETS1²⁵³ et TCF4²⁵⁴ (aussi appelé TCF7L2). Chez la souris, les FTs c-MYC²⁵¹, AP-1²⁵⁵ ou encore C/EBP β ²⁵⁶ ont été décrits comme se fixant sur le promoteur de Mir146a.

Par ailleurs, le niveau d'expression de MIR146 varie en fonction de la nature d'une séquence polymorphe (G>A rs57095329) située dans sa séquence promotrice et proche d'un site de fixation de ETS1²⁵³. L'allèle A induit une plus forte expression de *miR-146a* que l'allèle G et cet allèle est considéré comme un facteur de risque dans la maladie d'Alzheimer²⁵⁷. À l'inverse, l'allèle G est plus fréquemment observé dans des cas d'épilepsie²⁵⁸ et de lupus systémique²⁵³. L'allèle G d'un second polymorphisme, C>G rs2910164, présent dans *pre-miR-146a*, confère au miARN mature une plus forte capacité d'activation de la voie Notch et a été associé à la progression de mélanomes²⁵⁹.

Différentes modifications épigénétiques sont également impliquées dans la régulation de l'expression de *miR-146a*. TRAIL, un ligand impliqué dans les mécanismes d'apoptose et de réponse inflammatoire, induit l'acétylation du promoteur de MIR146a, permettant une meilleure fixation de NFκB tandis que l'histone déacétylase HDAC1 inhibe l'expression de *miR-146a*²⁶⁰. *In vitro*, l'inhibition des méthyltransférases et des histones déacétylases induisent l'expression de *miR-146a* de façon NFκB-dépendante²⁴⁸. Plusieurs cas de déméthylation du promoteur de MIR146a, toujours au niveau du site de fixation de NFκB, ont également été rapportés²⁶¹.

Enfin, le niveau de *miR-146a* peut être régulé lors des étapes de sa maturation. Par exemple, l'induction de l'expression de l'endoribonucléase MCPIP-1 par l'interféron de type I conduit à une réduction de la quantité de *pre-miR-146a* sans modification de la quantité de *pri-miR-146a*, suggérant que l'effet de MCPIP-1, par son activité ribonucléase, s'exerce au niveau de la maturation de *miR-146a*³⁹.

3 - Les voies de signalisation auxquelles *miR-146a* participe

Historiquement, *miR-146a* fut d'abord décrit comme un régulateur négatif de la réponse inflammatoire²⁴⁷. La stimulation de monocytes en culture avec du lipopolysaccharide (LPS) induit l'activation de la voie NFκB, ce qui conduit à la fixation de NFκB sur le promoteur de MIR146a et promeut son expression. En retour, *miR-146a* cible différents acteurs de la voie NFκB tels que TRAF6 ou IRAK1 exerçant ainsi un rétrocontrôle négatif sur l'activation de la voie NFκB (Fig.18A). *miR-146a* régule également sa propre expression en ciblant directement NFκB²⁶². Dans le système immunitaire, *miR-146a* est aussi impliqué dans la différenciation des cellules souches hématopoïétiques de par son effet sur l'expression de STAT1 et CXCR4, deux protéines de la voie JAK-STAT dont l'activation est nécessaire pour l'hématopoïèse²⁶³.

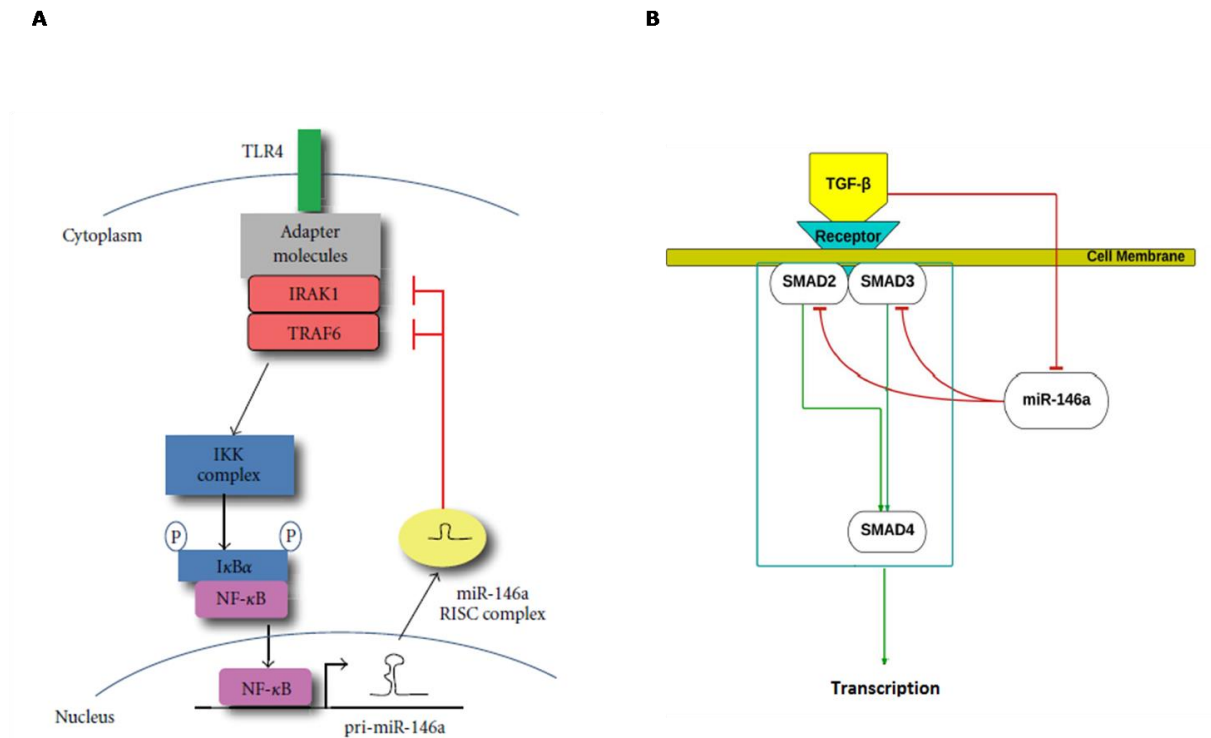


Figure 18: Régulation des voies NFκB (extrait de Rusca et al. 2011) et TGF-β (modifié depuis Cheung et al. 2014) par *miR-146a*. (A) L'activation de la voie NFκB conduit à l'expression de *miR-146a* qui inhibe en retour l'expression de IRAK1 et TRAF6 dans une boucle de rétrocontrôle négatif. (B) *miR-146a* réprime l'expression des protéines SMAD2 et SMAD3, les principaux effecteurs de la signalisation du TGF-β.

miR-146a participe également à la régulation de la voie du TGF-β. La fixation du TGF-β sur son récepteur induit la phosphorylation des protéines SMAD2 et SMAD3 qui activent à leur tour SMAD4, un facteur de transcription promouvant l'expression de gènes impliqués dans les processus de croissance et différenciation cellulaire²⁶⁴. Or, l'expression des protéines SMAD est directement inhibée par *miR-146a* (Fig.18B)²⁶⁵. En retour, la stimulation par le TGF-β et la sur-expression des protéines SMAD induisent une réduction du niveau de *miR-146a* par un mécanisme encore inconnu²⁶⁶.

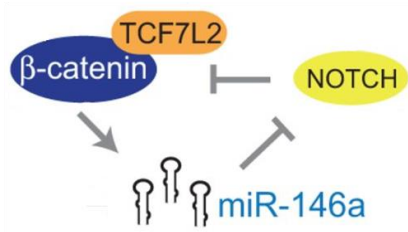
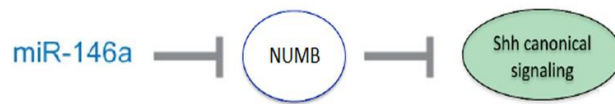
A**B**

Figure 19: Régulation des voies β -caténine (modifié depuis Strubberg et al. 2017) et Shh (modifié depuis Belgacem et al. 2016) par *miR-146a*. (A) L'activation de la voie β -caténine induit l'expression de *miR-146a*. Une boucle de rétrocontrôle positif se met ensuite en place comme *miR-146a* réprime l'expression des protéines NOTCH connues pour inhiber la signalisation β -caténine. (B) *miR-146a* active la voie Shh en inhibant l'expression de NUMB.

Enfin, *miR-146a* intervient dans la régulation d'autres voies de signalisation majeures contrôlant la prolifération et la différenciation cellulaire telles que les voies Wnt/ β -caténine, Notch et Shh. L'activation de la voie Wnt prévient la phosphorylation de la β -caténine (CTNNB1) et donc sa dégradation permettant à CTNNB1 d'exercer son rôle de facteur de transcription²⁶⁷. Associée à TCF7L2, CTNNB1 se fixe sur le promoteur de MIR146a afin d'induire son expression (Fig.19A), instaurant une boucle de rétrocontrôle positif augmentant la quantité de CTNNB1 présente dans le noyau²⁵⁴. Les voies de signalisation Wnt/ β -caténine et Notch sont étroitement liées et antagonistes²⁶⁸. Notamment, NOTCH-1 et -2 induisent la dégradation de CTNNB1 (Fig.19A) via la protéine NUMB²⁶⁹. Or, les ARNm des protéines NOTCH et de NUMB sont des cibles validées de *miR-146a*^{270,271}, ce qui explique partiellement la boucle positive entre *miR-146a* et CTNNB1. *miR-146a*, en inhibant l'expression de NUMB induit également l'activation de la voie Shh (Fig.19B)²⁷². De plus, les voies Shh et Wnt/ β -caténine s'inhibent mutuellement tandis que les voies Shh et Notch s'activent mutuellement⁸². La Figure 20 récapitule les interactions entre *miR-146a*, NUMB et ces trois voies de signalisation.

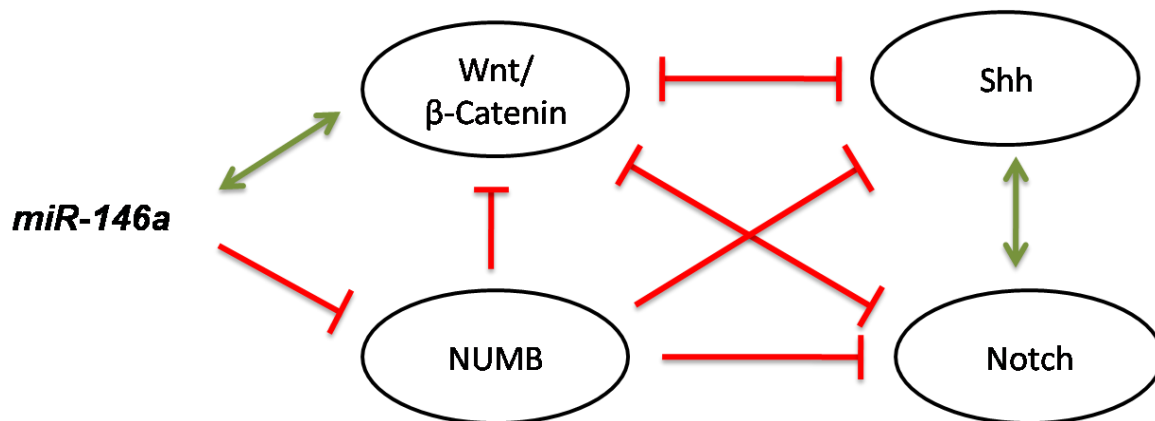


Figure 20: Interactions entre les voies majeures de croissance et différenciation cellulaire et *miR-146a*. Les voies Wnt/ β -caténine, Shh et Notch s'inhibent ou s'activent mutuellement et *miR-146a* les régule principalement via la répression de NUMB.

4 - *miR-146a* dans les maladies

Les cancers sont les maladies le plus fréquemment associées à *miR-146a*. Une faible expression de *miR-146a* est considérée comme un signe de mauvais pronostic dans le lymphome²⁷³. Dans des cellules de lymphome, la sur-expression de *miR-146a* est suffisante pour arrêter la prolifération et induire l'apoptose des cellules cancéreuses via l'inhibition de la voie NF κ B. De même, les voies TGF- β , Notch, Shh et Wnt/ β -caténine étant impliqué dans le processus de croissance cellulaire, leur régulation par *miR-146a* a été incriminée dans de nombreux types de cancer^{270,274,275}.

De par son action sur la voie NF κ B, *miR-146a* est également associé à plusieurs maladies inflammatoires telles que le lupus systémique ou la polyarthrite rhumatoïde²⁷⁶. À partir de 6-8 mois, les souris Mir146a^{-/-} présentent des symptômes évocateurs d'un syndrome lymphoprolifératif auto-immun et d'un lupus tels qu'une splénomégalie, des anticorps antinucléaires ou encore une importante myéloprolifération pouvant entraîner des cancers²⁷⁷.

Une dérégulation de *miR-146a* est également observée dans le contexte des maladies neuroinflammatoires. Notamment, le niveau d'expression de *miR-146a* est anormalement haut dans l'hippocampe de patients atteints d'Alzheimer et la rétine de patients atteints de dégénérescence maculaire liée à l'âge²⁷⁸. *In vitro*, la l'inhibition de *miR-146a* via des oligonucléotides antisens module la réponse inflammatoire d'un modèle cellulaire de la maladie d'Alzheimer²⁷⁹. À l'inverse, l'expression de *miR-146a* protège de la douleur neuropathique dans un modèle murin²⁵⁵. Enfin, moduler l'expression de *miR-146a* réduit la latence, la durée et l'intensité des crises d'épilepsie induites dans des modèles rongeurs d'épilepsie télencéphalique^{246,280}.

L'altération de l'expression de *miR-146a* dans les MND a quant à elle été décrite dans les parties précédentes.

5 - Conclusion

L'expression de *miR-146a* est régulée par de nombreux facteurs dont beaucoup sont commun chez l'homme et la souris. Les modifications épigénétiques identifiées dans le promoteur de *miR-146a* se situent principalement au niveau du site de fixation de NF κ B mais n'exclue pas un rôle de ces marques épigénétiques sur les sites de fixation des autres FTs. Outre son rôle dans la régulation de l'inflammation, *miR-146a* agit sur les principales voies de signalisation contrôlant les processus de prolifération et différenciation cellulaire. Les interactions entre ces voies sont complexes et leur activation ou inhibition par *miR-146a* se fait de façon tissu-spécifique et varie selon le type cellulaire. Il est cependant intéressant de noter que la régulation de l'expression de NUMB semble être un point de convergence de ces différentes boucles de régulation.

Il est également important de noter que les études incriminant *miR-146a* dans les maladies neurologiques sont essentiellement des études d'expression. Au niveau fonctionnel dans les maladies et les modèles neuraux, *miR-146a* est principalement décrit pour son rôle dans la régulation de la voie NF κ B. Par exemple, *miR-146a* régule l'apoptose

et la croissance axonale des neurones murins exposés à une forte concentration de glucose via sa régulation de l'expression de TRAF6 et IRAK1^{281,282}. Dans des lignées cellulaires de neuroblastomes humain, *miR-146* a été décrit comme un régulateur de l'apoptose en ciblant la caspase 7 (*CASP7*) et *BCL-2*, deux gènes pro-apoptotiques²⁸³. Le seul rôle neurone-spécifique et non lié à la voie NFκB établi de *miR-146a* est sa participation à la régulation de la neurotransmission. MAP1B, une protéine associée aux microtubules, participe à la régulation de l'internalisation des récepteurs AMPA (AMPARs) conduisant à une baisse de l'activité synaptique²⁸⁴. *Map1b* est une cible directe de *miR-146a* et la sur-expression de *miR-146a* conduit à une diminution de l'expression de MAP1B et de l'internalisation des AMPARs dans des cultures de neurones d'hippocampe de souris²⁸⁴. En dehors de ces rares études, le rôle de *miR-146a* dans le développement et le fonctionnement cérébral était totalement inexploré. C'est pourquoi notre groupe a décidé de combiner études *in vitro* et *in vivo* pour mieux caractériser les fonctions de *miR-146a* au cours du neurodéveloppement. Au début de ma thèse j'ai donc participé au travail mené par le Dr Lam-Son Nguyen qui visait à caractériser le rôle de ce miARN dans un modèle de progéniteurs neuraux humain et étudier l'effet de sa sur-expression sur leurs capacités de prolifération et différenciation. Les résultats de cette étude ont été publiés dans la revue Molecular Autism.

B - Rôle de *miR-146a* dans la différenciation des progéniteurs neuraux humains

RESEARCH

Open Access

Role of *miR-146a* in neural stem cell differentiation and neural lineage determination: relevance for neurodevelopmental disorders



Lam Son Nguyen^{1,2*}, Julien Fregeac^{1,2}, Christine Bole-Feysot¹, Nicolas Cagnard¹, Anand Iyer³, Jasper Anink³, Eleonora Aronica³, Olivier Alibeu¹, Patrick Nitschke¹ and Laurence Colleaux^{1,2} 

Abstract

Background: MicroRNAs (miRNAs) are small, non-coding RNAs that regulate gene expression at the post-transcriptional level. miRNAs have emerged as important modulators of brain development and neuronal function and are implicated in several neurological diseases. Previous studies found *miR-146a* upregulation is the most common miRNA deregulation event in neurodevelopmental disorders such as autism spectrum disorder (ASD), epilepsy, and intellectual disability (ID). Yet, how *miR-146a* upregulation affects the developing fetal brain remains unclear.

Methods: We analyzed the expression of *miR-146a* in the temporal lobe of ASD children using Taqman assay. To assess the role of *miR-146a* in early brain development, we generated and characterized stably induced H9 human neural stem cell (H9 hNSC) overexpressing *miR-146a* using various cell and molecular biology techniques.

Results: We first showed that *miR-146a* upregulation occurs early during childhood in the ASD brain. In H9 hNSC, *miR-146a* overexpression enhances neurite outgrowth and branching and favors differentiation into neuronal like cells. Expression analyses revealed that 10% of the transcriptome was deregulated and organized into two modules critical for cell cycle control and neuronal differentiation. Twenty known or predicted targets of *miR-146a* were significantly deregulated in the modules, acting as potential drivers. The two modules also display distinct transcription profiles during human brain development, affecting regions relevant for ASD including the neocortex, amygdala, and hippocampus. Cell type analyses indicate markers for pyramidal, and interneurons are highly enriched in the deregulated gene list. Up to 40% of known markers of newly defined neuronal lineages were deregulated, suggesting that *miR-146a* could participate also in the acquisition of neuronal identities.

Conclusion: Our results demonstrate the dynamic roles of *miR-146a* in early neuronal development and provide new insight into the molecular events that link *miR-146a* overexpression to impaired neurodevelopment. This, in turn, may yield new therapeutic targets and strategies.

Keywords: Autism spectrum disorders, microRNA, Human neural stem cell, Transcriptome

* Correspondence: lamson.nguyen@inserm.fr; lam-son.nguyen@inserm.fr

¹INSERM UMR 1163, Laboratory of Molecular and pathophysiological bases of cognitive disorders, Imagine Institute, Necker-Enfants Malades Hospital, 24 Boulevard du Montparnasse, 75015 Paris, France

²Paris Descartes–Sorbonne Paris Cité University, 12 Rue de l'École de Médecine, 75006 Paris, France

Full list of author information is available at the end of the article



Background

Studies now indicate that epigenetic modifications play a role in neurodevelopmental disorders. The heritability rate of autism spectrum disorder (ASD) is over 50% with the remaining attributed to environmental/epigenetic factors [1]. MicroRNA (miRNA), one such factor, fine-tunes gene expression required for the development and function of cells and organs. Previously, our group and others implicated upregulation of *miR-146a* as the most common miRNA deregulation event in ASD [2, 3] and related neurodevelopmental disorders such as epilepsy [4] and intellectual disability (ID) [2]. In ASD, studies reported *miR-146a* upregulation in olfactory mucosal stem cells [2], skin fibroblasts [2], and a lymphoblastoid cell line [5] sampled from living patients and the frontal cortex of adult post-mortem brain samples [6]. In post-mortem samples from ASD brains [7], *miR-146a* promoter correlates with an increased level of the active H3K27ac histone mark suggesting that the observed upregulation is due to transcriptional deregulation. In epilepsy, *miR-146a* is upregulated in astrocytes in region proximal to the lesions [4, 8]. Importantly, treatment with either an *anti-miR-146a* [9] or a *miR-146a* mimic [10] can ameliorate the latency, frequency, and duration of induced seizures in a rat model of temporal lobe epilepsy, emphasizing the causality and the reversibility of *miR-146a* effects. Understanding the functions of this miRNA in the brain may thus offer opportunities to develop treatments that are currently not available for neurodevelopmental disorders.

miR-146a is independently transcribed and processed and evolutionary conserved to lower vertebrates such as zebrafish and fruit fly. In the mouse brain, it is expressed ubiquitously during embryonic development [2]. In post-natal stages, its expression becomes restricted to neurons in regions important for higher cognitive and social functions including frontal cortex, amygdala, and hippocampus [2]. *miR-146a* is well known as a suppressor of inflammatory response by targeting *TRAF6* and *IRAK1* [11]. Its role in brain development is less well explored. In vitro data demonstrate that *miR-146a* regulates the homeostasis and function of brain cells in a developmental stage and cell type-specific manner. In primary mouse neural stem cell (NSC) cultured in EGF and FGF2, *miR-146a* overexpression promoted neuronal differentiation and cell cycle exit by targeting *Notch1* [12]. In mature primary mouse neurons, its overexpression altered dendritic arborization [2] and induced AMPA receptor endocytosis [13], while transfection with the *anti-miR-146a* reduced the frequency and amplitude of synaptic transmission [13]. In rat primary NSC cultured in N2 and bFGF, overexpression of *miR-146a* promoted astrocyte differentiation by inhibiting *Syt1* and *Nlgn1* expression [14]. In primary mouse astrocyte culture,

miR-146a overexpression hindered migration [12] and proliferation rate and increased glutamate uptake capacity [2].

Collectively, these studies suggest that *miR-146a* contributes to the maintenance and differentiation of NSC. Yet, how *miR-146a* controls the equilibrium among key genes that promote or inhibit entry into the neurogenic program in human NSC remains unclear. We also do not know how this extrapolates to human brain development. To address these issues, we combined expression analyses in human brain samples and in vitro studies on H9-derived human NSC (H9 hNSC) modified to overexpress *miR-146a*.

Methods

Patient information

Freshly frozen brain samples were acquired from the NIH Neurobiobank from donors with ASD diagnosis and normal controls. There was no difference in the distribution of sex, ethnicity, average age, nor post-mortem interval (PMI) between the ASD and the control groups (results not shown). The causes of death vary; more ASD donors died from accidents, and more control donors died from infection and heart failure (see Additional file 1: Table S1).

Whole exome sequencing technique and analysis

DNA was extracted from frozen brain samples using QIAamp DNA Mini Kit (51304, QIAGEN) with RNase A treatment (19101, QIAGEN) following the manufacturer's instruction. WES libraries were prepared from 3 µg of genomic DNA sheared with a Covaris S2 Ultrasonicator. Exome capture was performed as recommended by the manufacturer with the 51 Mb SureSelect Human All Exon kit V5 (Agilent technologies). Sequencing of the WES libraries was carried on a pool of bar-coded exome libraries on a HiSeq2500 (Illumina) using the HighOutput mode (48 WES libraries per FlowCell). 76+76 paired-end reads were generated. After demultiplexing, paired-end sequences were mapped on the human genome reference (NCBI build37/hg19 version) using BWA. The depth of coverage obtained for each sample was > 80× with > 90% of the exome covered at least by 15×. SNPs and indels calling were made using GATK tools. An in-house software (PolyWeb) was used to annotate and filter the variants. Variant filtering was performed as previously described. Following a published protocol [2], we performed whole exome sequencing (WES) to identify possible deleterious single nucleotide variants (SNVs) in known ASD genes (as collated in SFARI Database) and intellectual disability genes (Necker ID-Panel) in patients (see Additional file 1: Table S2). SNVs in two patients (5308 and 4721) are known single nucleotide polymorphism (SNPs) and

unlikely to be pathogenic. We could not confidently establish a genetic cause for most patients, except one. Patient 1349 carried a heterozygous SNV leading to premature termination codon in *SEMA5A* (OMIM 209850), which could explain his phenotype.

Extraction and analysis of miRNAs

Approximately 50 mg of frozen brain samples were lysed in 600 µl of Lysis/Binding solution from the miRVana™ miRNA isolation kit (AM1560, ThermoFisher Scientific) using FastPrep Lysing Matrix D (116913500, MP Bio-medicals) on a FastPrep®-24 Instrument (MP Biomedicals). The samples were spun for 30 s at 13,000 RPM to reduce bubbles, after which extraction was performed according to the instruction of the manufacturer to obtain total RNA. The concentration was checked by NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific). Expression profiles of *miR-146a* and 2 housekeeping miRNAs (*miR-106a* and *miR-17*) were assessed using Taqman assays on Fluidigm 98.98 array in technical quadruplicates. The qPCR analysis was carried out on the qPCR-HD-GPC core facility of the ENS and was supported by grants from Région Ile de France. The analysis was performed using mean of housekeeping miRNAs and average of all controls as references.

Human neural stem cell culture and differentiation

GIBCO® hNSC (H9 hESC-Derived) was purchased commercially (N7800100, ThermoFisher Scientific). Cells were cultured in flasks or plates previously coated for at least 1 h with GelTrex™ LDEV-Free, hESC-qualified, reduced growth factor basement membrane matrix (A1413302, ThermoFisher Scientific). Cells were maintained in Complete StemPro® NSC SFM medium (growth media) consisting of KnockOut™ D-MEM/F-12 (12660012, ThermoFisher Scientific) supplemented with 2% StemPro® Neural Supplement (A1050901, ThermoFisher Scientific), 20 ng/mL EGF (PHG0315, ThermoFisher Scientific), 20 ng/mL bFGF (GF003, ThermoFisher Scientific), 2 mM GlutaMax™-I (35050038, ThermoFisher Scientific), and 10 µg/mL Penicillin-Streptomycin (15,140,122, ThermoFisher Scientific). For passaging, cells were washed once with DPBS (14190169, ThermoFisher Scientific) and detached from the surface by StemPro™ Accutase (A1110501, ThermoFisher Scientific), centrifuged at 1500 RPM for 5 min and replated in fresh growth media. To initiate spontaneous differentiation, H9 cells were plated at a density of 20,000 cells/cm² in growth media for 24 h, after which media was replaced with differentiating media (growth media without growth factors). Differentiating media was changed every 2–3 days during the course of the differentiation process.

Infection and selection of stably integrated H9 cells

The seed of the *miR-146a-5p* in the pLenti-III-miR-146a-GFP construct (mm10082, ABM) 5'-T(GAGAACTG)AATTCCATGGGTT-3' was destroyed using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (200515, Agilent) to produce to *miR-146a-Mut* construct 5'-T(ATAGGAG)AATTCCATGGGTT-3'. Lentivirus were then produced from the construct by the Plateforme Vecterus Viraux et Transfert de Gènes from Hospital Necker as a paid service. Viral titer was determined by FACS of GFP signal. Virus infection was performed at the multiplicity of infection (MOI) of 5 in growth media, which was replaced after 24 h. Cells were grown in growth media for 72 h; Puromycin (11113802, ThermoFisher Scientific) at 1 µg/ml was then added to the media for 72 h to eliminate all cells without stable integration of the viral DNA containing the transgene and the Puromycin resistance gene. Cells were recovered in normal growth media until reaching confluence. All experiments were performed at the earliest passages possible.

Proliferation and apoptosis rate analysis

Cells were plated on coated 96-well plate (92096, TPP) in normal growth media. Twenty-four hours after, media was replaced with growth media containing 1/200 Annexin V Incucyte reagent (4641, Essen Bioscience). Cells were cultured inside the Incucyte® Live Cell Analysis System (Essen Bioscience), and images were taken at determined interval consecutively during several days using × 20 objective and at multiple spots per well. In post-analysis, a mask was designed using an inbuilt apoptosis analysis module to count the red apoptotic cells and the cell confluence percentage, which was used to normalize for cell numbers (see Additional file 2: Figure S2a). The same mask was applied to all time points and all repeats.

Differentiation analysis

Cells were plated on coated 24-well plate (92024, TPP) in normal growth media. Twenty-four hours after, growth media was replaced with differentiating media, which was refreshed every 2–3 days. Cells were cultured inside the IncuCyte® Live Cell Analysis System (Essen Bioscience), and images were taken every 3 h for 14 days using × 20 objective and at 25 different spots per well. In post analysis, a mask was designed using the inbuilt neurite analysis module to detect neurites and cell body. The same mask was applied to all time points and all repeats to record neurite extension over time.

FACS analysis

Cells were plated on coated T25 tissue flask (90025, TPP) in normal growth media. Twenty-four hours after, growth media was replaced with differentiating media,

which was refreshed every 2–3 days. Cells were collected at 1 and 2 weeks into the differentiation process by scraping the surface of the vessels. Cells were then washed once with DPBS and incubated on ice for 30 min with the blue fluorescent reactive dye from the Live/dead fixable dead cell stain kit (L23105, ThermoFisher Scientific). Cells were washed once with DPBS and fixed in 1 ml of IC Fixation Buffer (FB001, ThermoFisher Scientific) for 5 min followed by 2 washes in IC Permeabilization Buffer (PB001, ThermoFisher Scientific) + 1% BSA. Cells were resuspended into 100 μ l of IC Permeabilization Buffer + 1% BSA and primary antibodies at the desired concentrations for 1 h on ice. Cells were washed twice in IC Permeabilization Buffer + 1% BSA and incubated in the same media with the secondary antibodies at desired concentrations for 1 h on ice. Cells were washed twice with DPBS + 1% BSA and analyzed immediately on the BD FACS Aria II machine (BD Biosciences). Primary antibody list: polyclonal rabbit anti-NESTIN (N5413, Sigma), monoclonal mouse anti-TUB-III eFluor® 570 conjugated (41-4510, eBioscience), monoclonal mouse anti-GFAP eFluor® 660 (50-9892, eBioscience); secondary antibody list: donkey anti-rabbit Alexa Fluor 555 (A31572, ThermoFisher Scientific).

RNA sequencing technique and analysis

We tested cells from three independent experiments using three consecutive passages. Total RNA was extracted using TRIzol reagent (15596026, ThermoFisher Scientific) and RNeasy Mini Kit (74104, QIAGEN) with DNase I treatment step (79254, QIAGEN) following the manufacturer's protocol. The integrity of RNA was determined by RNA ScreenTape (5067-5576, Agilent Technologies) on the Agilent 4200 TapeStation (Agilent Technologies). RNA-seq libraries were prepared starting from 600 ng of total RNA using the TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit (Illumina) as recommended by the manufacturer. Half of the oriented cDNA produced from the poly-A⁺ fraction were PCR amplified (11 cycles). RNA-seq libraries were sequenced on an Illumina HiSeq2500 (Paired-End sequencing 130 $\times$ 130 bases, High Throughput Mode). A minimum of 10 million of paired-end reads was produced per library sample. Sequence reads were aligned to the human HG19 reference genome using the Burrows-Wheeler Alignment version 0.6.2.13. Raw and processed data for all samples are available for download from Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under accession number GSE100670. RNA-Seq data were analyzed using a combination of three different tools namely limma [15], DESeq2 [16], and edgeR [17].

Quantitative reverse transcription PCR analysis (RT-qPCR)

To validate the RNA-Seq results, we selected 27 genes with relevant neuronal function or corresponding to known *miR-146a* targets and tested their expression by quantitative RT-PCR (RT-qPCR) on the Fluidigm 48.48 chip. As six of these genes were identified as DEGs in both conditions, this analysis included 33 comparisons. The qPCR analysis was performed at the qPCR-HD-GPC core facility of the ENS and was supported by grants from Région Ile de France. The analysis was performed using geometric mean of four housekeeping genes (*CYC1*, *GPBP1*, *RPL13A*, and *SDHA*) and average of the *miR-146a*-Mut repeats as references. No significant difference was detected for the 4 housekeeping genes. Lists of primers can be found in Additional file 1: Table S5.

In silico analyses

Known targets of *miR-146a* were extracted from miR-TarBase [18]. Predicted targets were extracted from miR-DIP [19]; only genes predicted by at least three different programs were considered. Target prediction of *miR-146a*-mut was performed using miRDB [20]. Pathway and function enrichment was analyzed using Ingenuity Pathway Analysis (QIAGEN). Protein-protein interaction map was extracted from STRING database [21] and further analyzed using Cytoscape V3.4.0 (<http://www.cytoscape.org>). Protein interaction enrichment was identified by ClusterOne Plugin downloaded from Cytoscape database. Analyses of expression in different brain regions throughout lifespan and brain cell type enrichment were performed using published code [22] in R program; please refer to the original publication for detailed description. Graphs and statistical analyses were generated by Partek Genomics Suite V6.0.

Dual luciferase assay

The 3' untranslated region (UTR) of *DCX*, *GAD1*, and *PAK3* were subcloned into the psiCheck2 plasmid (Promega). Due to their size, the 3'UTR of *DCX* and *PAK3* were cloned into 2 (924 and 810 bp) and 3 parts (1106, 673, and 524 bp), respectively; each of these parts contains at least 3 predicted *miR-146a* binding sites. For luciferase assay, 2×10^5 HEK293T cells were plated in each well of a 6-well plate the day before transfection. Cells were transfected with the psiCheck2 3'UTR clones and the synthetic *miR-146a* (4464067, ThermoFisher Scientific) or *miR-mimic* for control (4464058, ThermoFisher Scientific) using JetPRIME® Polyplus Transfection Reagent (Ozyme) following the manufacturer's instruction. Assay were performed using the Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) 48 h after transfection. Ratio of Renilla to Firefly luciferase was taken as mean

of technical triplicates. Three independent transfections were performed to confirm the results.

Results

miR-146a overexpression occurs early during human brain development

ASD, which is diagnosed before the age of 3, is associated with brain defects arising during early development, including enlarged brain volume (2–5%) that ameliorates in later stages [23] and disorganized cortical layers [24]. As a first step to understand how *miR-146a* overexpression may contribute to ASD, we asked whether it could be detected early during brain development. Using a Taqman assay, we analyzed the expression of *miR-146a* and two housekeeping miRNAs (*miR-106a* and *miR-17*) in the temporal lobe (Brodmann's Area 21) of ASD children (4–9 years old) (see the “Methods” section and Additional file 1: Tables S1, S2 for detailed sample description). We observed a 1.3-fold increase in *miR-146a* expression in the patient samples compared to controls (see Fig. 1a), demonstrating that *miR-146a* upregulation is observed during the early stages of ASD progression/emergence.

Generation and validation H9 hNSC lines overexpressing *miR-146a*

To elucidate the role of *miR-146a* in neural development, we used integrating viral approach to establish two H9 hNSC lines stably overexpressing a wild-type *miR-146a* gene or its mutant form, *miR-146a-Mut* (see Fig. 1b). Transgene expression was validated by either Taqman assay for *miR-146a* (see Fig. 1c) or measurement of the GFP transcript level by RT-qPCR for the *miR-146a-Mut* cell (see Fig. 1d). These lines were also validated using RNA-Seq, which showed a significant downregulation of known *miR-146a* target transcripts [18], including *ICAM1*, *FAS*, *IRAK2*, *CFH*, *CDKN1A*, *TLR4*, *L1CAM*, and *CARD10* (see Fig. 1e). Predicted targets of *miR-146a* were more frequently downregulated compared to those of *miR-146a-Mut* (20 vs. 5 targets with fold change > 1.5 and $P < 0.05$ in undifferentiated cells; $P < 0.01$ by Fisher's Exact Test), suggesting that off-target effect due to *miR-146a-Mut* overexpression was minimal. In addition, array comparative genomic hybridization analysis did not identify any copy number variation, indicating that the genomes of the newly established lines were stable (results not shown).

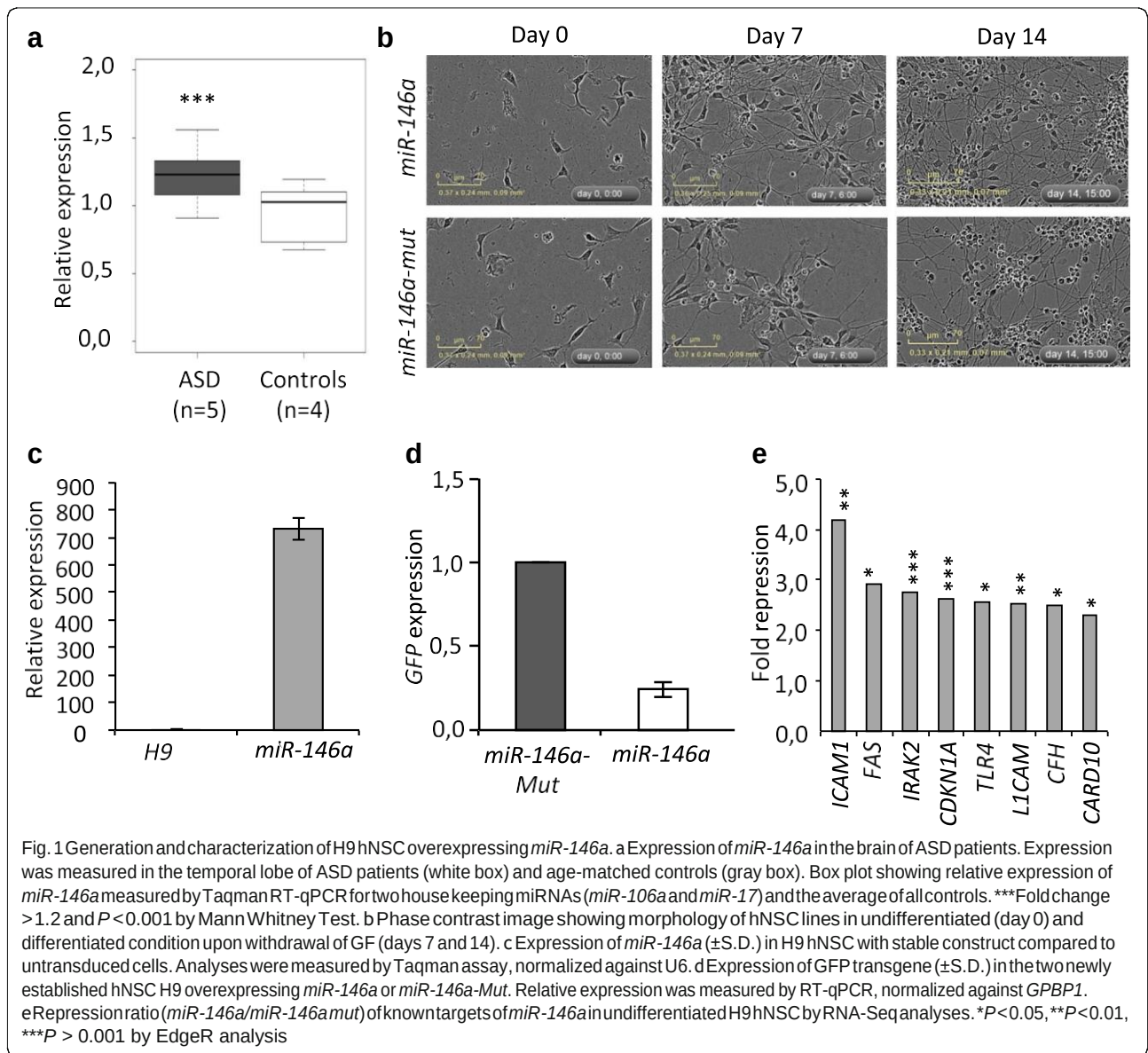
miR-146a promotes hNSC differentiation

We then assessed the effects of *miR-146a* overexpression using live cell imaging (see Additional file 2: Figure S1a). In normal growth conditions, overexpression of *miR-146a* had no effect on the proliferation rate or the apoptotic rate of the cells (see Additional file 2: Figures

S1b ,c). In contrast, upon induction of differentiation by withdrawal of EGF and bFGF growth factors, we observed a significant decrease in the proliferation rate (see Fig. 2a). The apoptotic rates of the *miR-146a* and *miR-146a-Mut* lines increased during cell differentiation, but there was no difference between them (see Fig. 2b). Importantly, over the 2-week course of differentiation, we observed increased dendritic branching (see Fig. 2c) and extension (see Fig. 2d) in the *miR-146a* line compared to control. Undifferentiated H9 hNSC co-express NESTIN, β -III-TUBULIN (TUB-III), and GFAP [25], which are markers for progenitor, differentiated neuron and astrocyte, respectively. As differentiation proceeded, some cells lost their NESTIN expression and increased TUB-III expression, while GFAP level remained unchanged (see Additional file 2: Figure S2a,b). We calculated the ratio of cells expressing high level/low level of TUB-III and the number of NESTIN positive/negative cells after differentiation. We found that *miR-146a* overexpression induces enhanced level of TUB-III and reduced levels of NESTIN (see Fig. 2e). Collectively, these results suggest that *miR-146a* overexpression favors differentiation of H9 hNSC into neurons in response to neurogenic cue.

miR-146a overexpression alters the balance between neural progenitor cell renewal and neuronal differentiation

miRNAs regulate multiple signaling pathways through their interaction with hundreds of different transcripts. To identify the mechanisms that could contribute to neural differentiation in *miR-146a* overexpressing hNSC, we performed expression analyses. Proteomic analysis is a valuable approach to identify changes in protein levels regulated by *miR-146a*, yet, it presents important limitations including limited access to low abundant proteins which expression is triggered during differentiation. Thus, we decided to perform RNA-Seq analyses in both undifferentiated and differentiated cells to identify differentially expressed genes (DEGs) and corresponding affected pathways that may mediate the effect of *miR-146a* overexpression on neural differentiation. Compared to *miR-146a-Mut* using a threshold of $P < 0.05$ and fold change > 1.5, we detected 1185 DEGs (10% of total detected transcripts, 54% downregulated, and 46% upregulated) in undifferentiated cells (see Fig. 3a and Additional file 1: Table S3) and 1039 DEGs (9% of total detected transcripts, 59% down, and 41% upregulated) in differentiated cells (see Fig. 3a and Additional file 1: Table S4). We obtained a 97% validation rate by RT-qPCR (32/33 genes validated, $R^2 = 0.978$; see the “Methods” section; see Fig. 3b and Additional file 1: Table S5). We further validated the downregulation of PAK3 in undifferentiated and differentiated H9 NSC,



and the upregulation of NOTCH1 in differentiated cells by western blot (Additional file 2: Figure S3).

Next, we sought to identify the deregulated pathways. We first extracted high confident known and predicted interactions from STRING database [21]. In undifferentiated cells, pathway analyses suggested that DEGs affect very different classes of biological processes including axonal guidance, colorectal cancer, germ Cell-Sertoli Cell Junction Signaling (see Additional file 1: Table S6). Moreover, gene/protein interacting network was random and did not organize into functional modules (see Additional file 2: Figure S4). In contrast, analysis on data obtained from differentiated cells revealed enrichment for two networks (see Fig. 3c). Using Cytoscape with ClusterOne plugin, we found that the first network consisted of 155 genes comprising of four modules (see

Additional file 2: Figure S5 and Additional file 1: Table S7). Remarkably, all genes from this network except one are downregulated (154/155 DEGs, $P = 0$ by Fisher's Exact Test) and were enriched for cell cycle control pathways (Cell Cycle Module; see Fig. 3d and Additional file 1: Table S8). We further analyzed the remaining 884 genes by filtering out those encoding proteins with no or only one interaction (those in the outer edge). This created a second list of 350 genes with an equal distribution of up or downregulated DEGs (195 down, 153 upregulated, $P > 0.05$ by Fisher's Exact Test). Importantly, a significant enrichment for pathways related to neuronal differentiation was observed in this dataset (Neuronal Module; see Fig. 3c and Additional file 1: Table S9). To identify the drivers that could mobilize the observed interactions, we search for known and predicted *miR-146a*

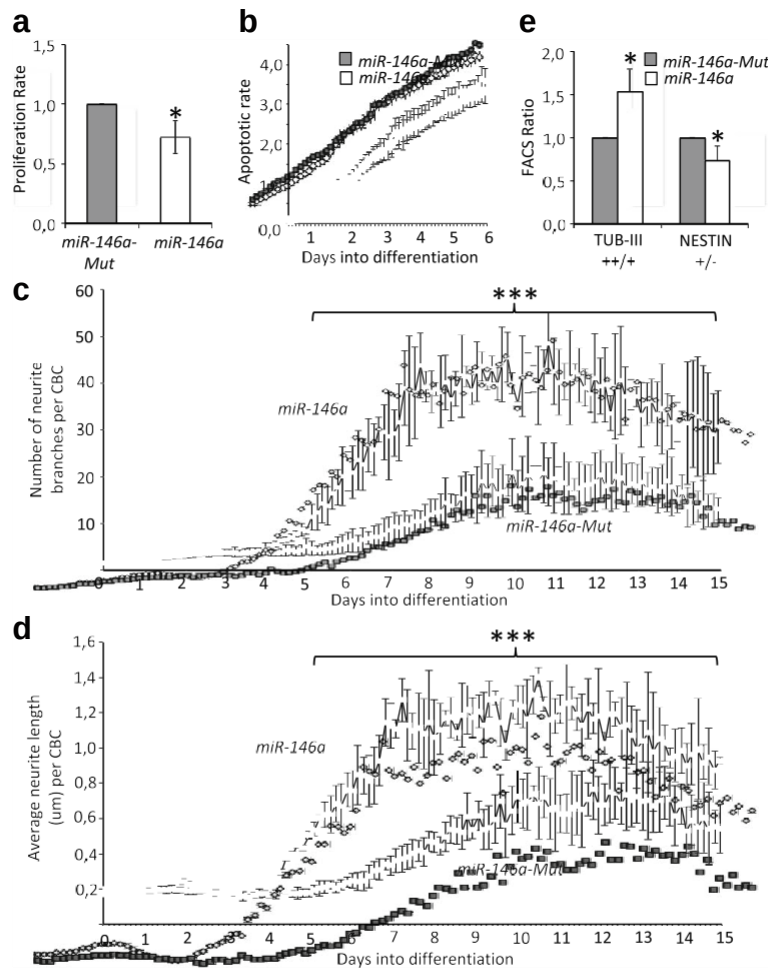


Fig. 2 *miR-146a* controls responses of H9 hNSC to neurogenic cues. a Cell proliferation rates measured using the Incucyte machine over 48 h after induction of differentiation. Graph shows the average ratio ($\pm$ S.D.) of proliferation slopes from 3 independent experiments. $*P < 0.05$ by Student's 2-tail unpaired *T* test. b Apoptotic cell rates measured by the number of Annexin V labeled cells over the confluence percentage using the Incucyte machine. Graph shows average ratio ($\pm$ S.D.) of four technical replicates and are representative of two independent repeats showing the same results. c Average number of neurite branching ($\pm$ S.D.) and average neurite length d ($\pm$ S.D.) in cells undergoing differentiation over 2 weeks. Analyses were performed using an analysis mask (see Additional file 2: Fig. S1a) on images taken at 25 different spots every 3 h over 15 days by the Incucyte machine. Results are representative of three independent repeats showing similar results. $***P < 0.001$ by Student's 2-tailed unpaired *T* test. e FACS analysis was performed on differentiated cells labeled by TUB-III or NESTIN antibodies (see Additional file 2: Figure S2 for details). Graph shows average ratio ($\pm$ S.D.) of three independent repeats. $*P < 0.05$ by Student's 2-tail unpaired *T* test

targets (as collated in miRTarBase [18] and using at least 3 different programs as collated by miRDiP [19]) that co-localized to this network (see Additional file 2: Figure S6). We chose to test the interaction between *miR-146a* and *PAK3*, *DCX* and *GAD1* by luciferase assays for their crucial roles in NSC differentiation and neuronal migration. This analysis revealed that *miR-146a* directly targets the 3'UTR of all three genes (see Fig. 3e). Taken together, our results suggested that *miR-146a* promotes cell cycle exit and neuronal differentiation by targeting 11 key cell cycle genes (*CHEK1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CCNA2*, *CDKN1A*, *CDKN3*, *TIMELESS*, *CDK1*, *CDCA5*, *E2F2* & *KIF18A*) and 9 neuronal genes (*DCX*, *PAK3*,

IRS1, *GAD1*, *SLC17A8*, *EPB41*, *MYBL1*, *IQGAP3* & *LIN28B*), 9 of which are validated targets while 11 are predicted targets of *miR-146a* (see Fig. 3f).

miR-146a overexpression affects specific regions in early human brain development

To identify the developmental stages and regions of the human brain potentially affected by the overexpression of *miR-146a*, we investigated the expression of the DEGs in a comprehensive dataset on the human brain transcriptome previously described [22, 26]. We found that expression of genes in the Cell Cycle Module is specifically restricted to early stages of fetal development in the

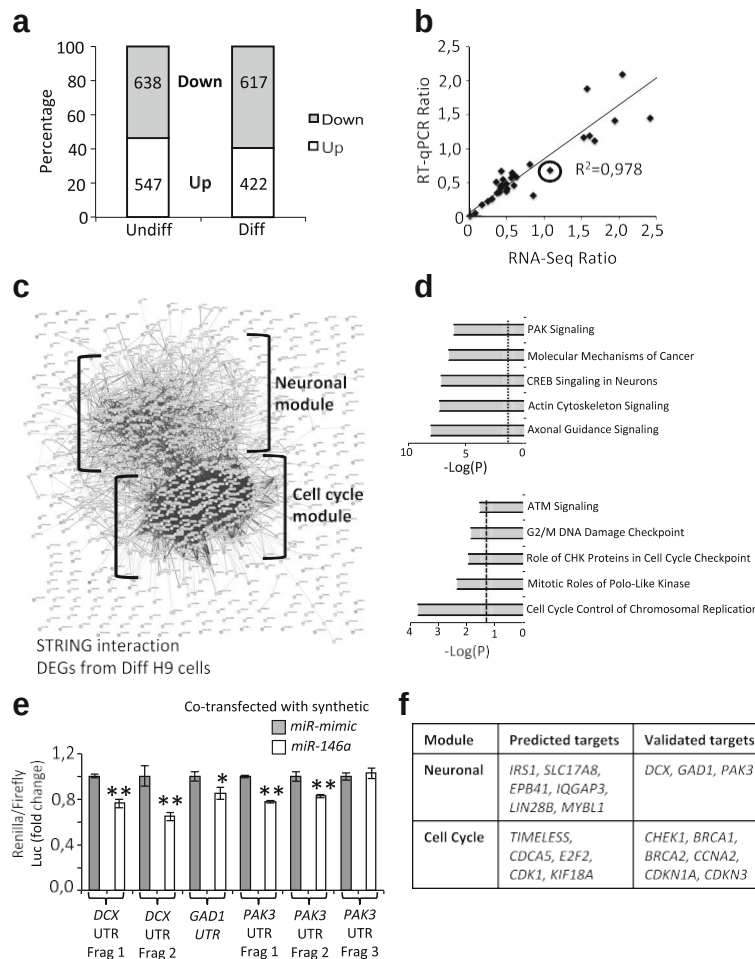


Fig. 3 *miR-146a* targets key genes to promote hNSC differentiation. **a** Distribution of DEGs identified by RNA-Seq in undifferentiated (Undiff) and differentiated (Diff) conditions. **b** Graph shows expression ratios of DEGs measured by RNA-Seq and RT-qPCR. Circle indicates only incompatible/non-validated DEGs. **c** Protein interaction network of all DEGs identified in differentiated cells mapped by STRING. Two modules are identified: Neuronal Module (top) contains 350 genes and Cell Cycle Module (bottom) contains 155 genes. **d** Top 5 pathways identified by Ingenuity Pathway Analysis of the 2 modules (see Additional file 1: Tables S8, S9 for extended lists). *emiR-146a* directly targets *DCX*, *GAD1*, and *PAK3* 3'UTR. Due to their size, the 3'UTR of *DCX* and *PAK3* were cloned into 2 and 3 fragments (frag), respectively. Each 3'UTR construct contains at least 3 predicted *miR-146a* binding sites. Ratio of Renilla/Firefly luciferase ($\pm$ SD of 3 technical replicates) was measured in cell lines co-transfected with either the synthetic *miR-mimic* (control) or the *miR-146a*. Graphs are representative of 3 independent assays showing the same results. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ by Student's 2 tailed paired *t* test. **f** List of known and predicted *miR-146a* targets that are downregulated in each respective module

hippocampus, amygdala, visual cortex, medial pre-frontal cortex, and cerebellum (see Fig. 4a). By contrast, we observed a developmental gradient of expression of genes from the Neuronal Module that increases during fetal development in the hippocampus and amygdala, peaks at an early infancy stage in all regions of the brain and persists throughout the life. Cerebellar expression seems restricted to prenatal stages (see Fig. 4b). Notably, this Neuronal Module, but not Cell Cycle Module, is significantly enriched for ASD-associated genes ($P < 0.001$ by Fisher's Exact Test, see Additional file 1: Table S4).

To further explore the contribution of *miR-146a* up-regulation on the transcriptome of ASD brain, we

compared the DEGs identified in differentiated H9 hNSC to the published DEGs identified in ASD adult post-mortem brains (cortex, temporal lobe, and frontal cortex) [27]. We identified 42 overlapping genes that share the same trend of deregulation between the two studies (6.3% of published DEGs detectable in H9 hNSC) (see Additional file 1: Table S4). Half of these genes (20/42) belong to the Neuronal Module, whereas only two belong to the Cell Cycle Module. This analysis suggested that upregulation of *miR-146a* could be responsible for a portion of transcriptomic changes seen in ASD brains and that the use of H9 hNSC could provide relevant insights into both early processes of neural differentiation and later stages of neuronal development.

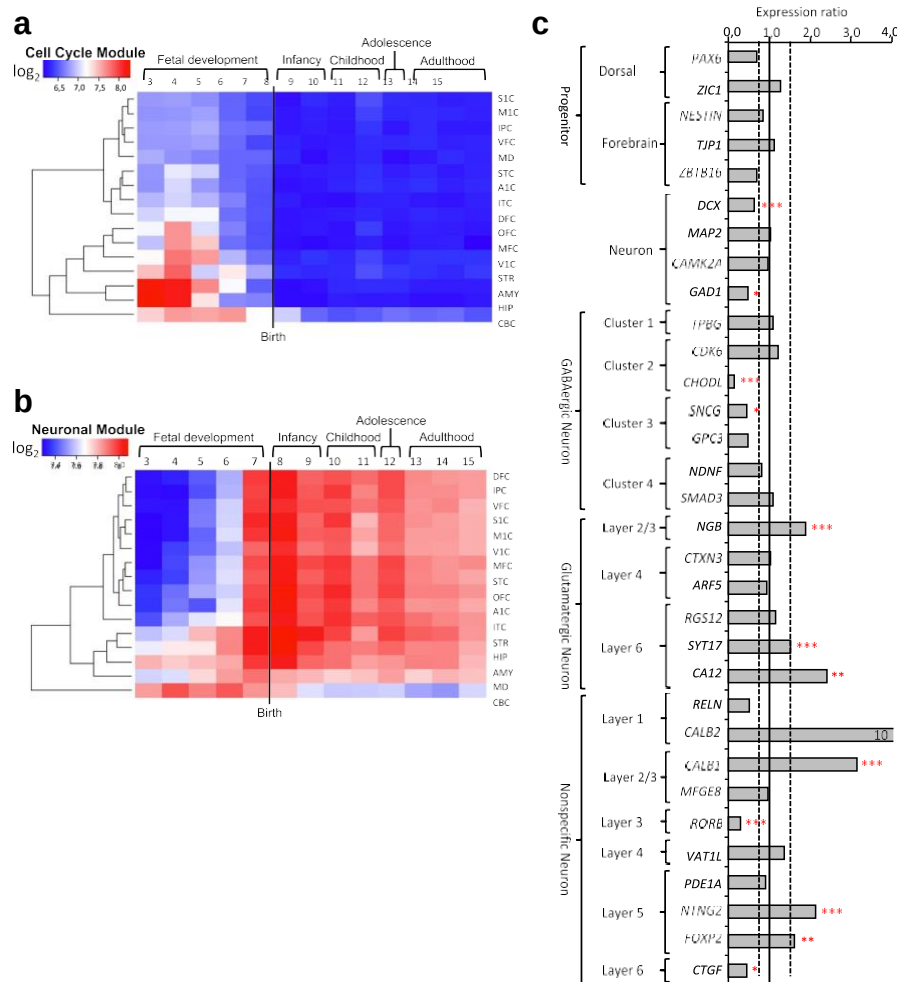


Fig. 4 *miR-146a* determines neuronal lineage identities. Heatmap of gradient of expression from the Cell Cycle (a) and Neuronal (b) Modules spanning human fetal development to late adulthood in distinct brain regions. A1C, auditory cortex; AMY, amygdala; CBC, cerebellar cortex; DFC, dorsolateral prefrontal cortex; HIP, hippocampus; IPC, posterior inferior parietal cortex; ITC, inferior temporal cortex; M1C, primary motor cortex; MD, mediodorsal nucleus of thalamus; MFC, medial prefrontal cortex; OFC, orbital prefrontal cortex; S1C, primary somatosensory cortex; STC, superior temporal cortex; STR, striatum; V1C, primary visual cortex; VFC, ventrolateral prefrontal cortex. Period labels: 3—Early fetal (10 ≤ Age ≤ 13 Post conception week, PCW); 4—Early midfetal (13 ≤ Age ≤ 16 PCW); 5—Early midfetal (16 ≤ Age ≤ 19 PCW); 6—Late midfetal (19 ≤ Age ≤ 24 PCW); 7—Late fetal (24 ≤ Age ≤ 38 PCW); 8—Neonatal and early infancy (Birth ≤ Age ≤ 6 Postnatal months, M); 9—Late infancy (6 ≤ Age ≤ 12 M); 10—Early childhood (1 ≤ Age ≤ 6 Postnatal years, Y); 11—Middle and late childhood (6 ≤ Age ≤ 12 Y); 12—Adolescence (12 ≤ Age ≤ 20 Y); 13—Young adulthood (20 ≤ Age ≤ 40 Y); 14—Middle adulthood (40 ≤ Age ≤ 60 Y); 15—Late adulthood (60 Y ≤ Age). c Expression difference of detectable neuronal specific markers in differentiated H9 hNSC. Dotted lines indicate expression difference threshold (fold change ≥ 1.5). **P* < 0.05, ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001 by EdgeR analysis (as representative of 3 different RNA-Seq analyses)

miR-146a overexpression correlates with abnormal lineage-specific gene expression

The central nervous system contains many diverse neuronal subtypes that have been classified into 50 different groups based on single-cell gene expression profiles [28]. Since *miR-146a* overexpression alters hNSC differentiation, we asked whether it also affects neural cell fate programming and impacts neuronal specialization. Our RNA-seq data indicated that the Neuronal Module is enriched for genes expressed in pyramidal neurons and interneurons (*P* < 0.05; see Additional file 1: Table S10) [22], even though the Cell Cycle Module is broadly expressed

in all cell types (see Additional file 1: Table S10). When examining the expression of all 87 established cortical layer-specific, neuronal-specific, and progenitor-specific markers from published sources [24, 28, 29], we observed that 40% (13/32) of detectable markers for differentiated H9 cells were significantly deregulated in hNSC overexpressing *miR-146a* (see Fig. 4c). These markers were for GABAergic neurons (*CHODL*, *GAD1*, *SNCG*), glutamatergic neurons (*NGB*, *SYT17*, *CA12*), layers 2/3 (*CALB1*, *CALB2*), layer 4 (*RORB*), layers 5/6 (*NTNG2*, *FOXP2*, *CTGF*), and migrating neurons (*DCX*) (see Fig. 4c). These results strongly suggest that regulation of *miR-146a*

expression level is important to correctly acquire neuronal lineage identities.

Discussion

In this study, we provided insight into the role of *miR-146a* in brain development and its relevance for neurodevelopmental disorders by combining the analyses of post-mortem human brain samples and in vitro models. We demonstrated that *miR-146a* overexpression in the brain of ASD patient is an early event detectable from childhood at an age when ASD are typically diagnosed (see Fig. 1a). Albeit the limited number of samples tested, this is the fifth time that this miRNA has been found upregulated in an independent cohort [2, 3, 5, 6]. In neural-relevant cell types, upregulation of *miR-146a* has been reported in adult cortex BA10 [6] and in adult olfactory mucosal stem cells (OMSC) [2]. These results collectively suggest that *miR-146a* upregulation is an event that occurs during embryogenesis and continues throughout development.

Our in vitro analyses on hNSC suggest that *miR-146a* contributes to the regulation of balancing cell-cycle exit/cell-cycle re-entry of neural progenitors and committing to neural differentiation pathways. These results are in agreement with previously published studies. Indeed, overexpression of *miR-146a* has been shown to induce cell cycle arrest in normal [2] or malignant mouse astrocytes [12], in human non-small cell lung cancer cells [30] and in mouse NSC [12]. Increased *miR-146a* level also enhanced neuronal differentiation in mouse NSC through suppression of *Notch1* [12]. However, in our study, we found that NOTCH1 was upregulated in differentiated H9 NSC. This can be explained by two major differences: (i) unlike the mouse *Notch1*, the human *NOTCH1* gene is not predicted to be a target of *miR-146a*, and (ii) activation and not suppression of NOTCH1 is required for human NSC differentiation [31]. This emphasizes the relevance of using human H9 NSC to model early neuronal development of patients with ASD. In addition, we propose that *miR-146a* modulates the homeostasis of NSC by targeting directly and concurrently at least 20 different key neuronal and cell cycle genes, 9 of which are validated targets while 11 are predicted targets (see Fig. 3f). Thus, while inhibition of vesicular glutamate transporters (VGLUTs) promotes neuronal differentiation and migration of NPCs [32], we observed that *miR-146a* overexpression caused downregulation of the vesicular glutamate transporter gene *SLC17A8*. Similarly, RNA-Seq data revealed downregulation of the *LIN28B* gene; the RNA binding protein LIN28B plays essential functions in neuroblast proliferation by maintaining neural progenitors in an early state [33]. Lastly, *miR-146a* overexpression downregulates several CDK genes including *CDKN1A*, *CDKN3*, and *CDK1*, which encode for key proteins controlling the

length of G₁ phase during cell-cycle and the balance between progenitor maintenance and generation of differentiated neurons [34].

Cortical cytoarchitecture relies on the spatiotemporal coordination of neuronal production rate, precursors cell-cycle control, and neuronal radial migration toward the cortical plate. Radial glial cells (RGC), the key progenitor cells in the developing CNS, divide asymmetrically to generate a new RGC as well as a post-mitotic neuron or an intermediate progenitor daughter cell. Neurons migrate toward the cortical plate along the fibers of RGC to reach their final position within the nascent neocortex and acquire their specific identity. Migration and final laminar positioning of neurons relies the fine-tuning of cell type- and layer-specific transcription factors [35]. Our results suggest that upregulation of *miR-146a* could disturb these transcriptional programs and may contribute to the disorganization of cortical layers [24] and the increase in number of neurons [36] and dendritic spine density [37] observed in ASD brains.

Data from RNA-Seq indicate that DEGs in H9 hNSC are significantly enriched for markers for pyramidal and interneurons, as well as markers for GABAergic (up regulated) and glutamatergic neurons (down regulated) (see Fig. 4c and Additional file 1: Table S10), suggesting that *miR-146a* may also contribute to the adequate distribution of these neurons. In mouse, artificially enhanced number of pyramidal neurons in the upper neocortical layers impaired neurite extension and laminar distribution of interneurons, ultimately leading to autism-like phenotype [38]. In human, Wegiel et al. examined post-mortem brains of 14 subjects with ASD and reported localized deficit of pyramidal neurons in the CA1 sector in 3 subjects and thickening of pyramidal layer in the CA1 sector in another [39]. The number of PVALB positive interneurons, a GABAergic subtype, was also found significantly reduced in prefrontal cortex BA46, BA47, and BA9 in 11 ASD cases [40]. As such, our results will direct future investigations into the role of *miR-146a* in the signaling cascade mediating the determination and acquisition of neuronal lineage identities.

Conclusion

The accurate generation of an appropriate number of different neuronal and glial subtypes is fundamental for normal brain functions. It requires tightly orchestrated, spatial, and temporal developmental programs to maintain the balance between neural progenitor cell proliferation and differentiation. While ASD is often considered as caused by synaptic dysfunction [41], several evidence from human neuropathology,

systems biology, and developmental biology implicated dysregulation of the cell cycle and cortical lamination in the developing brain as a potential common pathophysiological mechanism underlying ASD [42–45]. Based on our results, we speculate that *miR-146a* plays a dynamic role to shape brain development from early neurogenesis to synaptic maturation and propose that *miR-146a* overexpression could provide a potential unifying explanation for brain dysfunctions observed in neurodevelopmental disorders.

Additional file

Additional file 1: Table S1. Detailed information of all patients and controls whose brain samples were used in this study. Table S2. Possibly deleterious variants in known ASD and ID genes. Table S3. DEGs identified in undifferentiated cells. Table S4. DEGs identified in differentiated cells. Table S5. Validation of RNA-Seq using RT-qPCR on Fluidigm array. Table S6. Top 20 canonical pathways deregulated in undifferentiated cells. Table S7. Top 4 nodes enriched for protein-protein interaction as calculated by ClusterOne Plugin. Table S8. Top 20 canonical pathways deregulated in the cell cycle modules of differentiated cells. Table S9. Top 20 canonical pathways deregulated in the cell neuronal modules of differentiated cells. Table S10. Cell type enrichment analysis of DEGs from the Cell Cycle and Neuronal Modules. (XLSX 888 kb)

Additional file 2: Figure S1. Characteristics of undifferentiated H9 hNSC. Figure S2. FACS analyses of cell type specific markers NESTIN, GFAP and TUB-III in undifferentiated and differentiated conditions. Figure S3. Western blot validation of PAK3 and NOTCH1 expression in undifferentiated and differentiated H9NSC. Figure S4. Protein interaction network of all DEGs in undifferentiated cells predicted by STRING. Figure S5. Top four interacting networks corresponding to the cell cycle module in differentiated cells. Figure S6. Co-localization of known and predicted targets of miR-146a in the protein interaction network of DEGs in differentiated cells. (PPTX 7099 kb)

Abbreviations

ASD: Autism spectrum disorder; CNS: Central nervous system; DEG: Differentially expressed gene; hNSC: Human neural stem cell; ID: Intellectual disability; miRNA: MicroRNA; MOI: Multiplicity of infection; OMSC: Adult olfactory mucosal stem cell; PMI: Post-mortem interval; RGC: Radial glial cell; RT-qPCR: Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; SNP: Single nucleotide polymorphism; SNV: Single nucleotide variant; TUB-III: β -III-TUBULIN; WES: Whole exome sequencing

Acknowledgements

Human tissues were obtained from University of Maryland Brain and Tissue Bank, which is a Brain and Tissue Repository of the NIH Neurobiobank. We would like to thank Bertrand Ducos, Juliette Pouch, and Elise Diaz for their help with the Fluidigm analysis. We would like to thank the core platforms of the Imagine Institute, notably the Cell Imaging Platform, the Gene Transfer Vector Platform for the virus production, the Cell Sorting Facility for their help with performing the FACS analyses and the Histology and Morphology Facility for their help with paraffin inclusion of brain samples and advice on analyses.

Funding

This work received a state subsidy managed by the National Research Agency under the "Investments for the Future" program bearing the reference ANR-10-IHU-01 and the "ANR-SAMENTA 2012" program. This work was also supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20160334938), the Fondation de France and the MSD Avenir Fund (Devo-Decode Project). LC is supported by the Centre National de la Recherche Scientifique. JF is supported by Crédit Agricole d'Ile-de-France Mécénat. We thank Life Science Editors for editing assistance.

Availability of data and materials

The RNA-Seq data are available for download from Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under accession number GSE100670.

Authors' contributions

LSN and LC designed and supervised the research. LSN performed all the experiments unless specified otherwise. JF cloned the miRNA expression constructs. CBF and OA performed the next generation sequencing experiments. NC and PN analyzed the next generation sequencing data. AI, JA, and EA helped analyze the human tissue biopsies. LSN and LC wrote the manuscript. All the authors reviewed the manuscript and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Brain biopsies were obtained from the University of Maryland Brain and Tissue Bank, which is a Brain and Tissue Repository of the NIH Neurobiobank. Consents were given to the Neurobiobank to redistribute biopsies for approved research (NBB_302).

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹INSERM UMR 1163, Laboratory of Molecular and pathophysiological bases of cognitive disorders, Imagine Institute, Necker-Enfants Malades Hospital, 24 Boulevard du Montparnasse, 75015 Paris, France. ²Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, 12 Rue de l'École de Médecine, 75006 Paris, France.

³Department of (Neuro) Pathology, Academic Medical Center, University of Amsterdam, 1105 AZ Amsterdam, The Netherlands.

Received: 4 January 2018 Accepted: 30 May 2018

Published online: 19 June 2018

References

- Sandin S, Lichtenstein P, Kuja-Halkola R, Larsson H, Hultman CM, Reichenberg A. The familial risk of autism. *JAMA*. 2014;311:1770–7.
- Nguyen LS, Lepleux M, Makhoul M, Martin C, Fregeac J, Siquier-Pernet K, Philippe A, Feron F, Gepner B, Rougeulle C, et al. Profiling olfactory stem cells from living patients identifies miRNAs relevant for autism pathophysiology. *Mol Autism*. 2016; <https://doi.org/10.1186/s13229-015-0064-6>.
- Fregeac J, Colleaux L, Nguyen LS. The emerging roles of MicroRNAs in autism spectrum disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016;71:729–38.
- Iyer A, Zurolo E, Prabowo A, Fluiter K, Spliet WG, van Rijen PC, Gorter JA, Aronica E. MicroRNA-146a: a key regulator of astrocyte-mediated inflammatory response. *PLoS One*. 2012;7:e44789.
- Talebizadeh Z, Butler MG, Theodoro MF. Feasibility and relevance of examining lymphoblastoid cell lines to study role of microRNAs in autism. *Autism Res*. 2008;1:240–50.
- Mor M, Nardone S, Sams DS, Elliott E. Hypomethylation of miR-142 promoter and upregulation of microRNAs that target the oxytocin receptor gene in the autism prefrontal cortex. *Mol Autism*. 2015;6:46.
- Sun W, Poschmann J, Cruz-Herrera Del Rosario R, Parikshak NN, Hajan HS, Kumar V, Ramasamy R, Belgard TG, Elangovan B, Wong CC, et al. Histone Acetylation-wide Association Study of Autism Spectrum Disorder. *Cell*. 2016;167:1385–97. e1311.
- Aronica E, Fluiter K, Iyer A, Zurolo E, Vreijling J, van Vliet EA, Baayen JC, Gorter JA. Expression pattern of miR-146a, an inflammation-associated microRNA, in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci*. 2010;31:1100–7.
- He F, Liu B, Meng Q, Sun Y, Wang W, Wang C. Modulation of miR-146a/complement factor H mediated inflammatory responses in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Biosci Rep*. 2016;36(6):e00433.
- Tao H, Zhao J, Liu T, Cai Y, Zhou X, Xing H, Wang Y, Yin M, Zhong W, Liu Z, et al. Intranasal delivery of miR-146a mimics delayed seizure onset in the lithium-pilocarpine mouse model. *Mediat Inflamm*. 2017;2017:6512620.

11. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:12481–6.
12. Mei J, Bachoo R, Zhang CL. MicroRNA-146a inhibits glioma development by targeting Notch1. *Mol Cell Biol*. 2011;31:3584–92.
13. Chen YL, Shen CK. Modulation of mGluR-dependent MAP1B translation and AMPA receptor endocytosis by microRNA miR-146a-5p. *J Neurosci*. 2013;33: 9013–20.
14. Jovicic A, Roshan R, Moiso N, Pradervand S, Moser R, Pillai B, Luthi-Carter R. Comprehensive expression analyses of neural cell-type-specific miRNAs identify new determinants of the specification and maintenance of neuronal phenotypes. *J Neurosci*. 2013;33:5127–37.
15. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:e47.
16. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15:550.
17. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010;26:139–40.
18. Chou CH, Chang NW, Shrestha S, Hsu SD, Lin YL, Lee WH, Yang CD, Hong HC, Wei TY, Tu SJ, et al. miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. *Nucleic Acids Res*. 2016;44: D239–47.
19. Shirdel EA, Xie W, Mak TW, Jurisica I. NAViGaTing the microne- using multiple microRNA prediction databases to identify signalling pathway- associated microRNAs. *PLoS One*. 2011;6:e17429.
20. Wong N, Wang X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:D146–52.
21. Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, Santos A, Doncheva NT, Roth A, Bork P, et al. The STRING database in 2017: quality- controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res*. 2017;45:D362–8.
22. Johnson MR, Shkura K, Langley SR, Delahaye-Duriez A, Srivastava P, Hill WD, Rackham OJ, Davies G, Harris SE, Moreno-Moral A, et al. Systems genetics identifies a convergent gene network for cognition and neurodevelopmental disease. *Nat Neurosci*. 2016;19:223–32.
23. Amaral DG, Schumann CM, Nordahl CW. Neuroanatomy of autism. *Trends Neurosci*. 2008;31:137–45.
24. Stoner R, Chow ML, Boyle MP, Sunkin SM, Mouton PR, Roy S, Wynshaw-Boris A, Colamarino SA, Lein ES, Courchesne E. Patches of disorganization in the neocortex of children with autism. *N Engl J Med*. 2014;370:1209–19.
25. Koch P, Opitz T, Steinbeck JA, Ladewig J, Brustle O. A rosette-type, self- renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106: 3225–30.
26. Kang HJ, Kawasawa YI, Cheng F, Zhu Y, Xu X, Li M, Sousa AM, Pletikos M, Meyer KA, Sedmak G, et al. Spatio-temporal transcriptome of the human brain. *Nature*. 2011;478:483–9.
27. Voineagu I, Wang X, Johnston P, Lowe JK, Tian Y, Horvath S, Mill J, Cantor RM, Blencowe BJ, Geschwind DH. Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *Nature*. 2011;474:380–4.
28. Tasic B, Menon V, Nguyen TN, Kim TK, Jarsky T, Yao Z, Levi B, Gray LT, Sorensen SA, Dolbeare T, et al. Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. *Nat Neurosci*. 2016;19:335–46.
29. Pasca SP, Portmann T, Voineagu I, Yazawa M, Shcheglovitov A, Pasca AM, Cord B, Palmer TD, Chikahisa S, Nishino S, et al. Using iPSC-derived neurons to uncover cellular phenotypes associated with Timothy syndrome. *Nat Med*. 2011;17:1657–62.
30. Li YL, Wang J, Zhang CY, Shen YQ, Wang HM, Ding L, Gu YC, Lou JT, Zhao XT, Ma ZL, Jin YX. MiR-146a-5p inhibits cell proliferation and cell cycle progression in NSCLC cell lines by targeting CCND1 and CCND2. *Oncotarget*. 2016;7:59287–98.
31. Lowell S, Benchoua A, Heavey B, Smith AG. Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells. *PLoS Biol*. 2006;4:e121.
32. Sanchez-Mendoza EH, Bellver-Landete V, Arce C, Doeppner TR, Hermann DM, Oset-Gasque MJ. Vesicular glutamate transporters play a role in neuronal differentiation of cultured SVZ-derived neural precursor cells. *PLoS One*. 2017;12:e0177069.
33. Hennchen M, Stubbusch J, Abarchan-El Makhfi I, Kramer M, Deller T, Pierre- Eugene C, Janoueix-Lerosey I, Delattre O, Ernsberger U, Schulte JB, Rohrer H. Lin28B and Let-7 in the control of sympathetic neurogenesis and neuroblastoma development. *J Neurosci*. 2015;35:16531–44.
34. Hindley C, Philpott A. Co-ordination of cell cycle and differentiation in the developing nervous system. *Biochem J*. 2012;444:375–82.
35. Kwan KY, Sestan N, Anton ES. Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Development*. 2012;139:1535–46.
36. Courchesne E, Mouton PR, Calhoun ME, Semendeferi K, Ahrens-Barbeau C, Hallet MJ, Barnes CC, Pierce K. Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. *JAMA*. 2011;306:2001–10.
37. Hutsler JJ, Zhang H. Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Res*. 2010;1309:83–94.
38. Fang WQ, Chen WW, Jiang L, Liu K, Yung WH, Fu AK, Ip NY. Overproduction of upper-layer neurons in the neocortex leads to autism-like features in mice. *Cell Rep*. 2014;9:1635–43.
39. Wegiel J, Kuchna I, Nowicki K, Imaki H, Wegiel J, Marchi E, Ma SY, Chauhan A, Chauhan V, Bobrowicz TW, et al. The neuropathology of autism: defects of neurogenesis and neuronal migration, and dysplastic changes. *Acta Neuropathol*. 2010;119:755–70.
40. Hashemi E, Ariza J, Rogers H, Noctor SC, Martinez-Cerdeno V. The number of parvalbumin-expressing interneurons is decreased in the medial prefrontal cortex in autism. *Cereb Cortex*. 2017;27:1931–43.
41. Zoghbi HY, Bear MF. Synaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders associated with autism and intellectual disabilities. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009886>.
42. Courchesne E, Pierce K, Schumann CM, Redcay E, Buckwalter JA, Kennedy DP, Morgan J. Mapping early brain development in autism. *Neuron*. 2007;56: 399–413.
43. Vaccarino FM, Smith KM. Increased brain size in autism—what it will take to solve a mystery. *Biol Psychiatry*. 2009;66:313–5.
44. Casanova EL, Casanova MF. Genetics studies indicate that neural induction and early neuronal maturation are disturbed in autism. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:397.
45. Casanova MF. Autism as a sequence: from heterochronic germinal cell divisions to abnormalities of cell migration and cortical dysplasias. *Med Hypotheses*. 2014;83:32–8.

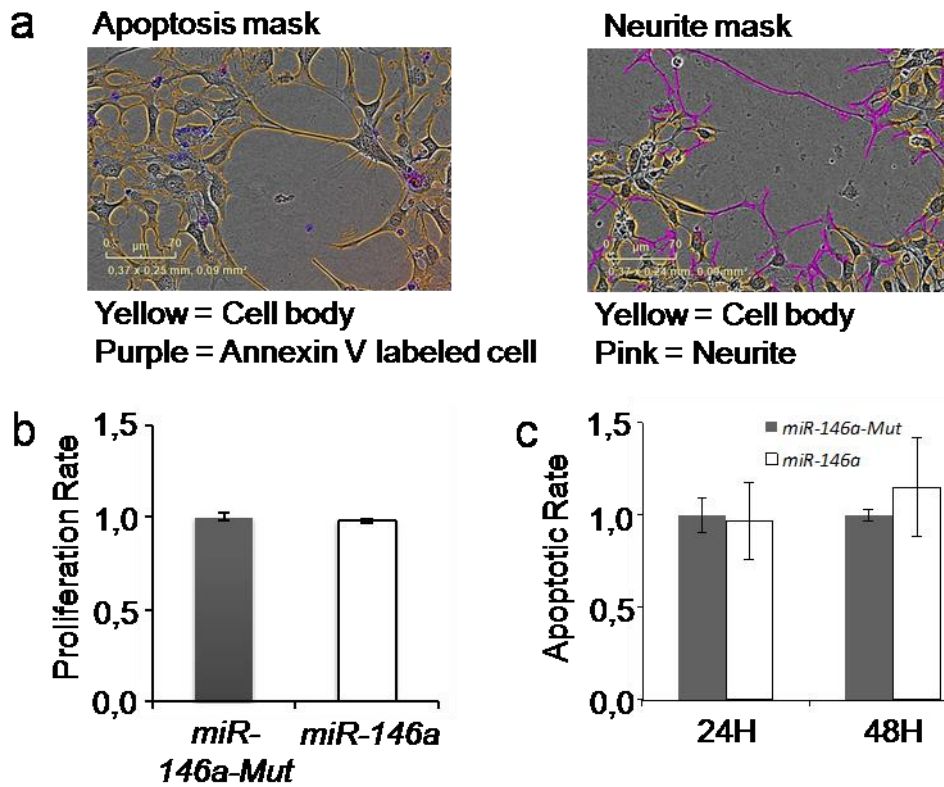


Figure S1. Characteristics of undifferentiated H9 hNSC.

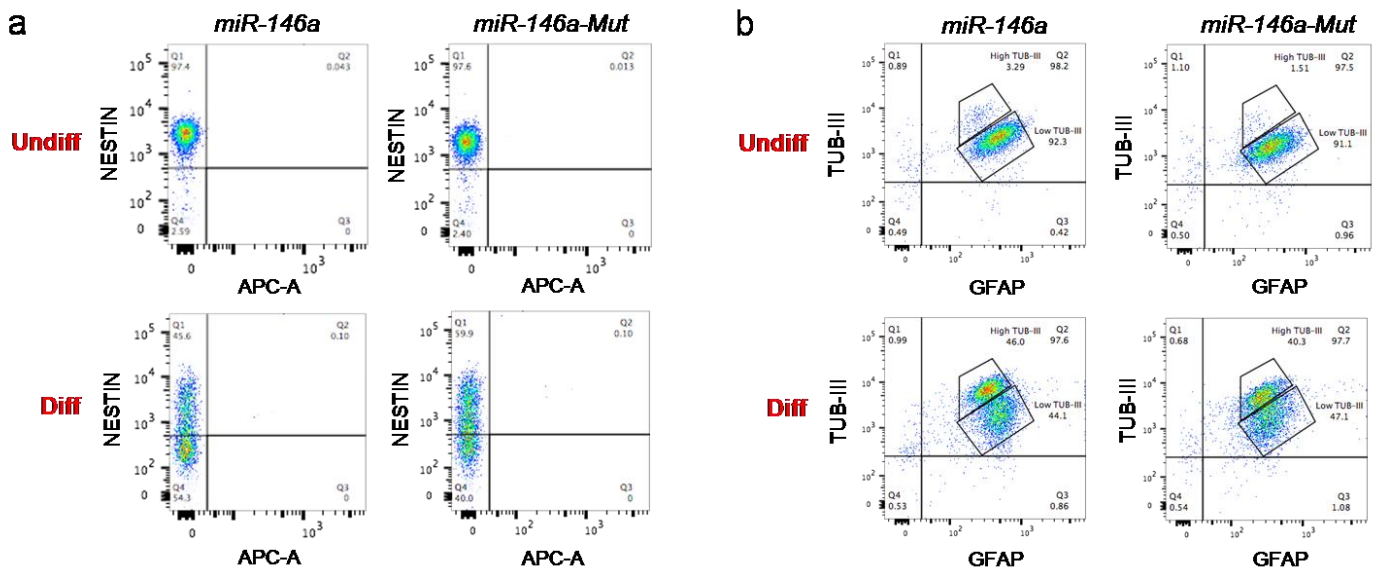


Figure S2. FACS analyses of cell type specific markers NESTIN, GFAP and TUB-III in undifferentiated and differentiated conditions.

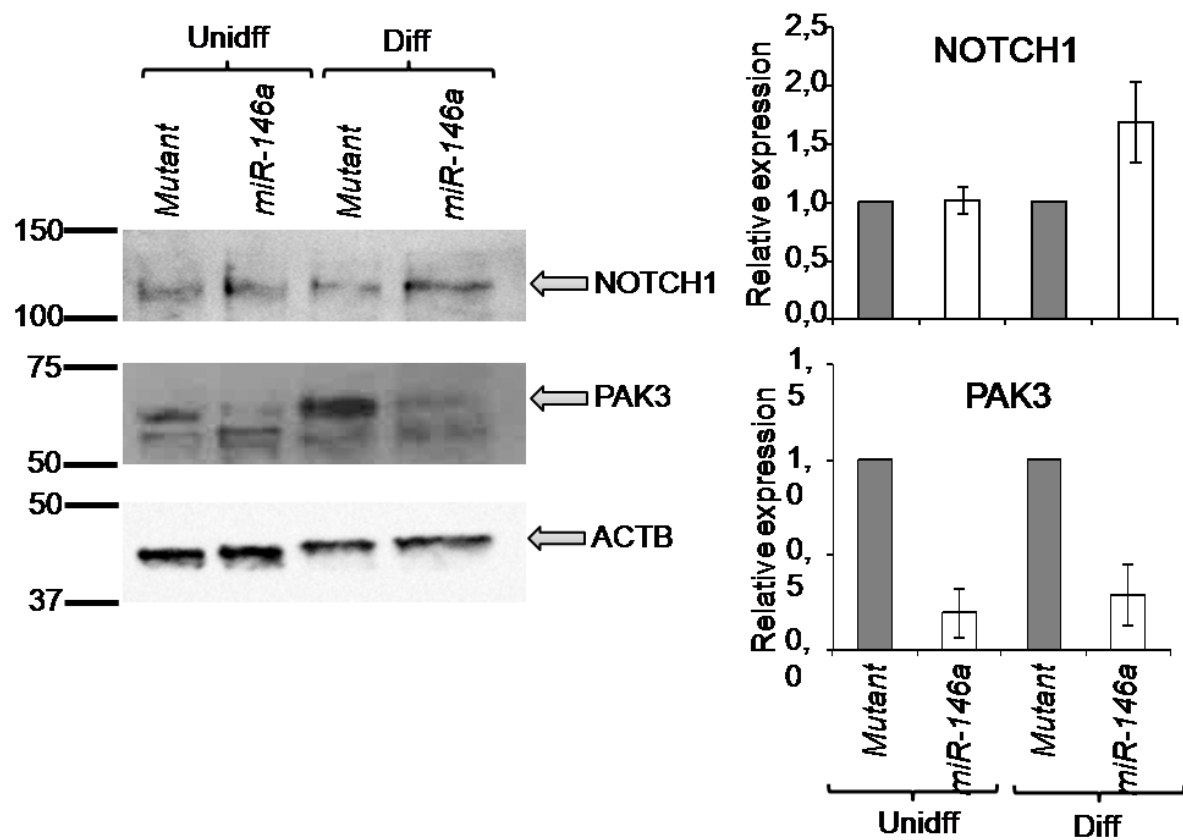


Figure S3. Western blot validation of PAK3 and NOTCH1 expression in undifferentiated and differentiated H9 NSC.

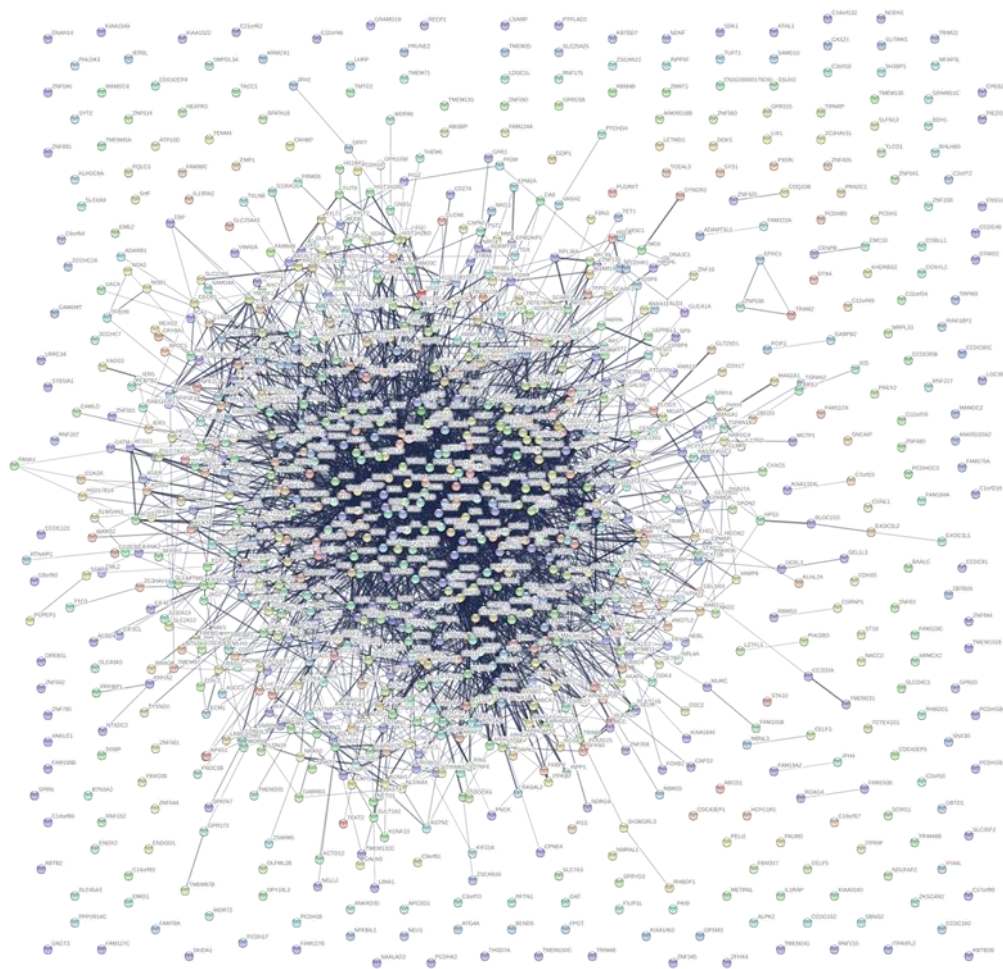


Figure S4. Protein interactions network of all DEGs in undifferentiated cells predicted by STRING.

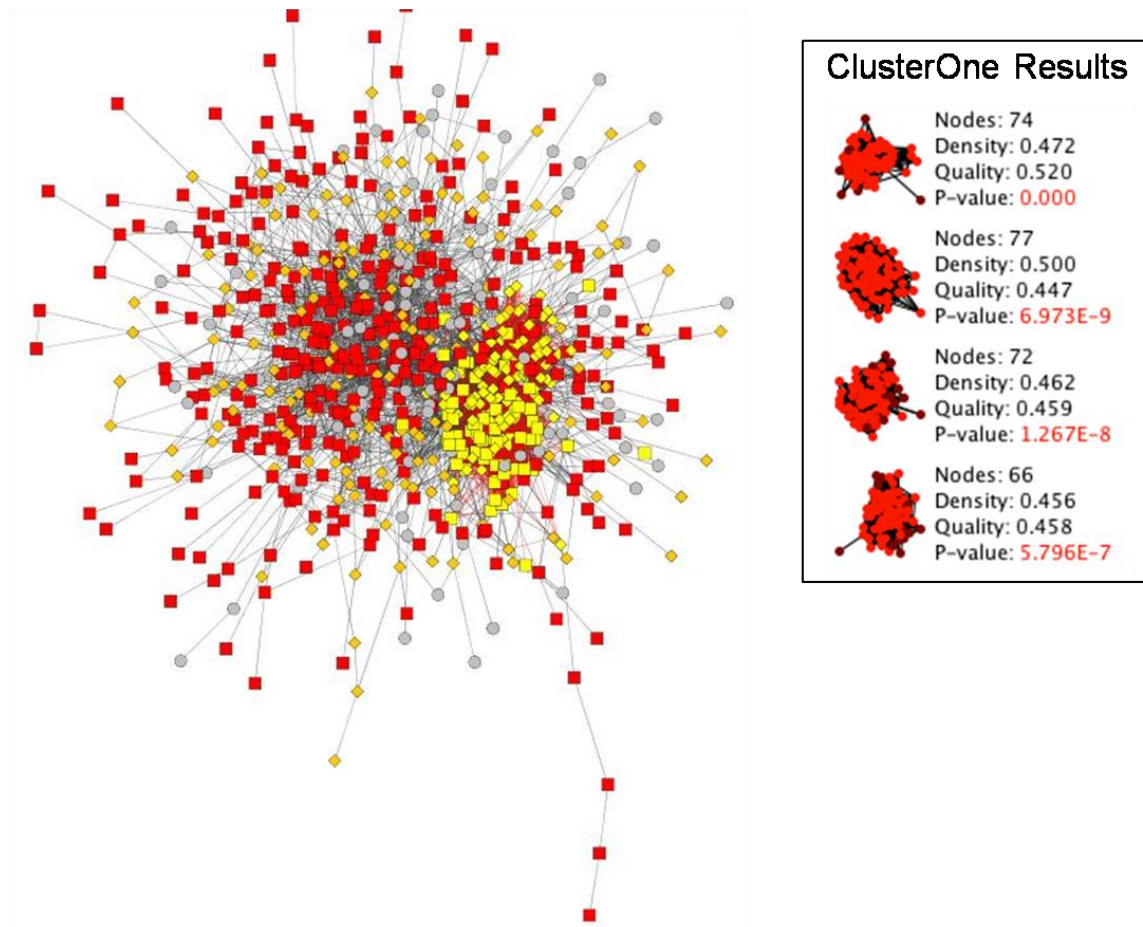


Figure S5. Top four interacting networks corresponding to the cell cycle module in differentiated cell.

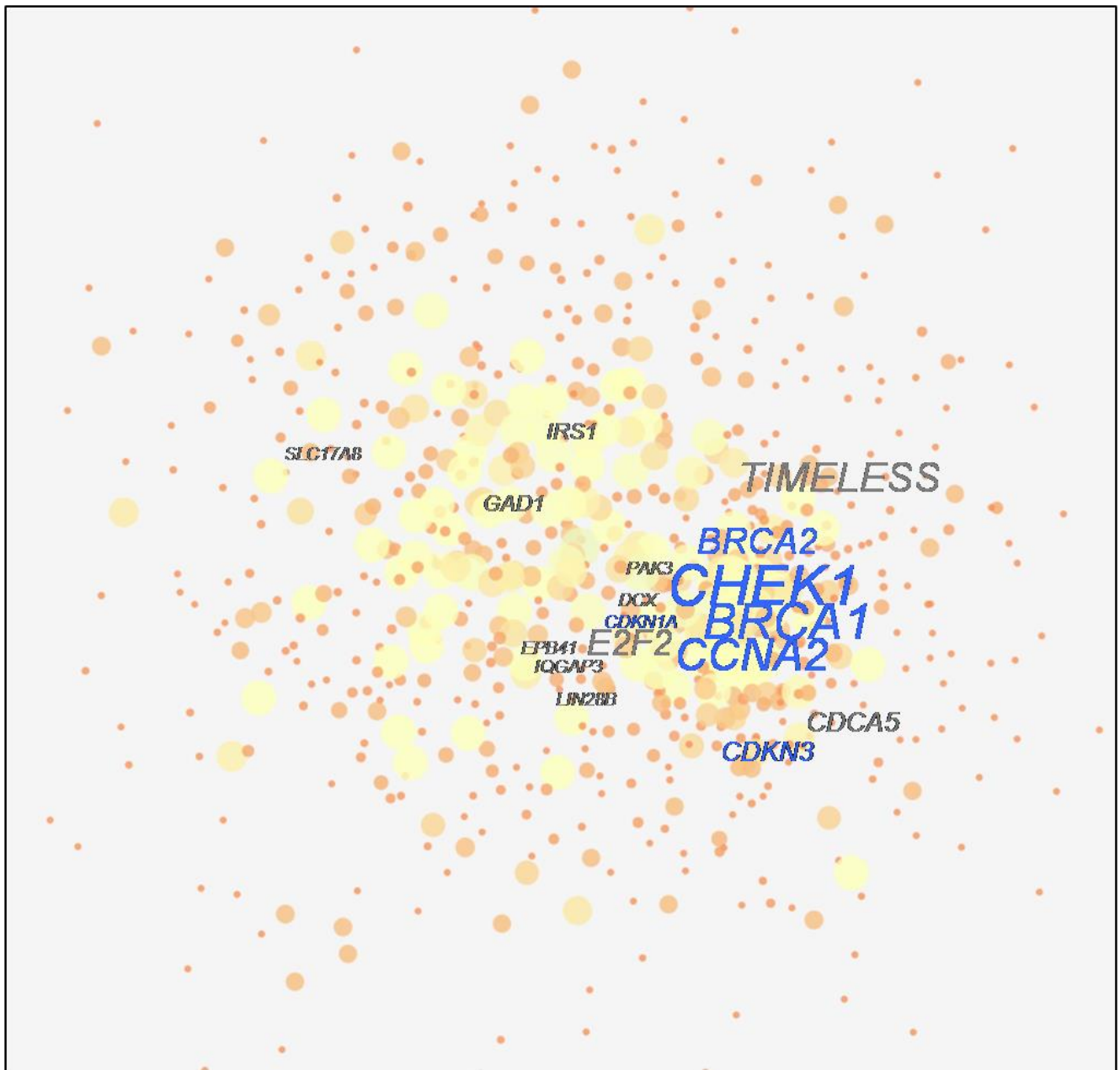


Figure S6. Co-localization of known and predicted targets of *miR-146a* in the protein interaction network of DEGs in differentiated cells

En conclusion, nous avons généré des lignées de cellules souches neurales humaines H9 sur-exprimant de façon stable *miR-146a*. Dans ces lignées, la sur-expression de *miR-146a* favorise la différenciation des cellules progénitrices en cellules de type neuronal et accélère la croissance et le branchement des neurites. Par ailleurs, des analyses transcriptomiques par RNA-Seq démontrent que 10% des transcrits détectés sont significativement dérégulés. En particulier, la majorité des marqueurs spécifiques des différents types neuronaux et des différentes couches du cortex sont affectés, suggérant que *miR-146a* joue un rôle dans la différenciation et l'acquisition de l'identité des cellules neurales.

C - Analyse d'un modèle murin Mir146a^{-/-}

Ces dernières années, le rôle de *miR-146a* a été étudié dans les neurones matures *in vitro*, notamment dans la survie neuronale et la neurotransmission. Notre groupe a rapporté pour la première fois l'effet de la sur-expression de *miR-146a* dans la différenciation de progéniteurs neuraux humains. Cependant, le neurodéveloppement est un processus extrêmement complexe et des études *in vitro*, bien que fournissant des informations importantes, ne permettent pas d'aborder le rôle de *miR-146a* dans les différentes régions et étapes de développement du cerveau. C'est la raison pour laquelle nous avons décidé de travailler sur un modèle *in vivo*.

Un groupe chinois a développé en 2013 une souris transgénique sur-exprimant *miR-146a* de façon constitutive afin de mieux caractériser son rôle dans la réponse inflammatoire *in vivo*²⁸⁵ mais nous n'avons pas pu avoir accès à ce modèle mimant le défaut d'expression observé chez les patients. En revanche, le groupe de Fabiola Terzi (Necker) a très généreusement accepté de partager avec nous leur lignée de souris constitutivement inactivée pour *miR-146a* par délétion complète du locus génétique Mir146a. La caractérisation de ce modèle nous a permis d'étudier le rôle de *miR-146a* dans le neurodéveloppement *in vivo* et la publication rapportant ce travail a été soumise.

Loss of *miR-146a* impairs neural progenitor differentiation and causes learning and memory deficits

Julien Fregeac^{1,2,*}, Stéphanie Moriceau^{2,3,*} (PhD), Christine Bole-Feysot¹ (PhD), Antoine Poli^{1,2}, Nicolas Cagnard¹, Olivier Alibeu¹, Patrick Nitschke¹ (PhD), Franck Oury^{2,3,#} (PhD), Laurence Colleaux^{1,2,#} (PhD) & Lam Son Nguyen^{1,2,#} (PhD)

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR 1163, Institute Imagine, Necker-Enfants Malades Hospital, 24 Boulevard du Montparnasse, 75015 Paris, France

² Paris Descartes– Sorbonne Paris Cité University, 12 Rue de l'École de Médecine, 75006, Paris, France

³ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1151, Institut Necker Enfants Malades (INEM), Depart: Cell growth and signaling, Team 14: Hormonal regulation of brain development and functions, 75014 Paris, France.

* These authors contribute equally to this work

Corresponding author:

Dr. Lam Son Nguyen, email: lam-son.nguyen@inserm.fr Dr. Laurence Colleaux
email : laurence.colleaux@inserm.fr Institute Imagine
24 Bld du Montparnasse, Paris 75015, France Tel: +33 1 42 75
42 37

Dr. Franck Oury, email: franck.oury@inserm.fr Institut Necker
Enfants Malades
14 Rue Maria Héléna Vieira da Silva, Paris 75014, France Tel: +33 1 72 60 65
41

ABSTRACT

Formation of a working neural circuit requires tight regulation of neural stem cell proliferation, differentiation and neurogenesis. Impaired function of genes important for these processes has deleterious consequences and causes developmental brain disorders (DBDs). The roles of microRNAs (miRNA) in the brain, which act as post-transcriptional regulators, have been increasingly appreciated. One of such miRNAs, *miR-146a*, has been linked to autism spectrum disorders, epilepsy as well as intellectual disability, supporting the need to understand its functions and mode of action in the development and function of the brain. Here, we report the analysis of a mouse model inactivated for *miR-146a*, providing the first analysis of a mouse model miRNA in the context of DBD. We show that loss of *miR-146a* correlates with an increased hippocampal asymmetry coupled with defects in spatial learning and memory performances, episodic memory and associative fear memory acquisition. Loss of *miR-146a* also impairs the differentiation of radial glial cells, neurogenesis process and neurite extension. Transcriptomic analyses of the neocortex, hippocampus, amygdala and sensorimotor cortex at several stages of development identify pyramidal, interneurons and oligodendrocytes as the main affected cell types. Finally, *in silico* analyses suggest that *miR-146a* is involved in the regulation of the balance between the WNT/ β -catenin and SHH signaling during brain development. Our work provides valuable insight into the role of *miR-146a* in the brain and demonstrates the relevance of the *Mir146a*^{-/-} mouse model for DBD studies.

INTRODUCTION

In the mammalian neocortex, neurogenesis is a dynamic and fine-tuned mechanism ensuring the differentiation of multiple progenitor cell types into neurons (for an exhaustive review see Uzquiano et. al, 2018¹). Two main neuronal progenitor cell types coexist in the mouse neocortex: apical radial glia (aRG) and intermediate progenitors (IP)¹. Altered proliferation or differentiation on these progenitors have deleterious consequences on the number, position and function of mature neurons²⁻⁴.

aRG are the direct progeny of the primary stem cells of the vertebrate CNS: the neuroepithelial (NE) cells¹. They are localized in the ventricular zone (VZ) where their nucleus undergo interkinetic nuclear migration (INM): an up and down migration along the apico-basal axis related to the phase of the cell cycle¹. aRG localize to their most basal position, close to the subventricular zone (SVZ), during S phase and undergo mitosis at the apical surface of the VZ¹ (Supplementary Fig. 1). While a pool of undifferentiated aRG is maintained by symmetric division throughout neurogenesis to ensure later the production of glial cells during development¹, aRG can also undergo asymmetric division. In the later case, they give rise to a new aRG as well as a post-mitotic neuron or an IP daughter cell¹. IP are not attached to the apical surface and do not undergo INM. Instead, they remain and divide in the SVZ⁵. Unlike aRG, IP only give rise to neurons and are not maintained as progenitors; they differentiate after one or two cell cycles at most^{1, 5}. The two cell types are also distinguishable by their expression pattern, the most commonly used markers being PAX6 for aRG and TBR2 for IP⁵ (Supplementary Fig. 1). After cell cycle exit, neurons migrate upwards to their final position, acquire their neuronal identity and start expressing post- mitotic markers such as NeuN (Supplementary Fig. 1).

Cell cycle progression and differentiation, thus, must be closely coordinated to generate a functional central nervous system (CNS). Multiple transcriptional regulators and pathways are involved in the regulation of the balance between proliferation and cell cycle exit of neuronal progenitors. Both NOTCH and NFκB pathways promote aRG expansion and prevent neuronal differentiation^{6, 7}. Moreover, they seem to act concomitantly as NFκB signaling induces TBR2 expression and IP fate when NOTCH pathway is shut down⁷. The Sonic Hedgehog (SHH) pathway regulates multiple aspects of neural stem cells proliferation and differentiation throughout neurogenesis⁸ while WNT/β-catenin signaling favors aRG proliferation in early corticogenesis⁹ but induces neuronal differentiation later on¹⁰. MicroRNAs (miRNAs) are small non coding RNAs of ~20-22 nucleotides that play a key role in gene expression regulation by targeting specific messenger RNA (mRNA) for degradation or translation repression¹¹. miRNAs constitute a major regulating force as each of them can target over a hundred transcripts. The last version of the miRNA database reports 2654 mature miRNAs in human and 1978 in mouse (mirbase.org). miRNAs are expressed throughout embryonic development and life of most eukaryotic organisms and take part in all main functions such as cell proliferation, apoptosis, autophagy, cell differentiation and inflammation.

miRNAs are particularly important for proper brain development and function and 50% of all identified miRNAs are expressed in the mammalian brain¹². Furthermore, miRNAs appear to be differentially distributed in distinct brain regions and neuron types. The role of some microRNAs during neurogenesis has been clearly established. For instance, *miR-15b* promotes aRG cell cycle exit and neuronal differentiation by targeting the *Tet3* mRNA¹³, while the miRNA cluster 379-410 regulates N-cadherin expression to ensure proper neuronal migration¹⁴. Consequently, a wide range of miRNAs have been associated with neurological pathologies such as Alzheimer's disease¹⁵, amyotrophic lateral sclerosis¹⁶ or neuroblastoma¹⁷ and also with developmental brain disorders (DBDs) including autism spectrum disorders (ASD)¹⁸, schizophrenia¹⁹, intellectual disability (ID)²⁰ and epilepsy¹⁵.

Among the differentially expressed miRNAs identified by transcriptomic analysis in DBD patients, *miR-146a* is one of the most commonly observed¹⁸. In ASD cases, it has been reported in five different cohorts and tissue types including post-mortem brain^{21, 22}, olfactory mucosal stem cells²⁰, fibroblasts²⁰ and lymphoblastoid cell line²³. Its abnormal expression has also been reported in ID²⁰ and epilepsy²⁴. *miR-146a* is 100% conserved between human and mice. Importantly, modulating the

expression of this particular miRNA was shown to reduce the latency, the duration as well as the intensity of the induced epilepsy in rodent models of telencephalon epilepsy^{25, 26}. *miR-146a* is known for regulating NFκB²⁷, NOTCH²⁸ and WNT/β-catenin^{29,30} pathways in a tissue and developmental stage dependent manner. A body of *in vitro* works describes the role of *miR-146a* in neuron survival and apoptosis^{31, 32}, axonal growth³³ and AMPA receptor endocytosis³⁴. Our group has also demonstrated the pro-neuronal effects of *miR-146a* overexpression in a H9 model of human neural stem cells²². These data support the importance of *miR-146a* for neurons *in vitro*, however, its functional relevance *in vivo* remains largely unexplored.

To address this issue, we characterized the *Mir146a*^{-/-} mouse model using a combination of imaging, molecular and cell biology techniques as well as behavioral studies. We showed that loss of *miR-146a* leads to transient defects in differentiation of aRG coupled with problem in INM and neurogenesis, which could be explain by an imbalance of WNT/β-catenin and SHH signaling. These neurodevelopmental defects predispose these mice to learning and memory impairments. To the best of our knowledge, this work reports the first analysis of a mouse model inactivated for a miRNA in the context of neurodevelopment. It demonstrates the functional roles of small non-coding RNA in the brain for the control of neuronal development and cognitive functions and provides new insight into the mechanisms linking impaired *miR-146a* expression to DBDs.

MATERIALS AND METHODS

Animal housing and ethics

For this study, we used the mouse line B6.Cg-Mir146^{tm1.1Bal/J} (stock n°016239) from Jackson Laboratory. Mice were housed and handled in accordance with current best practices. Their well-being was monitored daily by a contractor as paid service (Animalliance). All experiments performed were approved by an independent ethic committee of Paris Descartes University (Approval Number 2015101215207380) and declared to the French Ministry of Research.

ELISA Analysis

Two ELISA kits were used to assess the concentration of Il-1β (15571957, Fischer Scientific) and TNF-α (15562017, Fischer Scientific). We tested the hippocampus and cortex of the first batch of mice used for the behavioral studies. Cells were lysed using the FastPrep system (MPbio) in EBC lysis buffer, followed by a 15-min centrifugation at 4°C to remove debris. The supernatant containing the proteins were used for the tests that were performed following the manufacturer's protocol.

Brain Magnetic Resonance Imaging

MRI were performed on a 4.7 Tesla MR scanner (Biospec 47/20 BrukerBiospin, Ettlingen, Germany) with a combination of a transmit volume coil and a surface receive branch coil. Anesthesia was induced with 4% isoflurane and maintained at 1% during imaging. The parameters of the spin echo TurboRARE T2 weighted sequences are as follow: Field of view (FOV) 2*1,5 cm; Matrix 200*150; resolution 100*100 microns; slice thickness 350 microns; 30 slices for the sagittal slices with TR/TE 5096/60ms (11min28s); 46 slices for the axial slices with TR/TE 7850/60 ms (17min40s); RARE factor 9.

BrdU injection and detection

E14.5 heterozygous *Mir146a*^{+/-} pregnant mice were injected with BrdU (ThermoFisher) at 28mg/kg and dissected 2h after injection for pulse chase or at P7 for birth dating analysis. Brains were fixed in 4% PFA (Antigenfix, Diapath) during 24h at 4°C, washed 3 times in PBS and incubated 24h in PBS - 30% sucrose. Brains were then frozen in O.C.T. compound (Tissue-Tek SAKURA) and stored at -80°C. 14μm sagittal sections were cut using a cryostat (ThermoFisher) and mounted onto Fisher Superfrost Plus slides. Sections were incubated in 2N HCl for DNA denaturation at 37°C for 30min then washed 3 times with 0.1% Triton X-100 (Sigma) in PBS. Blocking was realized using 10% Normal Goat Serum (Clinisciences) and 0.1% Triton X-100 in PBS. Slides were incubated overnight at 4°C with a rat anti-BrdU antibody (ab6326, Abcam). Slides were then washed 3 times with 0.1% Triton X-100 in PBS and incubated with Alexa fluor 488 donkey anti-rat antibody (A21208, ThermoFisher)

at room temperature for 2h. Slides were finally washed 3 times in PBS, mounted using the Prolong gold antifade reagent with DAPI (P36935, ThermoFisher) and scanned in a Nanozoomer 2.0 (Hamamatsu). 250µm x 250µm images were taken in the neocortex and horizontally binned in 5 layers of equal size; for birth dating 1000 x 800 µm images were used. BrdU⁺ cells were counted in each bin or layer.

PH3, PAX6, TBR2 and NeuN immunofluorescence and quantification

Pups were sacrificed at E14.5 and the embryonic brains were fixed, frozen and cut into sagittal sections as previously described. An antigen retrieval step was performed by incubating the slides with 10mM Sodium Citrate buffer 10min at 100°C. Slides were then allowed to cool down and rinsed once with PBS before blocking 1h at room temperature with 10%NGS and 0.1% Triton X-100 in PBS. Anti-PH3 antibody (06-570, Merck Millipore) and anti-NeuN (ab177487, Abcam) were used alone while anti-PAX6 (901301, Biolegend) and anti-TBR2 (14-4875-80, ThermoFisher) antibodies were used concomitantly for co-staining. In all conditions, primary antibody was incubated overnight at 4°C. After 3 washes with 0.1% Triton X-100 in PBS, slides were incubated with a matching secondary antibody (Alexa fluors, ThermoFisher). Slides were then washed 3 times in PBS and mounted and scanned as previously described. We counted the PH3⁺ cells at the apical surface and in the SVZ independently in images of 650µm of width and calculated the percentage of PH3⁺ cells at the SVZ. 250µm x 250µm images were taken in the neocortex for the PAX6-TBR2 co- staining. Each cell type was counted independently. To analyze the NeuN labeling at E14.5, the thickness of the NeuN⁺ layer was measured at least four times along the neocortex.

Primary neuronal culture and neurite outgrowth measurement

Primary cortical neurons were extracted from E17.5 embryos using as previously described. Approximately 30,000 cells were plated per well in the 96-well plate for live cell imaging (IncuCyte® system, Essen Bioscience). For each well, 9 images were taken at fixed spots every 3H during 6 days. Media was change 1 day after plating to remove debris, then every 3 days thereafter. Post analyses were performed on images using a mask designed to recognize cell body and neurites.

RNA sequencing technique and analysis

We tested the neocortex at E14.5 as well as amygdala, hippocampus and cortex at both P30 and P60 from at least 3 WT and 3 *Mir146a*^{-/-} samples. Total RNA was extracted using TRizol reagent (15596026, ThermoFisher Scientific) and RNeasy Mini Kit (74104, QIAGEN) with DNase I treatment step (79254, QIAGEN) following the manufacturer's protocol. The integrity of RNA was determined by RNA ScreenTape (5067-5576, Agilent Technologies) on the Agilent 2200 TapeStation (Agilent Technologies). RNA-seq libraries were prepared starting from 100 ng of total RNA using the Ovation mouse RNAseq system (Nugen) as recommended by the manufacturer. Ribosomal RNA was depleted by PCR (10 cycles). RNA-seq libraries were sequenced on an Illumina HiSeq2500 (Paired-End sequencing 130x130 bases, High Throughput Mode). A minimum of 10 million of paired-end reads was produced per library sample. Sequence reads were aligned to the mouse MM38 reference genome using the Hisat2 software. Raw and processed data for all samples are available for download from Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under accession number GSE114491. RNA-Seq data were analyzed using a combination of three different tools namely limma, DESeq2 and edgeR.

In silico analyses

Known targets of *miR-146a* were extracted from miRTarBase³⁵. Predicted targets were extracted from miRDIP³⁶, only genes predicted by at least 3 different programs were considered. Pathway and function enrichment was analyzed using Ingenuity Pathway Analysis (QIAGEN). Brain cell type enrichment was performed using published code³⁷ in R program.

Quantitative reverse transcription PCR

To validate the transcriptomic results, we selected 20 genes (Supplementary Table 5) that were found significantly up- or down-regulated and tested their expression by quantitative RT-PCR (RT-qPCR) on the Fluidigm 48.48 chip. The qPCR analysis was performed at the qPCR-HD-GPC core facility of the Ecole Normale Supérieure and was supported by grants from Région Ile de France. The analysis was performed using geometric mean of four housekeeping genes (*Actb*, *Gpbbp1*, *Rpl13a* and *Top1*) and the average of the WT samples as references. No significant difference was detected for the 4 housekeeping genes.

3-foot shock contextual fear conditioning (CFC)

Mice were transported a short distance from the holding mouse facility to the testing room in their home cages and left undisturbed for at least one hour before the beginning of the test. The conditioning chambers were obtained from Bioseb (France) with internal dimensions of 25 × 25 × 25 cm. Each chamber was located inside a larger, insulated plastic cabinet that provided protection from outside light and noise (67 × 55 × 50 cm, Bioseb, France), and mice were tested individually in the conditioning boxes. Floors of the chamber consisted of 27 stainless steel bars wired to a shock generator with scrambler for the delivery of foot shock. Signal generated by the mice movements was recorded and analyzed through a high sensitivity weight transducer system. The analog signal was transmitted to the Freezing software module through the load cell unit for recording purposes and analysis of time active

/ time immobile (Freezing) was performed. The CFC procedure took place over two consecutive days. On day 1, mice were placed in the conditioning chamber, and received 3 foot-shocks (1 sec, 0.5 mA), which were administered at 60, 120 and 180 sec after the animals were placed in the chamber. They were returned to their home cages 60 sec after the final shock. Contextual fear memory was assessed 24 hours after conditioning by returning the mice to the conditioning chamber and measuring freezing behavior during a 4 min retention test. Freezing was scored and analyzed automatically using Packwin 2.0 software (Bioseb, France). Freezing behavior was considered to occur if the animals froze for a period of at least two seconds. Behavior was scored by the Freezing software and analyzed by two observers blind to mouse treatment (LSM and S.M).

Novel object recognition paradigm (NOR)

We used a modified version of the NOR task described by Ennaceur and Delacour (1988)³⁸. Mice were transported a short distance from the holding mouse facility to the testing room in their home cages and left undisturbed for at least one hour before the beginning of the test. The testing room was lit with two 60-W light bulbs and behavior sessions were recorded with a camera above the testing arena (grey plastic box (60 × 40 × 32 cm)). Mice could not contact or see each other during the exposures. The light intensity was equal in all parts of the arena (approximately 20 lx). Two different objects were used, available in triplicate. The objects were (1) a blue ceramic pot (diameter 6.5 cm, maximal height 7.5 cm) and (2) a clear, plastic funnel (diameter 8.5 cm, maximal height 8.5 cm). The objects that serve as a novel object, as well as the left/right localization of the objects, were counterbalanced within each group. The objects elicited equal levels of exploration as determined in pilot experiments and training phase. Between exposures, mice were held individually in standard cages, the objects and arenas were cleaned with phagophore, and the bedding replaced.

The NOR paradigm consists of three phases (over 3 days): a habituation phase, a training phase, and a testing phase. Mice were always placed in the center of the arena at the start of each exposure. On day 1: the habituation phase, mice were given 5 min to explore the arena, without any objects and were then taken back to their home cage. On day 2, the training phase, mice were allowed to explore, for 10 min, two identical objects arranged in a symmetric opposite position from the center of the arena and were then transported to their home cage. On day 3, the testing phase, mice were given 15 minutes to explore two objects: a familiar object and a novel one, in the same arena, keeping the same object localization.

The following behaviors were considered as exploration of the objects: sniffing, licking, or touching the object with the nose or with the front legs or directing the nose to the object at a distance ≤ 1 cm. Investigation was not scored if the mouse was on

top of the object or completely immobile. The preference index for the novel object was calculated as (time spent exploring the new object / the total time spent exploring both objects), and the discrimination index was calculated as (time spent exploring the new object - time spent exploring the familiar object) / (total time spent exploring both objects). As a control, preference index for the (right/left) object location or for the object A versus B during the training phase of the novel object recognition (NOR) was measured in all groups of mice exposed to the test. We confirm here that no initial preference for any exposed object (A or B) or any orientation (right/left) was observed in any groups. The locomotion was assessed for each mouse. Behavior was scored on videos by two observers blind to treatment and the total exploration time of the objects was quantified in the training and testing phases (AP and S.M).

Object location memory test (OLM)

For the object location memory task, all procedures were identical to the Novel object recognition task except that during the testing phase, rather than presenting a novel object, mice encountered both familiar objects, with one object located in a different place in the arena. The time and frequency of exploration of the novel/relocated object is measured as an index of memory. As a control, preference index for the (right/left) object location during the training phase of the novel object recognition (NOR) was measured in all groups of mice. We confirm here that no initial preference for any orientation (right/left) was observed in any groups. Behavior was scored on videos by two observers blind to treatment and the total exploration time of the objects was quantified in the training and testing phases (LSM and S.M).

Morris Water Maze (MWM)

Animals were transported a short distance from the holding mouse facility to the testing room in their home cages and left undisturbed for at least one hour prior to the first trial. Morris water maze (MWM) with an automatic tracking system was employed for assessing spatial learning and memory. The apparatus was a white circular swimming pool (diameter: 200 cm, walls: 60 cm high), which was located in a room with various distal cues. The pool was filled with water (depth: 50 cm) maintained at $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, which was made opaque by the addition of a nontoxic white paint. A 12 cm round platform was hidden 1.0 cm below the water surface. The maze was virtually divided into four arbitrary, equally spaced quadrants delineated by the cardinal points north (N), east (E), south (S), and west (W). The pool was located in a brightly lit room. Extra maze geometric and high-contrast cues were mounted on the walls of the swimming pool with the ceiling providing illumination. Data was collected using a video camera fixed to the ceiling and connected to a videotracking system (AnyMaze). Each daily trial consisted of four swimming trials, in which each mouse was placed in the pool facing the wall of the tank and allowing the animal to swim to the platform before 120 sec had elapsed. A trial terminated when the animal reached the platform, where it remained for 5 sec. Mice were removed and placed back in their home cages for a 5 min inter-trial interval. To prevent hypothermia, the animals were gently dried with a paper towel between and after the trials. The starting point differed at each trial, and different sequences of release points were used from day to day. Swimming time to the platform was calculated as an evaluation of performance of the mice to locate the target. Animal movements were recorded using AnyMaze to calculate parameters of the performance of mice. Behavior was scored by observers blind to genotype.

Light-to-Dark Transition test (D/LT)

This test is based on the innate aversion of rodents to brightly illuminated areas and on their spontaneous exploratory behavior in response to the stressor that light represents. The test apparatus consists of a dark, safe compartment and an illuminated, aversive one. The lit compartment was brightly illuminated with an 8 W fluorescent tube (1000 lx). Naive mice were placed individually in the testing chamber in the middle of the dark area facing away from the doorway to the light compartment. Mice were tested for 10 min, and two parameters were recorded: time spent in the lit compartment and the number of transitions between compartments, indices of anxiety-related behavior and exploratory activity. Behavior was scored using an infrared light beam activity monitor using actiMot2 Software (PhenoMaster Software, TSE) and it was statistically analyzed using Prism program.

Open Field Test (OFT)

This test takes advantage of the aversion of rodents to brightly lit areas³⁹. Each mouse is placed in the center of the OFT chamber (43 × 43 cm chamber) and allowed to explore for 30 min. Mice were monitored throughout each test session by infrared light beam activity monitor using actiMot2 Software (PhenoMaster Software, TSE). The overall motor activity was quantified as the total distance traveled (ambulation). Anxiety was quantified by measuring the time and distance spent in the center versus periphery of the open-field chamber.

Results

Impaired hippocampal anatomy in the *Mir146a*^{-/-} mice

A wide spectrum of structural brain anomalies is frequently observed in DBD patients⁴⁰⁻⁴³. This includes white matter and/or temporal lobe abnormalities in children with non-syndromic ASD⁴⁰, mega cisterna magna in low-functioning autistic patients⁴¹, brain hemispheric asymmetry in children with high-functioning autism and developmental language disorder⁴⁴, corpus callosum defects^{41, 43}, cortical and/or cerebellar atrophy^{40, 43} and hippocampal alteration⁴² in intellectually delayed children. Structural brain anomalies were also described in mouse models of DBDs. Indeed, reduced volume of cerebellum as well as reduced thickness of corpus callosum were observed in *Mecp2*-null mice⁴⁵, while the Fragile X syndrome mouse model exhibits an increased volume of the parieto-temporal lobe and a smaller striatum⁴⁶.

To investigate whether such anatomical defects are present in the *Mir146a*^{-/-} mice, we performed magnetic resonance imaging (MRI) studies at P30, the earliest stage that allows us to measure the volume of the cortex and the hippocampus. No significant difference was observed in the overall volume of these two regions (Fig. 1a,b) in the mutant mice compared to wild-type (WT) mice. However, we observed a high hippocampal asymmetry between the two hemispheres in the mutant brains (Fig. 1c,d). In the *Mir146a*^{-/-} brains, one side is 15% bigger than the other with a random distribution regarding the enlarged side (2 mice with right>left and 2 mice with left>right) (Fig. 1d). The same analysis was also performed at P60 and similar results were observed (Supplementary Fig. 2).

Loss of miR-146a results in learning and memory deficits

In human, abnormal expression of *miR-146a* is observed in patients with cognitive deficits. Our MRI analyses performed in the *Mir146a*^{-/-} mice demonstrated a severe asymmetry of the hippocampi, a region of the brain playing a critical role in cognitive processes, such as learning and memory. Therefore, we subjected 3 month-old *Mir146a*^{-/-} mice and their controls littermates to a series of behavioral tests, that is thought to reflect behavioral functions related to hippocampus, measuring associative (one-trial contextual fear conditioning, CFC), episodic (novel object recognition test, NOR), and spatial (Object localization memory OLM, Morris water maze test (MWM)) learning and memory (Fig. 2). In CFC, mutant mice exhibited no differences in baseline freezing time. However, abrogation of *miR-146a* resulted in decreased context-elicited freezing time during the testing phase compared to their WT littermates, indicating that contextual fear memory is impaired in the mutant mice (Fig. 2a). Next, we used a modified version of the NOR paradigm^{38, 47} that measures the rodent's ability to recognize a novel object in the environment. Normally, the WT mice are capable of differentiating novel objects from familiar ones and tend to explore novel ones for longer. As shown in (Fig. 2b), 3 month-old *Mir146a*^{-/-} mice explored significantly less the novel object than WT controls. The same impairments were observed when memory was analyzed through the OLM task (assessing spatial learning and memory in rodents). Indeed, mutant mice explored significantly less the relocated object than WT littermates during the testing phase (Fig. 2c). Lastly, spatial learning and memory were also assayed through the MWM with hidden platform for 8 successive days, to assess the ability of mice to use spatial cues to locate a submerged platform. As a result, we observed that *Mir146a*^{-/-} mice showed a severe delay in learning the task (Fig. 2d). Of note, mutant mice and WT mice had comparable performance in the open field test (OFT) and Light/Dark paradigm (L/D) (Supplementary Fig. 3), indicating that their locomotion and anxious state were intact. Finally, neuroinflammation is a well-recognized etiological component in ASD. Given the role of *miR-146a* in innate and adaptive immune responses, we ask whether the behavioral

anomalies observed in mutant mice could be related to altered neuro-immune regulation. To that end, we tested by ELISA assays the level of inflammatory markers IL1- β and TNF- α in hippocampal and cortical brain lysates from the mice after the behavioral tasks. We did not detect any difference between the mutants and WTs, excluding the confounding effects of inflammation in the observed behavioral defects (Supplementary Fig. 4). Taken together, these data demonstrate that *miR-146a* inactivation significantly influences hippocampal- dependent spatial learning and memory performances, episodic memory and associative fear memory acquisition through a mechanism independent of the role of this miRNA in the regulation of inflammatory response.

Altered balance between aRG and IP populations in the *Mir146a*^{-/-} neocortex

miR-146a has been shown to regulate the balance of cell cycle progression and differentiation of cultured progenitor cells *in vitro*²². Yet, the cortical volume of adult mutant mice is unaltered, suggesting that, *in vivo*, there is no major defect in proliferation of aRG. To resolve this discrepancy, we quantified the ratio between aRG and IP ratio in the neocortex at E14.5, the peak of neurogenesis in mouse. We performed immuno-stainings of the neocortical slices for PAX6 and TBR2 in order to label aRG and IP, respectively (Fig. 3a). Mutant embryos showed an imbalance of aRG/IP cell populations as they exhibit a 10% decrease of PAX6⁺ cells (Fig. 3b) and a 10% increase of TBR2⁺ cells (Fig. 3c) compared to WT. Consequently, the difference in ratio of TBR2⁺/PAX6⁺ cells was significantly ($p=0.00012$) altered in mutant mice in comparison to controls (Fig. 3d).

aRG and IP undergo mitosis at distinct locations, we thus stained the neocortex for the mitosis marker Phospho-Histone 3 (PH3) (Fig. 3e). In the mutant neocortex, there was no difference in the number of PH3⁺ cells at the apical surface (where aRG divide) (Supplementary Fig. 5). However, we observed a significant increase of PH3⁺ cells in the SVZ (where IP divide) (Fig. 3f). To further corroborate these findings, we assessed the position of the cells that are progressing through S phase by BrdU pulse chase. We counted their distribution in the neocortex in 5 equal bins and observed a shift towards the basal lamina in the mutants compared to WT (Fig. 3g,h). Quantification of BrdU⁺ cells in each bin showed a significant increase in bin III and a significant decrease in bin V (Fig. 3h), corresponding to the SVZ and the apical surface, respectively. Collectively, these results highlighted a deregulation in the differentiation of aRG coupled with defects in INM in the *Mir146a*^{-/-} neocortex.

Loss of *miR-146a* causes defects in neuronal differentiation and neurite outgrowth

As neurogenesis relies on fine coordination between proliferation and differentiation of aRG, we tested whether the loss of *miR-146a* could impact the number and/or properties of newborn neurons in the neocortex. We, thus, stained the neocortical slices at E14.5 for the neuronal post-mitotic factor NeuN and measured the thickness of the neuronal layer (Fig. 3i). Consistent with previous results, a significantly enlarged NeuN⁺ cells layer (30% more) was observed in the mutant neocortex compared to WT (Fig. 3j). To test whether this difference is persistent throughout brain development, we subsequently counted the number of NeuN⁺ cells in the cortex at P30 and P60, but we did not detect any difference between the mutants and WT (Supplementary Fig. 6). To investigate whether the absence of *miR-146a* may alter the neurite outgrowth, we used live cell imaging to monitor neurite extension in cultured primary neuron for 1 week (Fig. 3k,l,m). *Mir146a*^{-/-} neurons had an average neurite length that was constantly longer than the length of the neurites of the control neurons (Fig. 3l,m). Neuronal differentiation and migration are two closely related processes essential for the formation of the multilayered cortical structure. Therefore, we assessed whether this defect in neurogenesis interfere with the migrating trajectory of neurons by BrdU birth dating technique. We, thus, labeled newly born neurons at E14.5 by BrdU, which are destined for layer IV⁴⁸ of the cortex, and studied their distribution in each cortical layer at P7. This analysis did not detect any obvious difference in the distribution of BrdU⁺ cells in any cortical layer between the mutants and WT (Supplementary Fig. 7). Taken together, these results point to defects in neurogenesis and neurite outgrowth in the *Mir146a*^{-/-} neocortex, which does not lead to obvious malformation of the cortical structure.

Altered Shh signaling in the *Mir146a*^{-/-} developing brain

To gain mechanistic insight at the molecular level, we performed the transcriptomic profiles of the *Mir146a*^{-/-} neocortex at E14.5. Moreover, to evaluate the impact of *miR-146a* loss on processes that occur later in brain development, such as structural and synaptic maturation, we also investigated sensorimotor cortex (cortex for short), hippocampus and amygdala at P30 and P60. Using a threshold of $P < 0.05$ and fold change > 1.2 , we identified 481 DEGs at E14.5 (3.2% of the transcriptome), 1 298 DEGs at P30 (14% of the transcriptome) and 495 DEGs at P60 (5.5% of the transcriptome) (Fig. 4a and Supplementary Tables 1-3). Notably, most DEGs do not overlap between developmental stages and regions tested (Supplementary Fig. 8). We randomly selected 20 genes for validation by RT-qPCR; 19 of which showed comparable fold change with that detected by RNA-Seq ($R^2 = 0.9$), suggesting that the accuracy of the RNA-Seq analyses is 95% (Fig. 4b).

To understand how abnormal expression of DEGs may translate into functional defects, we performed pathway enrichment analyses for each brain region and developmental stage. We determined that pathways detected at least twice were more likely to be neuron specific ($P < 0.01$ by Fisher's Exact Test and Supplementary Fig. 9). Of the 25 pathways reported at least three times in any given region across two developmental stages (Supplementary Table 4 and Supplementary Fig. 10), 48% (12/25) are important for proper development and function of neurons and synapses; 24% (6/25) are ubiquitous pathways with indispensable roles for the behavioral functions 4% (1/25) are involved in immunity/inflammation; and 24% (6/25) are not related to any brain function (Supplementary Fig. 10). In addition, cell type enrichment analysis suggested that the reported DEGs identified in the mutant brains were enriched for genes expressed in pyramidal and interneurons in most regions and stages analyzed (Fig. 4c). Interestingly, oligodendrocyte markers were also affected in the hippocampus at P30 and P60 and in the amygdala at P30 (Fig. 4c) with the vast majority of oligodendrocyte markers being downregulated at P30 (132/135, $P = 0$ by Fisher Exact Test, Supplementary Table 2) and upregulated at P60 (11/12, $P < 0.01$ by Fisher Exact Test, Supplementary Table 3). Markers for other cell types in the brain, including astrocyte and ependymal cells, were similarly expressed in mutant and WT brains.

Finally, we sought to identify the potential cascade of upstream transcriptional regulators that could explain the observed gene expression changes. To that end, we used IPA to perform Regulator Effect Analysis on DEGs identified in the neocortex at E14.5. Interestingly, this analysis revealed only one positive network inter-regulated by three key factors of progenitor cell proliferation, migration and fate determination, CTNNB1, SHH and PAX6 (Fig. 4d). In particular, all genes linked to SHH pathway were downregulated in absence of *miR-146a*. As such, our results propose that imbalance of SHH and WNT/ β -catenin signaling could drive the gene expression changes and neuronal defects seen in the mutant brain.

DISCUSSION

While many *in vitro* studies reported the role of miRNAs in brain, the specific contribution of each miRNA to the fate specification of neural stem cell progeny during neurodevelopment has remained largely unexplored. Analysis of targeted *in vivo* models is essential to get insight into the molecular mechanisms regulated by each miRNA, enabling the development of new treatment strategies for DBDs caused by the abnormal expression of these miRNAs. Here, we used a mouse line constitutively inactivated for *miR-146a* to evaluate the consequences of this inactivation on the differentiation and migration of neural stem cells, as well as on brain anatomy and cognition.

Our data show that proper *miR-146a* expression is critical for correct differentiation of neural stem cell (Fig. 5). These results are in line with the previously published *in vitro* studies demonstrating that increased *miR-146a* level enhanced neuronal differentiation in mouse NSC⁴⁹ and in H9 human neural stem cells²². While our results suggest that both reduced and increased *miR-146a* levels have similar consequences on neural progenitors, the underlying mechanisms are different. *miR-146a* overexpression in cultured NSC halts cell cycle progression and promotes neuronal differentiation through NOTCH pathway. By contrast, loss of *miR-146a* has no obvious effects on the proliferation of aRG. Transcriptomic analyses reveal a direct

correlation between loss of *miR-146a* and impairment of the SHH signaling, while genes involved in NOTCH pathway are not affected. Indeed, we observed the consistent downregulation of all molecular players related to SHH activation. Interestingly, we also noted that *Lmx1a* and *Lmx1b*, both key repressors of CTNBB1 (antagonistic pathway of SHH), are among the most downregulated genes in the *Mir146a*^{-/-} neocortex (Fig. 4d and Supplementary Table 1). Moreover, loss of *miR-146a* increases neurite outgrowth *in vitro*, correlating with the increased expression of dendritic attractant molecules *Sema3a* and *Sema3c*⁵⁰. Altogether, these results suggest that *miR-146a* is critical for the early stage of neuronal differentiation and cortical network formation.

These results raise the question of which *miR-146a* target(s) may mediate these effects in the mutant brains? In this regard, the NUMB protein is an excellent candidate. NUMB, a validated direct target of *miR-146a*⁵¹, is a well-established NOTCH antagonist that plays a key role in the regulation of asymmetric cell division in many cell types, especially in neural progenitors⁵². NUMB is also a known inhibitor of SHH signaling during neurogenesis¹⁵. In macrophages, *miR-146a* was reported to facilitate activation of SHH signaling by targeting NUMB expression⁵³. We thus propose that in the developing brain, loss of *miR-146a* causes an increased NUMB protein level that should in turn inhibit SHH signaling and thus activate the Wnt/ β -catenin pathway. Testing for NUMB expression level by RNA-Seq and Western Blot did not reveal any difference between WT and mutant brains (data not shown). However, these experiments were performed on whole neocortex extracts containing a mix of cell populations. Preliminary aRG enrichment would likely be necessary to detect any abnormal NUMB expression.

The transition from P30 and P60 in rodent, which corresponds to the human period of adolescence, is characterized by a significant reduction in the number of dendrites and synaptic connections from active pruning by microglia⁵⁴. This critical period of brain development is also associated with a marked increase in myelin production by oligodendrocytes⁵⁴. Interestingly, we detected that markers of microglia were deregulated at P30 and those of oligodendrocytes were deregulated at both P30 and P60. Our data point out a marked delay in the development of oligodendrocytes at P30 that is overcompensated at P60. Notably, this phenomenon appears to be a common hallmark of oligodendrocytes in disease context^{55, 56}. Thus, we propose that *miR-146a* functions in oligodendrocyte and microglia cells could also contribute to synaptic maturation in specific brain regions. Previous reports demonstrated that, *in vitro*, *miR-146a* overexpression promotes oligodendrogenesis⁵⁷ and myelination⁵⁸ through unknown mechanisms, and regulates immune responses of microglia⁵⁹ by acting on the NF- κ B pathway in inflammatory contexts. Our results provide initial evidence to support the role of *miR-146a* in the development and differentiation of glia cells *in vivo* and provide the basis for further investigation of the underlying mechanism.

Besides the neurogenesis defects observed in early stages of brain development, no noticeable differences were observed in the number of neurons, the size and the structure of the cortex between WT and mutant brains at postnatal stages. This result suggests the establishment of compensatory mechanisms that prevent the production of supernumerary neurons and major structural abnormalities. However, our data also demonstrate that these compensatory processes do not warrant a functional brain in the adult. Indeed, we first demonstrated that *Mir146a*^{-/-} mice display an abnormal hippocampus structure with an increased hemispheric asymmetry that was not associated with any particular brain hemisphere. In human, the hippocampal volume is slightly larger in the right hemisphere both in children⁶⁰ and in adults⁶¹. While this asymmetry is sometimes lost in pathologies such as Williams Syndrome⁶² or Alzheimer's disease⁶³, to our knowledge, an increased asymmetry with randomized distribution between right and left hemispheres was never reported. Although the mechanism underlying this defect remains unknown, this finding suggests that loss of *miR-146a* causes subtle alterations in brain anatomy with likely impacts on cortical network function. Accordingly, many important neuronal pathways remain deregulated at P30 and P60, including axonal guidance signaling, synaptic long-term potentiation, CREB signaling in neurons and Ephrin receptor signaling (Supplementary Fig. 10). Secondly, *Mir146a*^{-/-} mice exhibited severe impairments in learning and memory functions without any locomotion or anxiety-related behavioral phenotype (Fig. 2 and Supplementary Fig. 3). Mechanistically, the

deficit in learning and memory performances can likely be explained, at least in part, by the brain anatomical and neuronal differentiation defects observed in the mutant mice. However, whether *mir-146a* can also directly contribute to the postnatal regulation of hippocampal-dependent learning and memory functions remains unanswered. Taken together, our data demonstrate that long-term effects of *miR-146a* inactivation alter processes involved in neuronal maturation and lead to severe cognitive deficits.

This work reports the first characterization of a miRNA mouse model in the context of neurodevelopment. We demonstrate the relevance of the *Mir146a*^{-/-} mouse for DBD studies as several aspects are consistent with reported impairments in DBD patients, including impaired neurogenesis, abnormal brain anatomy, and working and spatial memories deficits⁶⁴. Finally, our results emphasize the key role of small non-coding RNA in the brain and highlight the need for further research into the causal link between non-coding RNA and DBD.

ACKNOWLEDGEMENT

We would like to thank the core platforms of the Imagine Institute, notably Genomic Platform and the Histology Platform. We also wish to thank Dr. Fiona Francis and her group for their precious advice during experimental setup. This work received a state subsidy managed by the National Research Agency under the "Investments for the Future" program bearing the reference ANR-10-IHU-01 and the "ANR-SAMENTA 2012" program. This work was also supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20160334938) and the Fondation de France. LC is supported by the Centre National de la Recherche Scientifique. JF is supported by Crédit Agricole d'Ile-de-France Mécénat. FO is supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Human Frontier Scientific Program-CDA, ATIP-AVENIR Program, AGEMED INSERM program, ANR, Fondation Schlumberger pour l'Éducation et la Recherche (FSER), and Emergence de la Ville de Paris.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary information is available at Molecular Psychiatry's website.

REFERENCES

1. Uzquiano A, Gladwyn-Ng I, Nguyen L, Reiner O, Götz M, Matsuzaki F *et al*. Cortical progenitor biology: key features mediating proliferation versus differentiation. *Journal of Neurochemistry* 2018.
2. Nowakowski TJ, Mysiak KS, Pratt T, Price DJ. Functional *dicer* is necessary for appropriate specification of radial glia during early development of mouse telencephalon. *PLoS ONE* 2011.
3. Demyanenko GP, Halberstadt AI, Pryzwansky KB, Werner C, Hofmann F, Maness PF. Abnormal neocortical development in mice lacking cGMP-dependent protein kinase I. *Developmental Brain Research* 2005.
4. Yamamoto H, Mandai K, Konno D, Maruo T, Matsuzaki F, Takai Y. Impairment of radial glial scaffold-dependent neuronal migration and formation of double cortex by genetic ablation of *afadin*. *Brain Research* 2015.

5. Englund C. Pax6, Tbr2, and Tbr1 Are Expressed Sequentially by Radial Glia, Intermediate Progenitor Cells, and Postmitotic Neurons in Developing Neocortex. *Journal of Neuroscience* 2005.
6. Yamanishi E, Yoon K, Alberi L, Gaiano N, Mizutani KI. NF- κ B signaling regulates the generation of intermediate progenitors in the developing neocortex. *Genes to Cells* 2015.
7. Louvi A, Artavanis-Tsakonas S. Notch signalling in vertebrate neural development. *Nature Reviews Neuroscience* 2006.
8. Belgacem Y, Hamilton A, Shim S, Spencer K, Borodinsky L. The Many Hats of Sonic Hedgehog Signaling in Nervous System Development and Disease. *Journal of Developmental Biology* 2016; 4: 35.
9. Woodhead GJ, Mutch CA, Olson EC, Chenn A. Cell-Autonomous beta-Catenin Signaling Regulates Cortical Precursor Proliferation. *Journal of Neuroscience* 2006.
10. Hirabayashi Y, Itoh Y, Tabata H, Nakajima K, Akiyama T, Masuyama N *et al.* The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development* 2004.
11. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014.
12. O'Carroll D, Schaefer A. General principals of miRNA biogenesis and regulation in the brain. *Neuropsychopharmacology* 2013; 38(1):39-54.
13. Lv X, Jiang H, Liu Y, Lei X, Jiao J. MicroRNA-15b promotes neurogenesis and inhibits neural progenitor proliferation by directly repressing TET3 during early neocortical development. *EMBO reports* 2014.
14. Rago L, Beattie R, Taylor V, Winter J. MiR379-410 cluster miRNAs regulate neurogenesis and neuronal migration by fine-tuning N-cadherin. *EMBO Journal* 2014.
15. Bian S, Sun T. Functions of noncoding RNAs in neural development and neurological diseases. *Molecular neurobiology* 2011.
16. Abe M, Bonini NM. MicroRNAs and neurodegeneration: Role and impact. *Trends in Cell Biology* 2013.
17. Mei H, Lin ZY, Tong QS. The roles of microRNAs in neuroblastoma. *World Journal of Pediatrics* 2014.
18. Fregeac J, Colleaux L, Nguyen LS. The emerging roles of MicroRNAs in autism spectrum disorders. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 2016; 71:729-738.
19. Sakamoto K, Crowley JJ. A comprehensive review of the genetic and biological evidence supports a role for MicroRNA-137 in the etiology of schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2018; 177(2):242-256.
20. Nguyen LS, Lepleux M, Makhoul M, Martin C, Fregeac J, Siquier-Pernet K *et al.* Profiling olfactory stem cells from living patients identifies miRNAs relevant for autism pathophysiology. *Molecular autism* 2016; 7:1.

21. Mor M, Nardone S, Sams DS, Elliott E. Hypomethylation of miR-142 promoter and upregulation of microRNAs that target the oxytocin receptor gene in the autism prefrontal cortex. *Molecular autism* 2015; 6: 46.
22. Nguyen LS, Fregeac J, Bole-Feysot C, Cagnard N, Iyer A, Anink J *et al.* Role of miR- 146a in neural stem cell differentiation and neural lineage determination: relevance for neurodevelopmental disorders. *Molecular autism* 2018; 9:38.
23. Talebizadeh Z, Butler MG, Theodoro MF. Feasibility and relevance of examining lymphoblastoid cell lines to study role of microRNAs in autism. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research* 2008; 1(4): 240-250.
24. An N, Zhao W, Liu Y, Yang X, Chen P. Elevated serum miR-106b and miR-146a in patients with focal and generalized epilepsy. *Epilepsy Research* 2016.
25. Tao H, Zhao J, Liu T, Cai Y, Zhou X, Xing H *et al.* Intranasal Delivery of miR-146a Mimics Delayed Seizure Onset in the Lithium-Pilocarpine Mouse Model. *Mediators Inflamm* 2017; 2017: 6512620.
26. He F, Liu B, Meng Q, Sun Y, Wang W, Wang C. Modulation of miR-146a/ complement factor H mediated inflammatory responses in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Biosci Rep* 2016.
27. Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, Baltimore D. NF- B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006.
28. Huang C, Liu XJ, QunZhou, Xie J, Ma TT, Meng XM *et al.* MiR-146a modulates macrophage polarization by inhibiting Notch1 pathway in RAW264.7 macrophages. *International Immunopharmacology* 2016; 32: 46-54.
29. Ghahhari NM, Babashah S. Interplay between microRNAs and WNT/ β -catenin signalling pathway regulates epithelial-mesenchymal transition in cancer. *European Journal of Cancer* 2015.
30. Hwang SJ, Seol HJ, Park YM, Kim KH, Gorospe M, Nam DH *et al.* MicroRNA-146a suppresses metastatic activity in brain metastasis. *Molecules and Cells* 2012.
31. Zhou X, Su S, Li S, Pang X, Chen C, Li J *et al.* MicroRNA-146a down-regulation correlates with neuroprotection and targets pro-apoptotic genes in cerebral ischemic injury in vitro. *Brain Research* 2016; 1648: 136-143.
32. Wang L, Chopp M, Szalad A, Zhang Y, Wang X, Zhang RL *et al.* The role of miR- 146a in dorsal root ganglia neurons of experimental diabetic peripheral neuropathy. *Neuroscience* 2014; 259: 155-163.
33. Jia L, Wang L, Chopp M, Zhang Y, Szalad A, Zhang ZG. MicroRNA 146a locally mediates distal axonal growth of dorsal root ganglia neurons under high glucose and sildenafil conditions. *Neuroscience* 2016.
34. Chen Y-L, Shen C-KJ. Modulation of mGluR-Dependent MAP1B Translation and AMPA Receptor Endocytosis by MicroRNA miR-146a-5p. *Journal of Neuroscience* 2013; 33: 9013-9020.
35. Chou CH, Chang NW, Shrestha S, Hsu SD, Lin YL, Lee WH *et al.* miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. *Nucleic Acids Res* 2016; 44(D1): D239-247.
36. Shirdel EA, Xie W, Mak TW, Jurisica I. NAViGaTing the micronome--using multiple microRNA prediction databases

- to identify signalling pathway-associated microRNAs. *PLoS One* 2011; 6(2): e17429.
37. Johnson MR, Shkura K, Langley SR, Delahaye-Duriez A, Srivastava P, Hill WD *et al.* Systems genetics identifies a convergent gene network for cognition and neurodevelopmental disease. *Nat Neurosci* 2016; 19(2):223-232.
 38. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 1988; 31(1):47-59.
 39. Bourin M, Hascoet M. The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol* 2003; 463(1- 3): 55-65.
 40. Boddaert N, Zilbovicius M, Philipe A, Robel L, Bourgeois M, Barthélemy C *et al.* MRI findings in 77 children with non-syndromic autistic disorder. *PLoS ONE* 2009.
 41. Erbetta A, Bulgheroni S, Contarino VE, Chiapparini L, Esposito S, Annunziata S *et al.* Low-functioning autism and nonsyndromic intellectual disability: Magnetic Resonance Imaging (MRI) findings. *Journal of Child Neurology* 2015.
 42. Santos-Rebouças CB, Belet S, De Almeida LG, Ribeiro MG, Medina-Acosta E, Bahia PRV *et al.* A novel in-frame deletion affecting the BAR domain of OPHN1 in a family with intellectual disability and hippocampal alterations. *European Journal of Human Genetics* 2014.
 43. Soto-Ares G, Joyes B, Lemaître M-P, Vallée L, Pruvo J-P. MRI in children with mental retardation. *Pediatric Radiology* 2003.
 44. Herbert MR, Ziegler DA, Deutsch CK, O'Brien LM, Kennedy DN, Filipek PA *et al.* Brain asymmetries in autism and developmental language disorder: a nested whole- brain analysis. *Brain* 2005; 128(Pt 1): 213-226.
 45. Saywell V, Viola A, Confort-Gouny S, Le Fur Y, Villard L, Cozzzone PJ. Brain magnetic resonance study of Mecp2 deletion effects on anatomy and metabolism. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006.
 46. Ellegood J, Pacey LK, Hampson DR, Lerch JP, Henkelman RM. Anatomical phenotyping in a mouse model of fragile X syndrome with magnetic resonance imaging. *NeuroImage* 2010.
 47. Denny CA, Burghardt NS, Schachter DM, Hen R, Drew MR. 4- to 6-week-old adult- born hippocampal neurons influence novelty-evoked exploration and contextual fear conditioning. *Hippocampus* 2012; 22(5): 1188-1201.
 48. Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JRL, Macklis JD. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nature Reviews Neuroscience* 2007; 8: 427-437.
 49. Mei J, Bachoo R, Zhang C-L. MicroRNA-146a Inhibits Glioma Development by Targeting Notch1. *Molecular and Cellular Biology* 2011; 31: 3584-3592.
 50. Schlomann U, Schwamborn JC, Muller M, Fassler R, Puschel AW. The stimulation of dendrite growth by Sema3A requires integrin engagement and focal adhesion kinase. *J Cell Sci* 2009; 122(Pt 12): 2034-2042.
 51. Kuang W, Tan J, Duan Y, Duan J, Wang W, Jin F *et al.* Cyclic stretch induced miR- 146a upregulation delays C2C12 myogenic differentiation through inhibition of Numb. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 378(2):259-263.

52. Shen Q, Zhong W, Jan YN, Temple S. Asymmetric Numb distribution is critical for asymmetric cell division of mouse cerebral cortical stem cells and neuroblasts. *Development (Cambridge, England)* 2002; 129:4843-4853.
53. Ghorpade DS, Sinha AY, Holla S, Singh V, Balaji KN. NOD2-nitric oxide-responsive microRNA-146a activates Sonic hedgehog signaling to orchestrate inflammatory responses in murine model of inflammatory bowel disease. *Journal of Biological Chemistry* 2013; 288: 33037-33048.
54. Zeidan-Chulia F, Salmina AB, Malinovskaya NA, Noda M, Verkhatsky A, Moreira JC. The glial perspective of autism spectrum disorders. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 2014; 38: 160-172.
55. Caprariello AV, Batt CE, Zippe I, Romito-DiGiacomo RR, Karl M, Miller RH. Apoptosis of Oligodendrocytes during Early Development Delays Myelination and Impairs Subsequent Responses to Demyelination. *J Neurosci* 2015; 35(41): 14031- 14041.
56. Pacey LK, Xuan IC, Guan S, Sussman D, Henkelman RM, Chen Y *et al.* Delayed myelination in a mouse model of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* 2013; 22(19): 3920-3930.
57. Liu XS, Chopp M, Pan WL, Wang XL, Fan BY, Zhang Y *et al.* MicroRNA-146a Promotes Oligodendrogenesis in Stroke. *Molecular Neurobiology* 2017; 54(1): 227- 237.
58. Zhang J, Zhang ZG, Lu M, Wang X, Shang X, Elias SB *et al.* MiR-146a promotes remyelination in a cuprizone model of demyelinating injury. *Neuroscience* 2017; 348: 252-263.
59. Saba R, Gushue S, Huzarewich RL, Manguiat K, Medina S, Robertson C *et al.* MicroRNA 146a (miR-146a) is over-expressed during prion disease and modulates the innate immune response and the microglial activation state. *PLoS One* 2012; 7(2): e30832.
60. Giedd JN, Vaituzis AC, Hamburger SD, Lange N, Rajapakse JC, Kaysen D *et al.* Quantitative MRI of the temporal lobe, amygdala, and hippocampus in normal human development: Ages 4-18 years. *Journal of Comparative Neurology* 1996.
61. Pruessner JC. Volumetry of Hippocampus and Amygdala with High-resolution MRI and Three-dimensional Analysis Software: Minimizing the Discrepancies between Laboratories. *Cerebral Cortex* 2000.
62. Sampaio A, Sousa N, Fernández M, Vasconcelos C, Shenton ME, Gonçalves ÓF. Williams syndrome and memory: A neuroanatomic and cognitive approach. *Journal of Autism and Developmental Disorders* 2010.
63. Barnes J, Scahill RI, Schott JM, Frost C, Rossor MN, Fox NC. Does Alzheimer's disease affect hippocampal asymmetry? Evidence from a cross-sectional and longitudinal volumetric MRI study. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 2005.
64. Minshew NJ, Williams DL. The new neurobiology of autism: cortex, connectivity, and neuronal organization. *Arch Neurol* 2007; 64(7):945-950.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Increased hippocampus asymmetry in the *Mir146a*^{-/-} mice at P30. Volume ($\pm$ S.D.) of the cortex **(a)** and the hippocampus **(b)** of the mutant and WT mice as measured by brain MRI at P30. **(c)** Brain MRI showing coronal section of a WT and a mutant brain; white arrow points towards the enlarged hippocampus in the mutant. **(d)** Scatterplot comparing the ratio between volumes of two hippocampal hemispheres in mutant mice and WT mice. * $P < 0.05$ by Student's unpaired 2-tailed T-Test (on absolute values).

Figure 2: Behavioral analyses of the *Mir146a*^{-/-} mice. **(a)** 3-foot shock CFC performed in 3-month old *Mir146a*^{-/-} mice ($n=16$) and their control littermates ($n=15$). Percent freezing was measured in CFC for each group during the training (as a control for the basal level of mouse freezing) and testing phases (to assess memory performances). **(b)** Novel object recognition test (NOR) performed in 3-month old *Mir146a*^{-/-} mice ($n=16$) and their control littermates ($n=15$). Discrimination and preference indexes were measured for each group during the testing phase. **(c)** Object location memory (OLM) task performed in 3-month old *Mir146a*^{-/-} mice ($n=16$) and their control littermates ($n=15$). Discrimination and preference indexes were measured for each group during the testing phase. **(d)** Morris water maze test (MWMT) performed in 3-month-old *Mir146a*^{-/-} mice ($n=8$) and their control littermates ($n=6$). The graph shows the mean time (over four trials per day for 8 consecutive days) needed for each group of mice to localize the submerged platform in the swimming area. All behavioral tests were performed on at least two independent experiments (except for **d**), for each experiment: $n \geq 6$ mice per group. Results are given as mean $\pm$ s.e.m. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, NS: not significant; by Student's *t*-test compared to 3-month-old mice littermates.

Figure 3: Altered aRG, IP population size and neurogenesis in the *Mir146a*^{-/-} brains. **(a)** Sagittal sections from WT and mutant brains labeled with PAX6, TBR2 and merge. **(b)** Boxplot showing the number of PAX6⁺ cells ($\pm$ S.D.) counted using 3 images from comparable plane per mouse. **(c)** Boxplot showing the quantification of TBR2⁺ cells ($\pm$ S.D.) from the same images as **b**. **(d)** Boxplot showing the ratio of TBR2⁺/PAX6⁺ cells. *** $P < 0.001$ by Student's unpaired 2-tailed T-Test. **(e)** Phospho-histone 3 (PH3) stains dividing cells in the neocortex at E14.5 (white arrows). **(f)** Graph showing the average number of PH3⁺ cells ($\pm$ S.D.) in the SVZ. * $P < 0.05$ by Student's unpaired 2-tailed T-Test.

(g) BrdU staining in the neocortex at E14.5 after 2H pulse chase; Images were divided into five equal bins for counting. **(h)** Percentage of BrdU+ cells ($\pm$ S.D.) per bin (normalized against the total number of labeled cells). * $P < 0.05$ by Student's unpaired 2-tailed T-Test. **(i)** Sagittal section of E14.5 neocortex of the WT and mutant stained with the post-mitotic neurons NeuN; White arrows show the differentiated neuron layer where the measurements were made. **(j)** Graph comparing the average thickness ($\pm$ S.D.) of the NeuN+ cells layer between WT and mutant embryos; at least 3 images from comparable plane per mouse were used for the analysis; ** $P < 0.01$ by Student's unpaired 2-tailed T-Test. **(k)** Mask of the automated analysis used by the live cell imaging system Incucyte; the cell body cluster (CBC) are labeled in yellow and the neurites are labeled in pink. **(l)** Graph shows the total length of neurites ($\pm$ S.E.M) of neurons from the WT ($n=7$) and the mutant embryos ($n=7$). Images were taken by the Incucyte S3 at 9 different spots per well (replicate) every 3h during 6 days of culture; post analysis was performed automatically using the pre-designed mask; there are at least 4 technical replicates per embryo. **(m)** Graph shows the average of slopes ($\pm$ S.D.) of neurite extension of corresponding graph d. ** $P < 0.01$ by Wilcoxon Ranked Sum Test.

Figure 4: Transcriptomic analyses identified main cell types and pathways affected in the *Mir146a*^{-/-} brain. **(a)** Graph showing the number of deregulated genes (DEGs) in the mutant identified in each region and developmental stage; Hip - Hippocampus, Amy - Amygdala. **(b)** Graph showing the validation rate of the RNA-Seq analysis by RT-qPCR using 20 randomly selected genes; circle indicates the only gene that was not validated. **(c)** Cell type enrichment analysis; Heatmap shows enrichment significance (P values) of DEGs in each cell type. **(d)** Gene networks regulated by SHH/CTNNB1/PAX6; Transcriptome deregulation at E14.5 in the neocortex was predicted to be modulated by three upstream master regulators of progenitor cell proliferation, migration and differentiation; Analysis was performed using Regulator Effect Algorithm of IPA; Green color indicates down regulated genes, pink/red colors indicate upregulated genes.

Figure 5: *miR-146a* promotes neuronal differentiation *in vivo*. During neurogenesis, loss of *miR-146a* leads to imbalance of radial glial cells (aRG) and intermediate progenitor (IP) and enhances neuronal differentiation and neurite branching.

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Supplementary Figure 1: Neurogenesis in the mouse neocortex. Neuroepithelial cells (NE) proliferate up to E11 before differentiating into apical radial glia (aRG). aRG are located in the ventricular zone (VZ) where their nucleus undergo interkinetic nuclear migration (INM) and divide at the apical surface. aRG either self replicate or give rise to a neuron or an intermediate progenitor (IP) after an asymmetric division. IP remain in the subventricular zone (SVZ) and can complete one or two cell cycles before differentiating into neurons. Neurons coming from aRG or IP migrate towards the intermediate zone (IZ) and the cortical plate (CP) where they acquire their final position and identity and start expressing post-mitotic markers such as NeuN.

Supplementary Figure 2: Increased hippocampus asymmetry in the *Mir146a*^{-/-} mice at P60. Volume ($\pm$ S.D.) of the cortex **(a)** and the hippocampus **(b)** of the mutant and WT mice as measured by brain MRI at P60. **(c)** Scatterplot comparing the ratio between volumes of two hippocampal hemispheres in mutant and WT mice. * $P < 0.05$ by Student's unpaired 2-tailed T-Test. On average, one hippocampus side is 15% larger than the other in mutant brains with random distribution (2 right>left and 2 left>right).

Supplementary Figure 3: Locomotion and anxious state of the *Mir146a*^{-/-} mice are not affected. **(a)** Open field test (OFT) performed in 3-month old *Mir146a*^{-/-} mice (n=16) and their control littermates (n=15). Total distance (meter), % of the distance traveled in the center versus periphery, and % of the time spent in the center versus periphery were measured. **(b)** Light/Dark transition Test (L/Dt) performed in 3-month old *Mir146a*^{-/-} mice (n=16) and their control littermates (n=15). The number of entries in the lit compartment, and % of the distance traveled and time spent in the lit compartment were measured. All behavioral tests were performed on at least two independent experiments, for each experiment: $n \geq 6$ mice per group. Results are given as mean $\pm$ s.e.m. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, NS: not significant; by Student's *t*-test compared to 3-month-old mice littermates.

Supplementary Figure 4: The *Mir146a*^{-/-} brain shows no sign of inflammation. Expression level ($\pm$ S.D.) of inflammatory markers IL1- β **(a and b)** and TNF- α **(c and d)** in brain lysates of 8 WT and 8 mutant mice that were used for behavior studies. Technical quadruplicates were performed.

Supplementary Figure 5: Number of PH3⁺ cells at apical surface of the E14.5 neocortex is unaltered in the *Mir146a*^{-/-}. Graph showing the number of PH3⁺ cells ($\pm$ S.D.) in images shown in Fig. 3e. NS, not significant by Student's 2-tailed T-Test.

Supplementary Figure 6: The number of cortical neurons is unaltered in the adult *Mir146a*^{-/-} brain. (a) Cortical slides of WT (top panel) and *Mir146a*^{-/-} mouse (bottom panel) stained for NeuN to label post-mitotic neurons at P60. Number of NeuN⁺ cells normalized to area counted ($\pm$ S.D.) in layer 2 (b), layers 3-4 (c), layer 6 (d) and all layers (e) in the WT and *Mir146a*^{-/-} cortical slices. At least 2 images at comparable plane per mouse were analyzed. The number of NeuN⁺ cells at P30 and P60 are indistinguishable, thus, we combined the results for each genotype.

Supplementary Figure 7: Loss of *miR-146a* does not affect cortical layers organization. (a) BrdU signal at P7 labeled neurons born at E14.5. The white box shows the analyzed area. (b) Zoom of the white box from (a). The 6 layers of the mature cortex were determined and BrdU⁺ cells were counted using 3 images from comparable plane. (c) Graph shows the percentage of cells in each layer for the two genotypes, normalized against the total number of labeled cells.

Supplementary Figure 8: Overlapping DEGs identified in the *Mir146a*^{-/-} brain across developmental stages (a) or across different regions at P30 (b) and at P60 (c).

Supplementary Figure 9: Frequency of pathways deregulated in the *Mir146a*^{-/-} brain across all stages and regions. Pathways were classified into 4 categories based on their functions: neuronal relevant, inflammation, ubiquitous and unrelated to the brain (ie. heart, colon etc). Neuronal pathways were significantly more likely to be identified more than once ($P < 0.05$ by Fisher Exact Test).

Supplementary Figure 10: Enriched pathways deregulated in at least three regions in the *Mir146a*^{-/-} brain. Heatmap shows enrichment significance (P values) by IPA analysis. Pathways grouped manually by functions. Amy, amygdala; Cor, cortex; Hip, hippocampus.

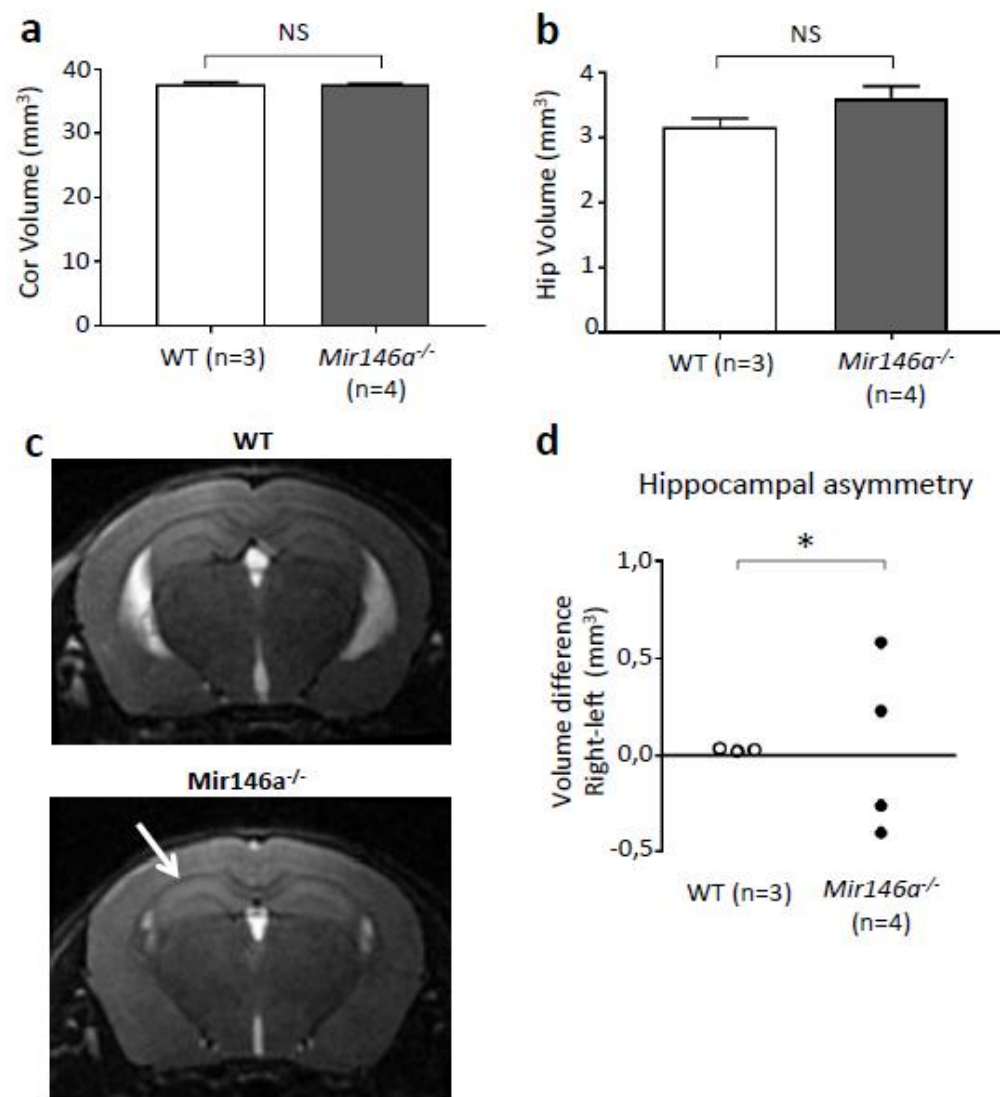


Figure 1

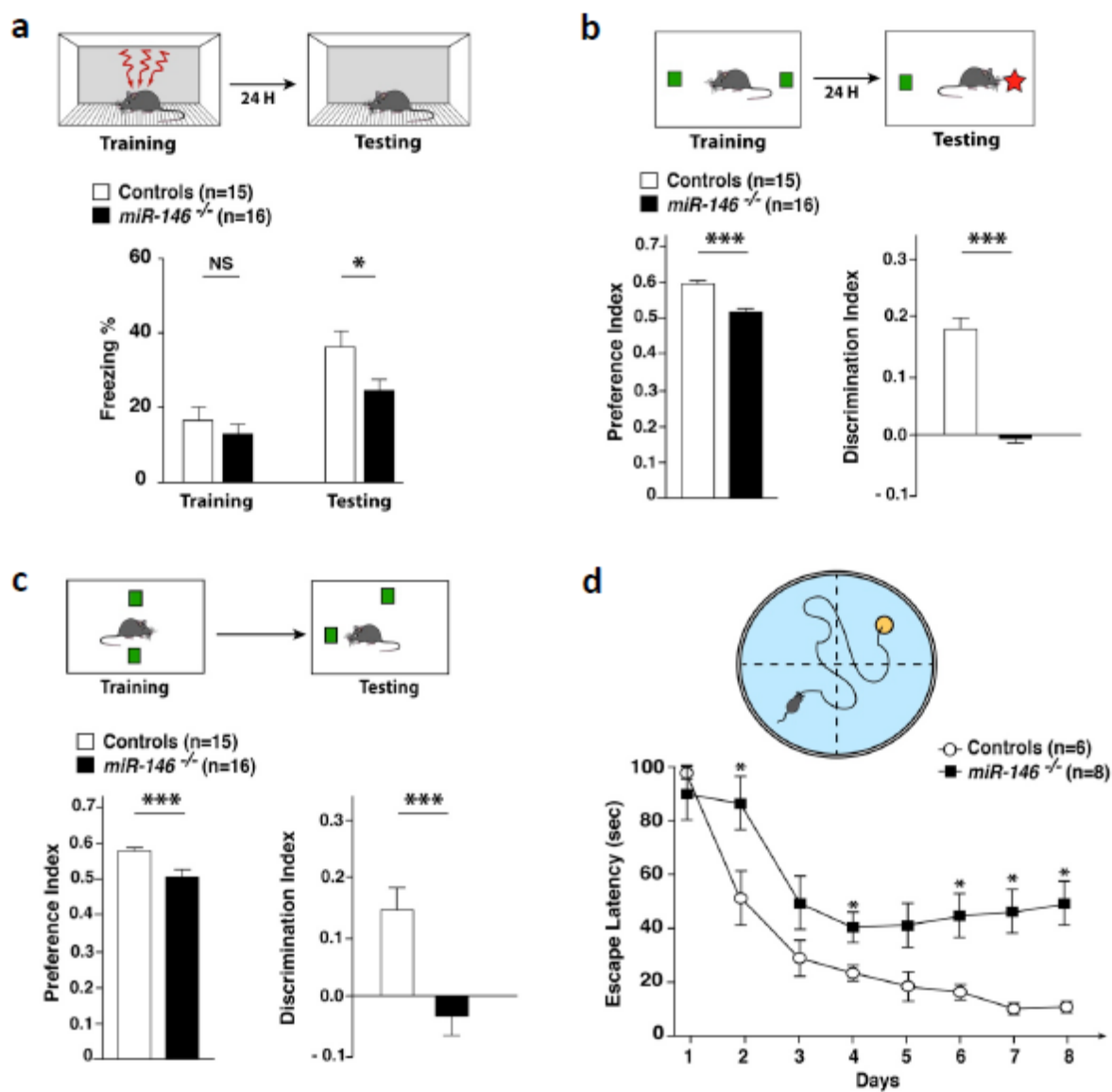


Figure 2

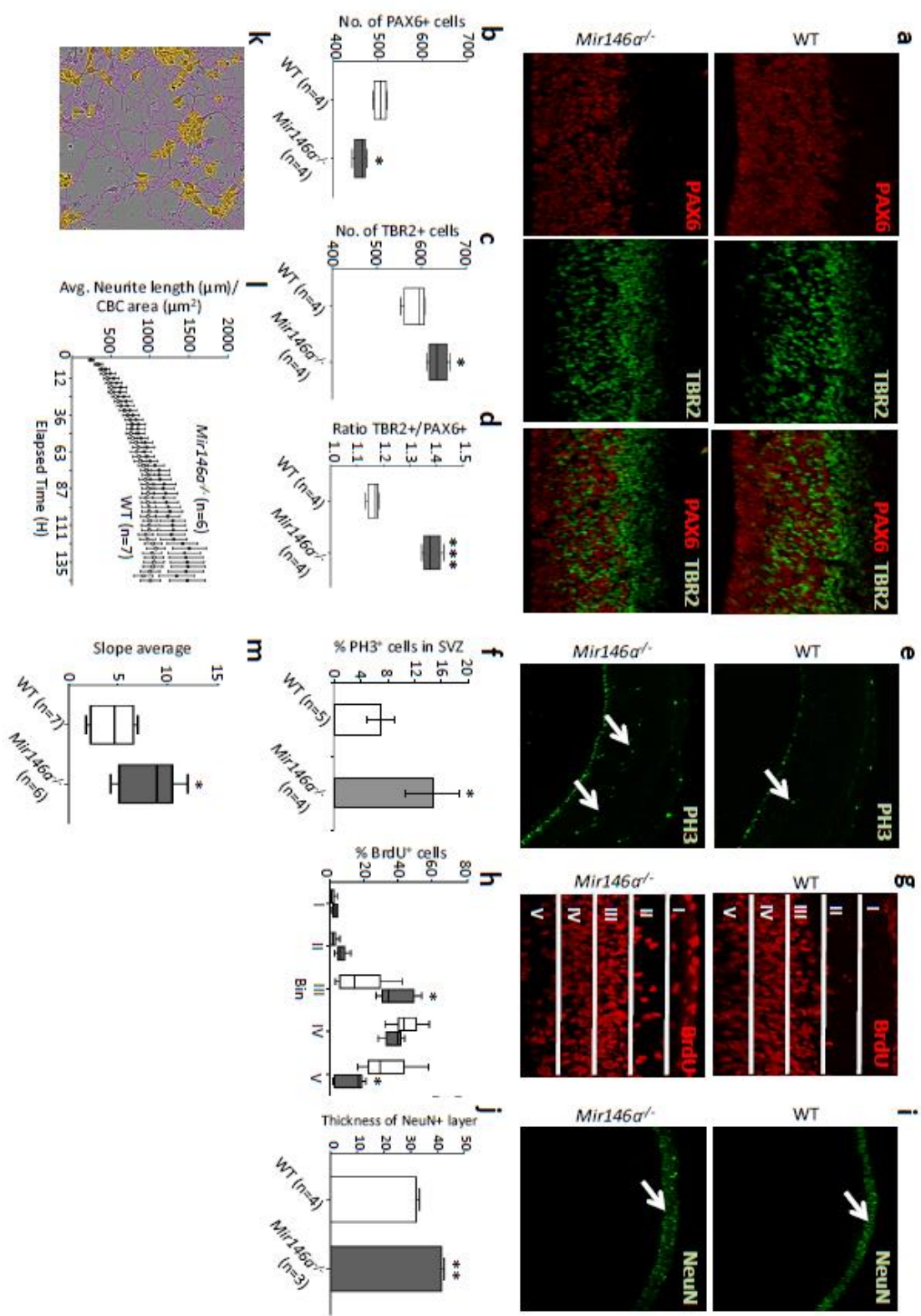


Figure 3

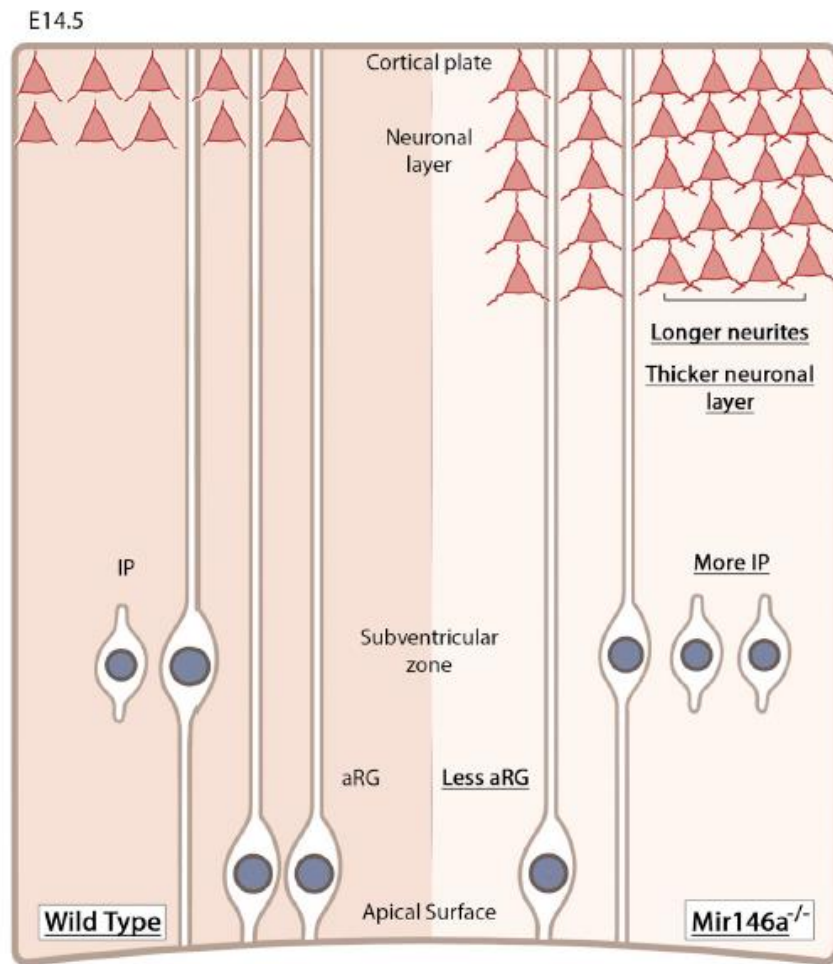


Figure 5

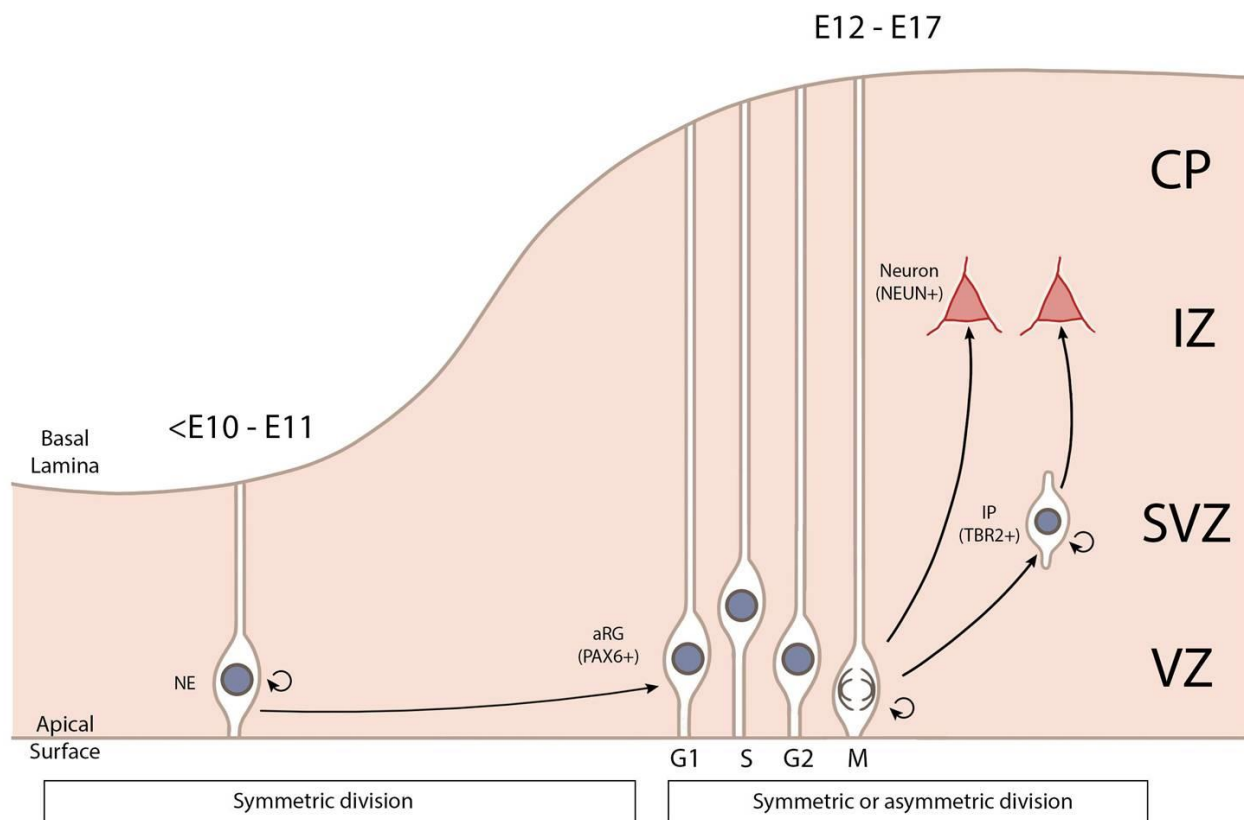


Figure S1

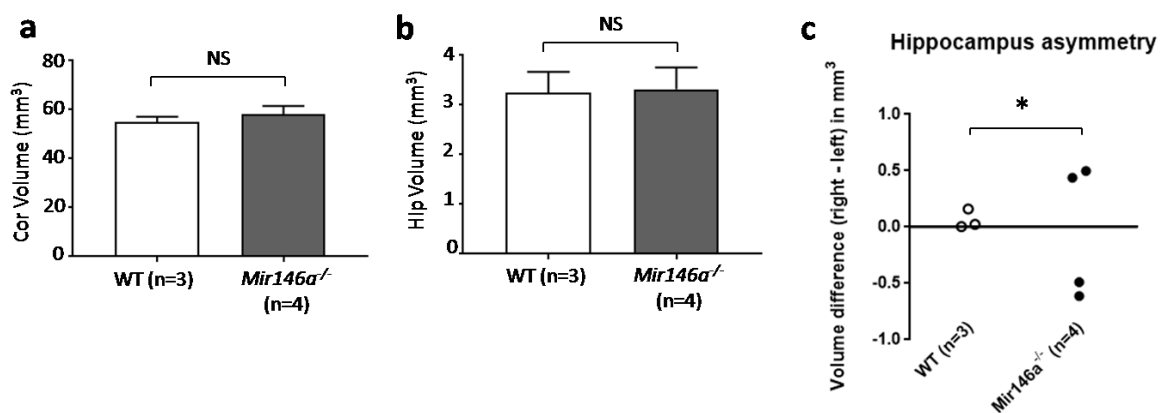


Figure S2

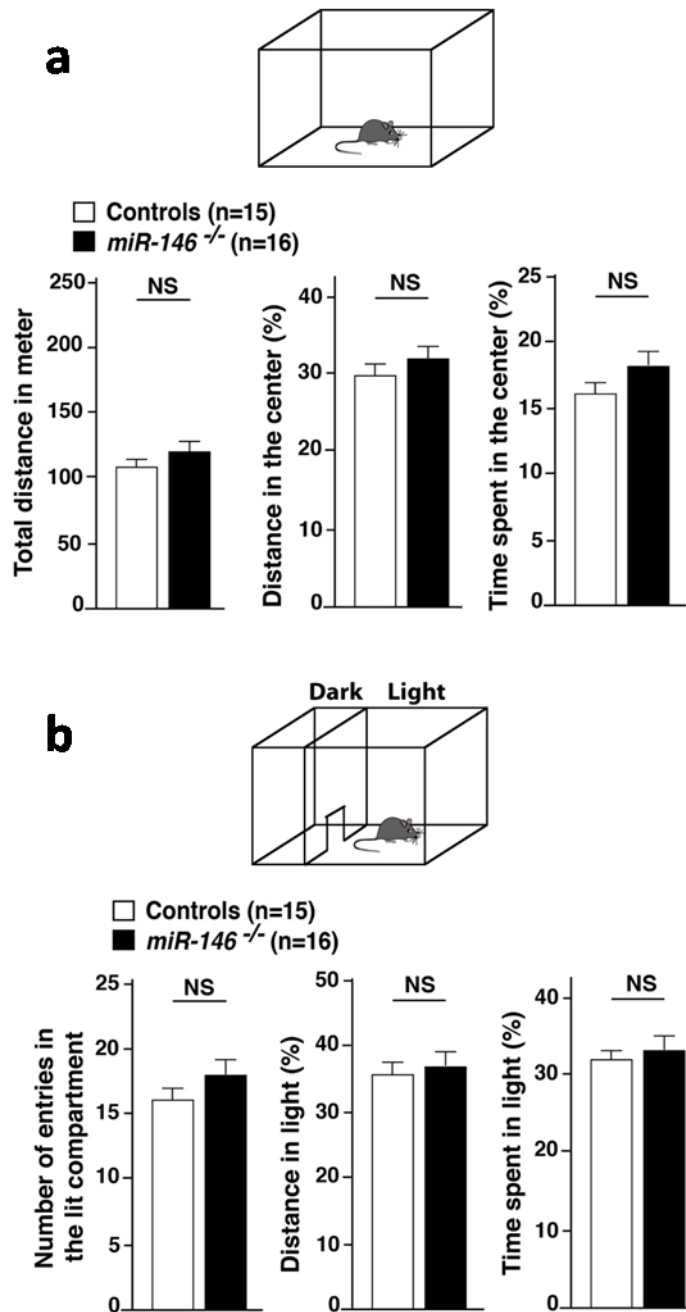


Figure S3

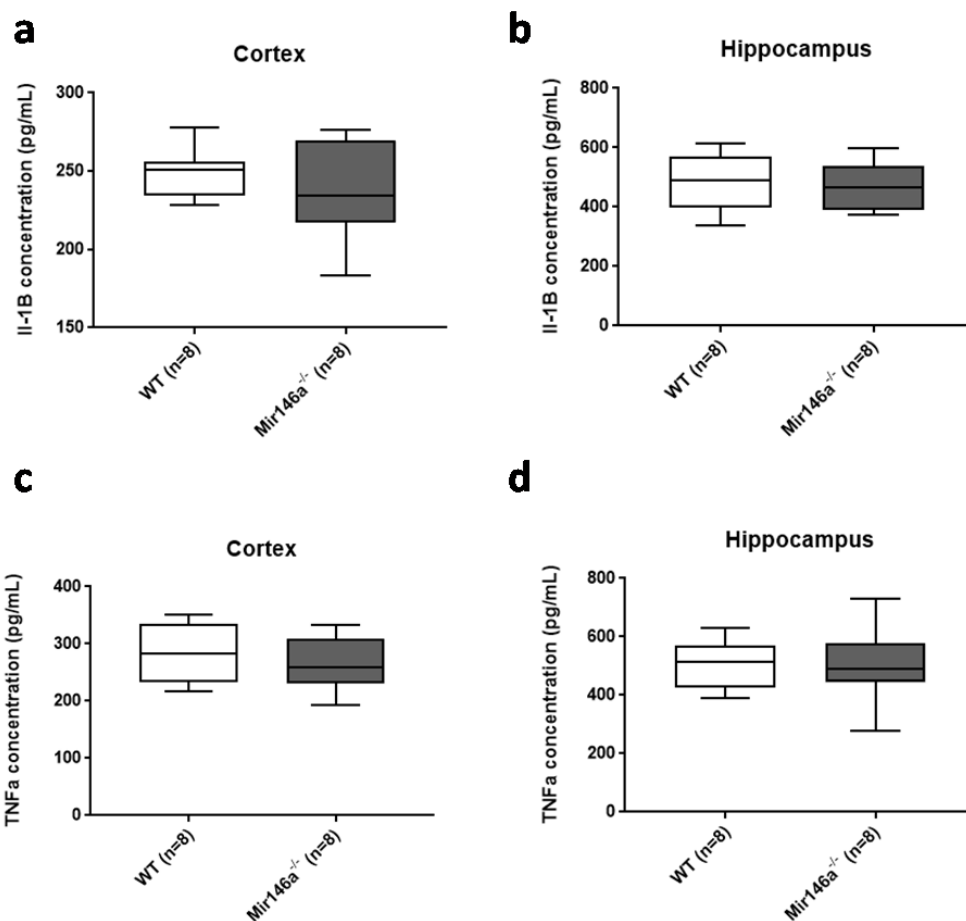


Figure S4

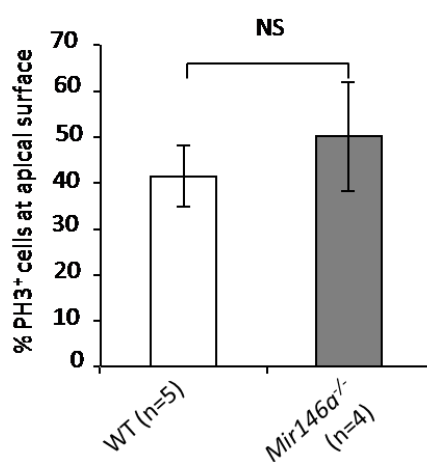


Figure S5

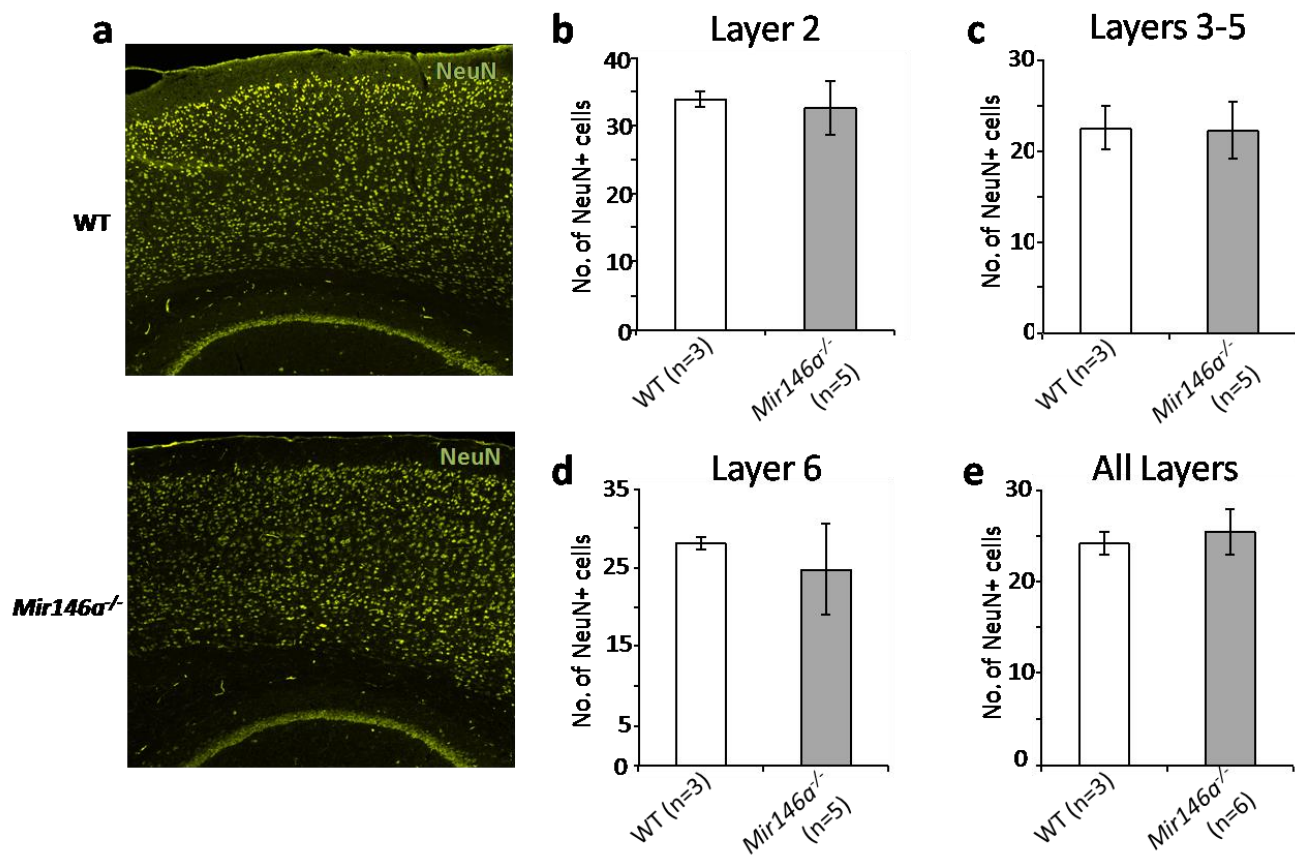


Figure S6

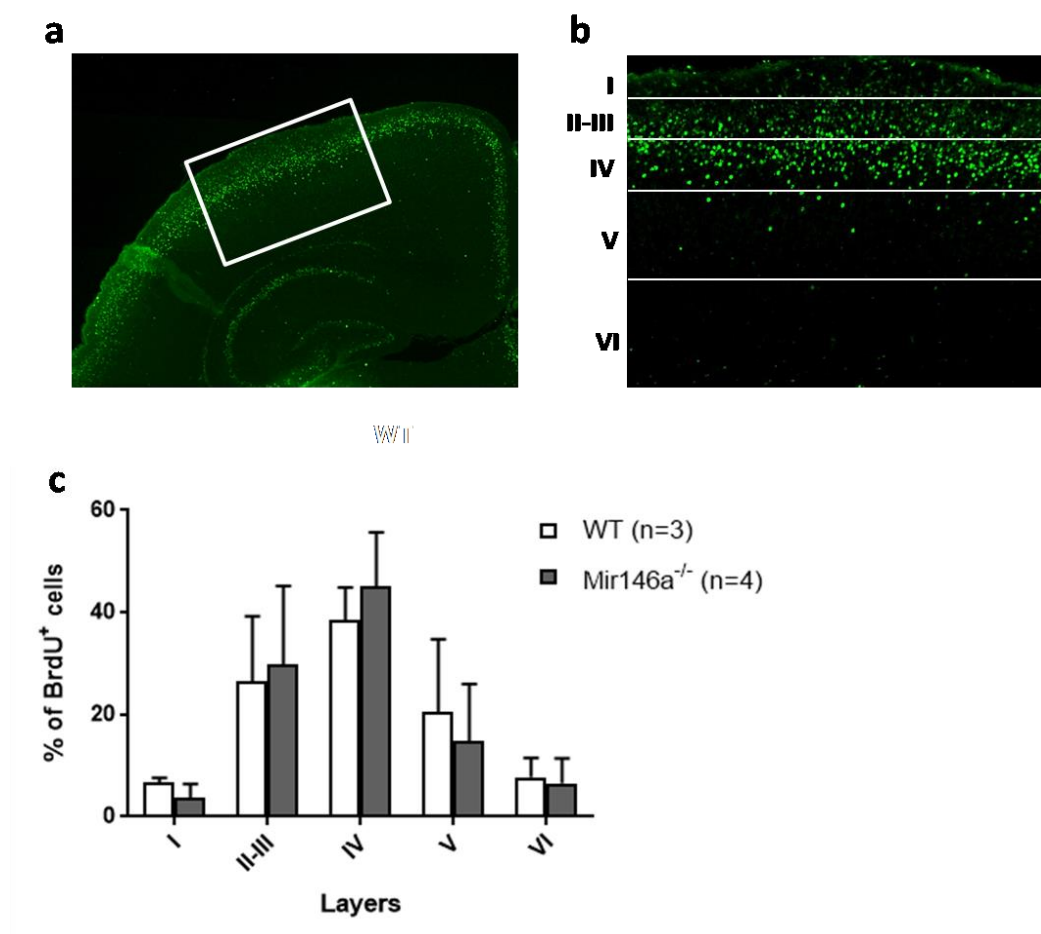


Figure S7

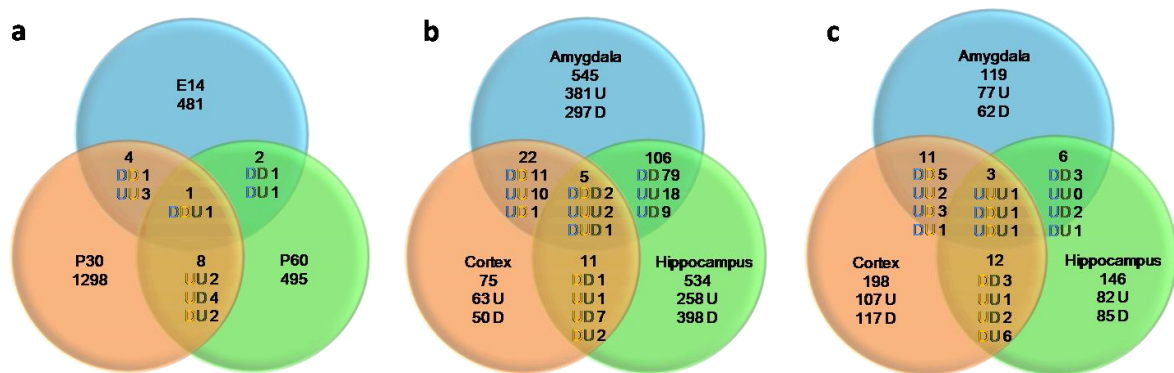


Figure S8

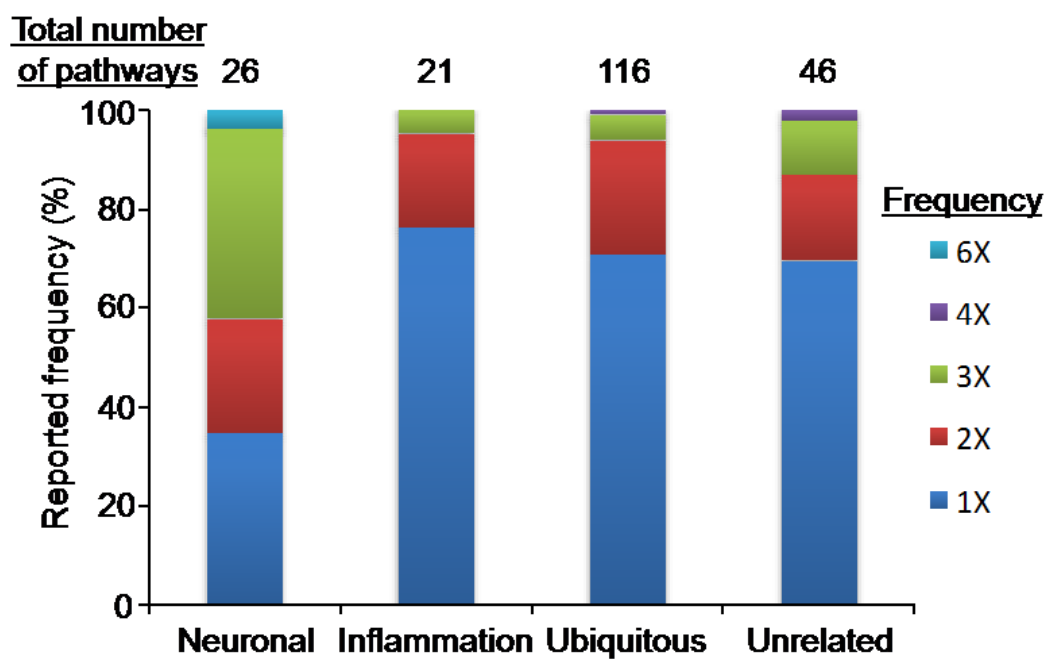


Figure S9

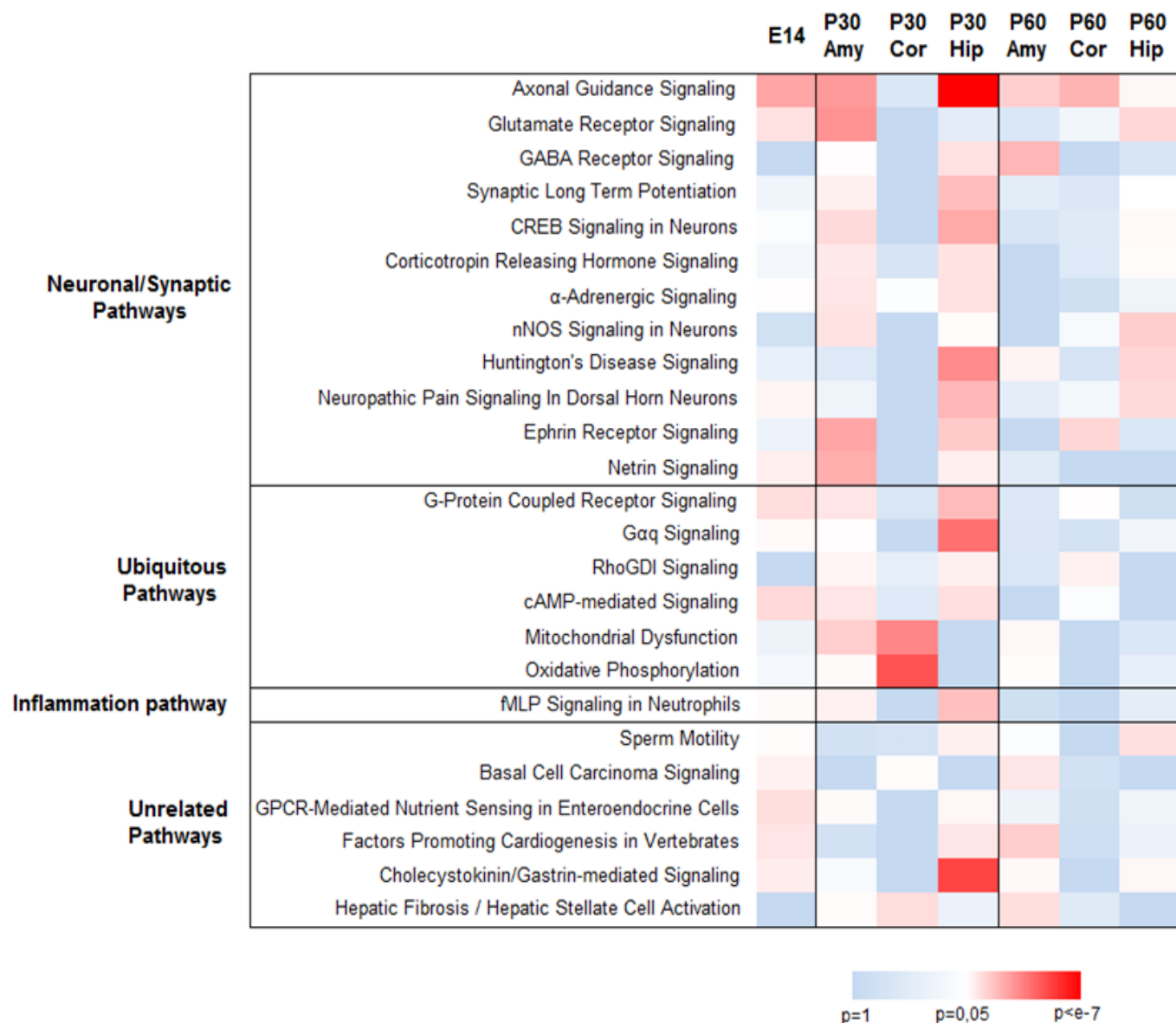


Figure S10

Augmentation de l'expression de CTNNB1 dans le néocortex des souris *Mir146a*^{-/-}

Dans cette publication, nous avons mis en évidence un défaut de neurogenèse et en particulier une augmentation du nombre d'IP et de neurones post-mitotiques dans le néocortex des souris *Mir146a*^{-/-} à E14.5. Notre hypothèse pour expliquer cette observation est qu'en l'absence de *miR146a*, NUMB est sur-exprimée et induit l'inhibition de la voie Shh. En retour, la voie Wnt/ β -caténine, antagoniste de Shh, est activée. Une étude précédente a d'ailleurs montré que la sur-expression de la protéine β -caténine (CTNNB1) dans des progéniteurs neuraux *in vitro* est suffisante pour induire leur différenciation en neurones⁹⁸.

Si nos résultats de RNAseq à E14.5 indiquent une activation globale de la voie Wnt/ β -caténine, aucune différence d'expression n'a été observée pour l'ARNm de *Ctnnb1* entre les échantillons mutants et contrôles. Cependant, la stabilité de CTNNB1 est régulée par différents facteurs. Ainsi, une altération du niveau protéique est possible même en l'absence de défaut d'expression génique. Nous avons donc testé l'expression de CTNNB1 dans le néocortex des souris *Mir146a*^{-/-} par western blot (WB). Après normalisation par la quantité totale de protéines dans chaque puits, une augmentation d'environ 25% du niveau d'expression a été observée dans les cerveaux *Mir146a*^{-/-} au cours de trois expériences indépendantes sur 4 échantillons WT et 3 mutants (Fig.21). Ces résultats supportent donc l'hypothèse d'une augmentation de la différenciation neuronale due à une augmentation de la signalisation Wnt/ β -caténine suite à l'inhibition de la voie Shh.

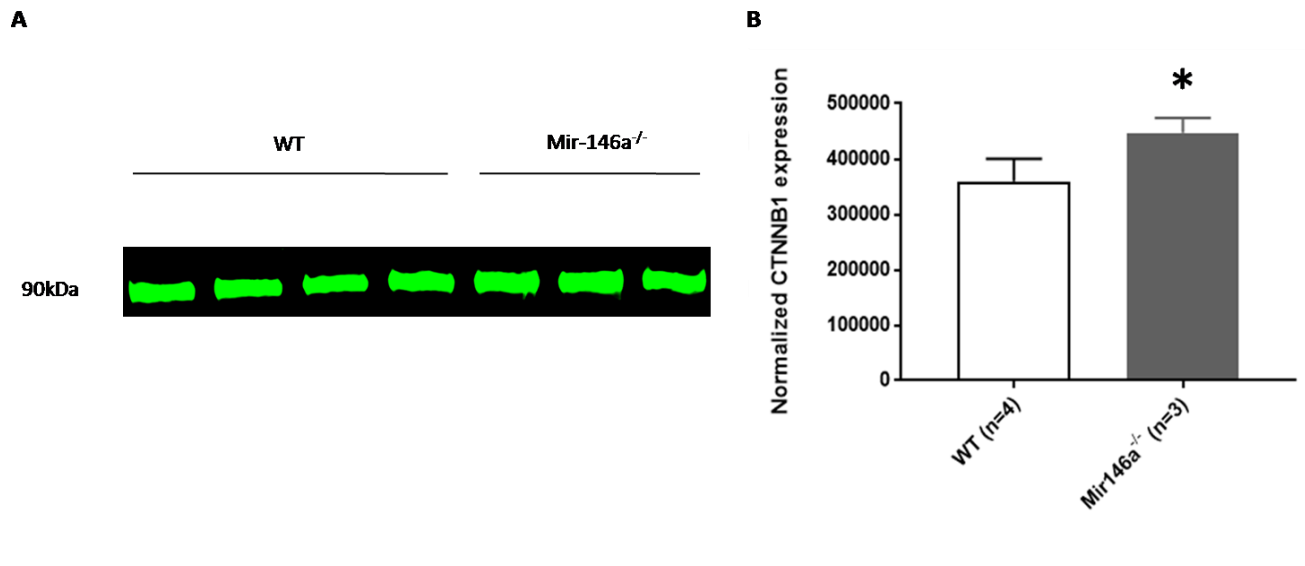


Figure 21: Mesure du niveau d'expression de CTNNB1 par WB. (A) Image de la membrane après révélation avec le système Odyssey. (B) L'histogramme représente les réplicats biologiques d'une expérience représentative de trois expériences indépendantes réalisées sur les mêmes échantillons.

III - Étude du rôle de *miR-146a* dans les astrocytes

A - Introduction

1 - Développement et fonctions de la lignée astrocytaire

Dans le cerveau embryonnaire de souris, les progéniteurs neuraux connus sous le nom cellules de glie radiaire apicale (aRG) proviennent des cellules neuroépithéliales (NE)^{89,90} et se différencient en neurones entre E11 et E17⁸⁶. Une partie de ces progéniteurs est cependant conservée tout au long de la neurogénèse avant de donner naissance aux astrocytes et aux oligodendrocytes durant la période s'étendant de la fin de la neurogénèse à quelques jours après la naissance^{86,90,92,286,287}. Ces aRG persistants sont programmés vers un destin glial dès leur naissance à E10-E11^{90,286}.

Les astrocytes sont les cellules gliales les plus abondantes et hétérogènes du système nerveux central²⁸⁷⁻²⁸⁹. Les astrocytes fibreux, interagissant avec les vaisseaux sanguins et les fibres axonales myélinisées, et les astrocytes protoplasmiques, situés au niveau de la synapse, en constituent les deux principales sous populations²⁸⁹⁻²⁹¹. En plus de leur rôle dans la formation et la stabilisation des synapses qui sera détaillé plus loin, les astrocytes régulent l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique (BHE)²⁹² et la réponse inflammatoire²⁹³, contribuent au maintien de l'intégrité tissulaire du système nerveux central^{293,294} et assurent l'homéostasie de la concentration en ions et en neurotransmetteurs²⁹⁵.

Les astrocytes ont également été incriminés dans différentes maladies. Un défaut de régulation de l'inflammation et de l'ouverture de la BHE par les astrocytes peut exacerber les dommages neurotoxiques dus à un accident vasculaire cérébral ou participer à la progression de la sclérose en plaque ou de la maladie d'Alzheimer²⁹³. Une altération des fonctions astrocytaires a également été associée à des maladies du

neurodéveloppement²⁹⁶, menant par exemple à un défaut de croissance dendritique dans les syndromes de l'X fragile²⁹⁷ et de Rett²⁹⁸. Chez la souris *Mecp2*-déficiente, modèle murin du syndrome de Rett, un défaut de capture de glutamate par les astrocytes a également été observé.²⁹⁹

2 - Interactions entre astrocytes et neurones: régulation des synapses et capture du glutamate

Un des principaux rôles des astrocytes consiste à établir et réguler la transmission synaptique^{300–303}. Les astrocytes apparaissent peu après la fin de la neurogenèse, soit au moment de la formation des premières synapses³⁰³. *In vitro*, la présence d'astrocytes promeut la formation de synapses entre neurones immatures et augmente l'activité synaptique^{304,305}. *In vivo*, l'absence d'astrocytes cause une rapide neurodégénérescence^{306,307}. Les astrocytes sécrètent de nombreux facteurs ayant chacun un rôle dans la régulation de l'activité synaptique³⁰³. Par exemple, le tumornecrosis factor α (TNF α) induit le recrutement des récepteurs AMPA (AMPA α s)³⁰⁸ tandis que la protéine SPARC inhibe la formation de synapses glutamatergiques³⁰⁹.

Les astrocytes sont également en charge de capturer les neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique et de les recycler. Le glutamate, le neurotransmetteur exciteur le plus abondant, est neurotoxique à forte concentration et la majorité du glutamate libéré par les neurones est recyclé par les astrocytes^{303,307,310}. Les deux principaux transporteurs de glutamate astrocytaires, exprimés de façon ubiquitaire dans le SNC, sont GLT-1 et GLAST^{310,311} codés par les gènes *Slc1a2* et *Slc1a3* respectivement. Cependant, GLT-1 est plus fortement exprimé *in vivo* et rend compte de 95% de la capture du glutamate^{312,313}.

De nombreux modèles murins ont été développés pour étudier plus en détails le rôle des transporteurs de glutamate³¹¹. Si l'inactivation complète de *Slc1a2* cause des crises d'épilepsie spontanées et létales^{314,315}, l'absence de GLAST engendre un phénotype moins sévère se limitant principalement à un défaut de coordination³¹⁶. Chez l'homme,

SLC1A2a également été associé à plusieurs maladies neurologiques telles que la sclérose latérale amyotrophique³¹⁷, les maladies de Parkinson^{318,319} et d'Alzheimer³²⁰ ou la schizophrénie³²¹. Il a également été incriminé dans des maladies développementales comme le syndrome de l'X fragile³²² ou le TSA^{323,324}.

3 - *miR-146a* et astrocytes : objectifs

Dans les astrocytes, *miR-146a* est un régulateur négatif de la réponse inflammatoire via le contrôle de l'expression des gènes *IRAK-1* et *-2*, *IL-6* et *TRAF6*³²⁵. Cependant, la modulation de l'expression de *miR-146a* altère également la sécrétion du $\text{TNF}\alpha$ ³²⁵, un facteur important de la transmission synaptique excitatrice³⁰⁸. De plus, *Slc1a2*, le gène codant le principal transporteur de glutamate, est une cible prédite de *miR-146a* chez l'homme et la souris.

Collectivement, ces données suggèrent un possible rôle du *miR-146a* dans la régulation de l'activité synaptique et du cycle du glutamate dans les astrocytes. Nous avons donc testé les propriétés de prolifération et de capture de glutamate d'astrocytes primaires de souris en culture soit infectés avec un virus sur-exprimant *miR-146a* soit provenant de souris *Mir146a*^{-/-}.

B - Résultats

1 - La sur-expression de *miR-146a* altère la prolifération et la capture du glutamate des astrocytes

Les astrocytes primaires de souris obtenus à partir de cortex total au jour post-natal 1 (P1) ont été infectés par un lentivirus contenant un plasmide vide (empty vector) ou un lentivirus sur-exprimant le *miR-146a* (p-lenti 146a). Après 24h, le niveau d'expression de *miR-146a* était environ 6 fois plus important dans les astrocytes infectés avec le p-lenti 146a comparé au vecteur vide (Fig.22A). La quantité d'astrocytes étant directement proportionnelle au nombre de synapses actives³⁰³⁻³⁰⁵, nous avons commencé par tester si la sur-expression de *miR-146a* affectait leur prolifération. Nous avons fait trois expériences indépendantes en utilisant le système Xcelligence qui se base sur l'impédance de chaque puits pour calculer la surface occupée par les cellules. Nous avons ainsi démontré que les astrocytes infectés avec le p-lenti 146a avaient une capacité de prolifération moindre et que ce défaut se maintenait pendant plus de 5 jours en culture (Fig.22B,C).

Ensuite, nous avons voulu déterminer si la sur-expression de *miR-146a* avait un effet sur la capacité des astrocytes modifiés à capturer le glutamate. En incubant les astrocytes dans du milieu de culture contenant du glutamate radiomarqué au tritium (H^3), nous avons déterminé la capacité des astrocytes à capturer le glutamate. Lors de trois expériences indépendantes, nous avons mesuré les coups par minute (cpm) après 30min d'incubation avec du glutamate tritié avec ou sans L-*trans*-2,4-PDC (PDC), un bloqueur ubiquitaire de tous les transporteurs de glutamate. Les cpm obtenues après blocage par le PDC et la quantité totale de protéines dans chaque puits nous ont servi de facteurs de normalisation. Par ces expériences, nous avons montré une augmentation d'environ 50% de la quantité de glutamate capturé par les astrocytes infectés avec le p-lenti 146a comparé aux contrôles (Fig.22D).

Ces résultats préliminaires supportant l'hypothèse d'un possible rôle du *miR-146a* dans la capture du glutamate, nous avons poursuivi l'analyse du rôle de ce miARN en

étudiant des astrocytes *Mir146a*^{-/-}.

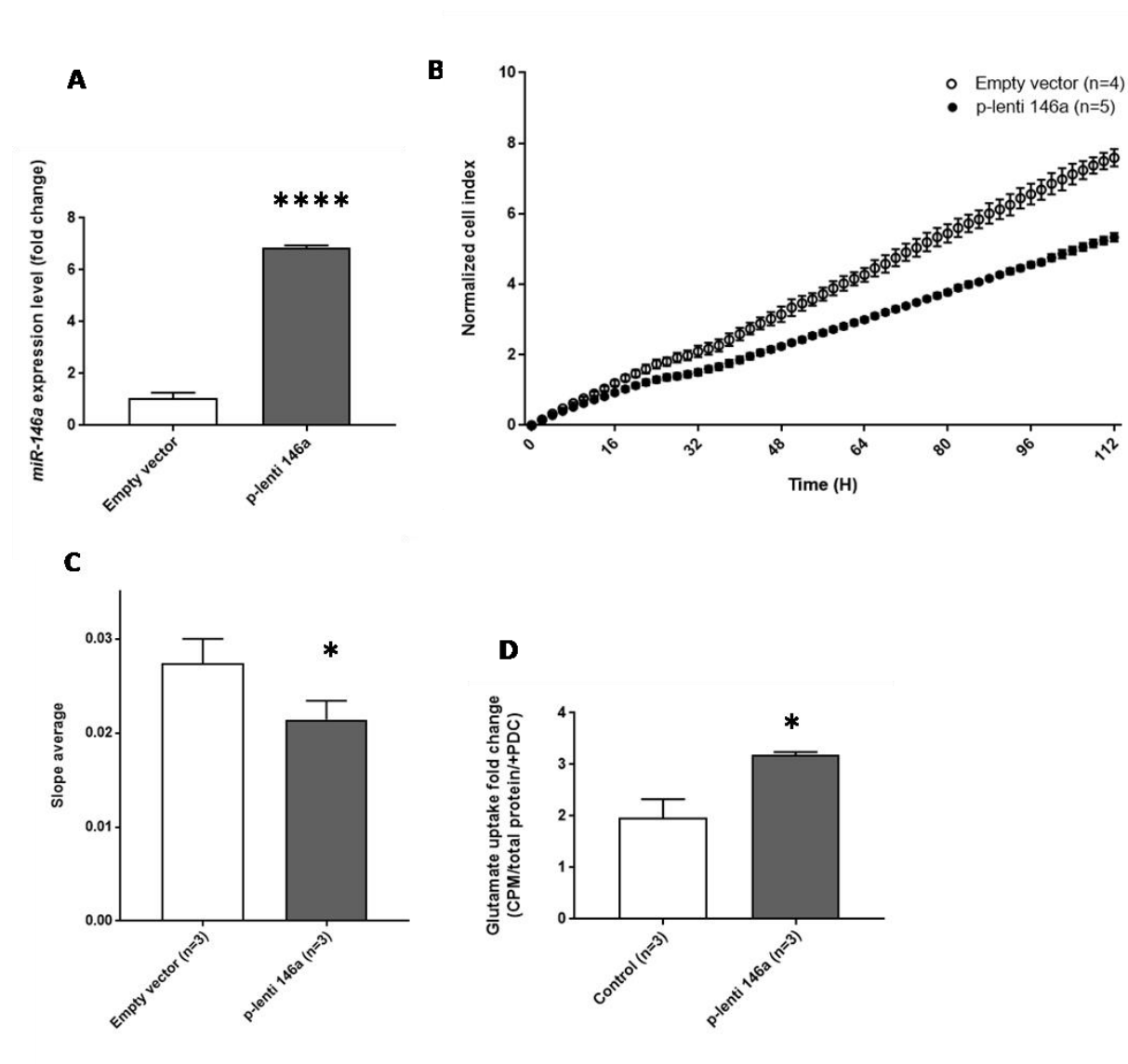


Figure 22: Défauts de prolifération et de capture du glutamate dus à la sur-expression de *miR-146a*. (A) Niveau d'expression de *miR-146a* dans des astrocytes contrôles ou infectés avec le p-lenti 146a. Quantification faite par Taqman microRNA assay 24h après infection des astrocytes primaires. (B,C) Mesure de la vitesse de prolifération des astrocytes. La courbe (B) représente la mesure de l'impédance pendant 5 jours d'une seule expérience représentative de toutes tandis que l'histogramme (C) montre la moyenne des pentes de trois expériences indépendantes. (D) Mesure de la capacité des astrocytes à incorporer le glutamate radioactif. L'histogramme représente l'augmentation de la capture de glutamate après normalisation par la quantité totale de protéines et les cpm après blocage des transporteurs de glutamate par le PDC.

2 - Les astrocytes *Mir146a*^{-/-} arborent un défaut de prolifération et une anomalie de leur capacité de capture du glutamate GLT-1-dépendante

Chez l'adulte, et dans les conditions physiologiques normales, les astrocytes sont des cellules immobiles, de forme étoilée sans orientation privilégiée. L'apparition d'un site d'inflammation, à la suite d'une maladie ou d'une lésion du système nerveux, entraîne une réaction appelée gliose réactive. La libération de facteurs inflammatoires provoque notamment une réorientation des astrocytes qui migrent alors en direction du site lésé jusqu'à former une cicatrice gliale^{293,294}. Nous avons donc testé l'effet d'une absence de *miR-146a* sur les propriétés de migration des astrocytes. Pour ce faire, nous avons utilisé le système Incucyte, un système de vidéomicroscopie pour les cellules en culture. Une fois les astrocytes à confluence, nous les avons traité avec un agent anti-mitotique, la cytosine- β -D arabinofuranoside (ARAC), afin que le défaut de prolifération ne perturbe pas l'interprétation des résultats. Puis nous avons réalisé une blessure au centre de chaque puits et enregistré la progression des astrocytes et la fermeture de la blessure grâce à des photos prises toutes les heures pendant 48h. Aucune différence dans la capacité de migration n'a été observée entre les astrocytes *Mir146a*^{-/-} et les wild type (WT)(Fig.23A,B).

Nous avons ensuite voulu tester si les astrocytes *Mir146a*^{-/-} arboraient les mêmes défauts de prolifération et de capture de glutamate que ceux sur-exprimant le miARN. Trois expériences indépendantes ont été réalisées comme précédemment sur le système Xcelligence, ce qui nous a permis de montrer un défaut persistant de prolifération des astrocytes *Mir146a*^{-/-} (Fig.23C,D).

En reproduisant les mêmes expériences que précédemment avec le glutamate tritié et le bloqueur ubiquitaire PDC, aucune différence n'a pu être observée dans la capture du glutamate entre astrocytes WT et *Mir146a*^{-/-} (Fig.24A). Afin d'analyser plus finement le

transport du glutamate, nous avons répété ces expériences en utilisant soit un bloqueur spécifique de GLAST (UCPH101) soit un bloqueur spécifique de GLT-1 (WAY213613). Après avoir ajouté le WAY213613, GLAST était le seul transporteur encore actif et, comme avec le PDC, aucun défaut de recapture de glutamate n'a été observé (Fig.24B). Cependant, en bloquant uniquement GLAST, les astrocytes *Mir146a*^{-/-} ont incorporé significativement plus de glutamate que les WT, suggérant une défaut de capture de glutamate spécifique de GLT-1 (Fig.24C,D).

GLT-1 étant une cible prédite de *miR-146a*, son expression pourrait être augmentée dans les astrocytes *Mir146a*^{-/-}, ce qui expliquerait les résultats précédents. Nous avons donc cloné la région du 3'UTR de *Slc1a2* contenant deux sites de fixation prédits de *miR-146a* (Fig.25A) dans le plasmide Psichex2 exprimant la luciférase puis nous avons co-transfecté des cellules HEK293T avec ce plasmide et le *miR-146a*. Le plasmide Psichex 2 exprime deux types de luciférase : la Renilla, fusionnée au 3'UTR de *Slc1a2* et la Firefly, indépendante du niveau d'expression de GLT-1 qui sert de facteur de normalisation. Au cours de trois expériences indépendantes, nous avons observé une diminution du ratio Renilla/Firefly en présence de *miR-146a*, confirmant que GLT-1 est bien une cible directe de *miR-146a* (Fig.25B). Le 3'UTR de *Slc1a2* contient deux sites possibles de fixation pour *miR-146a*. Afin de déterminer si les deux sites étaient fonctionnels, nous les avons inactivé par mutagenèse dirigée avant de réitérer les tests de luciférase. Si la mutation du site de fixation prédit le plus distal ne semble pas changer les résultats obtenus avec le 3'UTR sauvage (Fig.25D), la mutation du site proximal (Fig.25C) et la double mutation des deux sites (Fig.25E) abrogent l'effet de *miR-146a* sur le niveau d'expression de la luciférase.

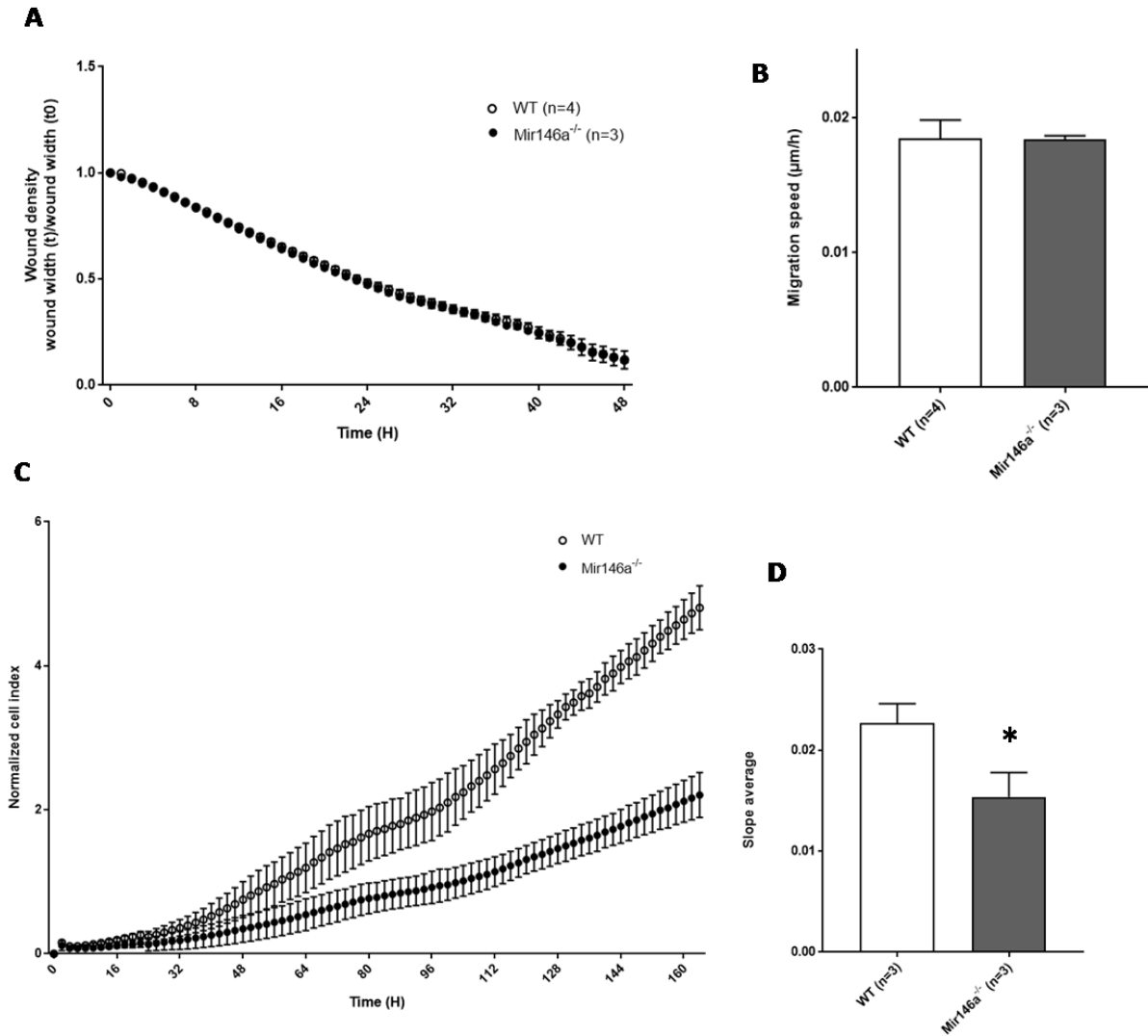


Figure 23: Défaut de prolifération mais pas de migration des astrocytes *Mir146a*^{-/-}. (A,B) Mesure de la vitesse de migration des astrocytes. La courbe (A) représente la fermeture de la blessure au cours du temps et l'histogramme (B) montre la vitesse de migration des astrocytes en μm/h. (C,D) Mesure de la vitesse de prolifération des astrocytes. La courbe (C) représente la mesure de l'impédance pendant 6 jours d'une seule expérience représentative de toutes tandis que l'histogramme (D) montre la moyenne des pentes de trois expériences indépendantes.

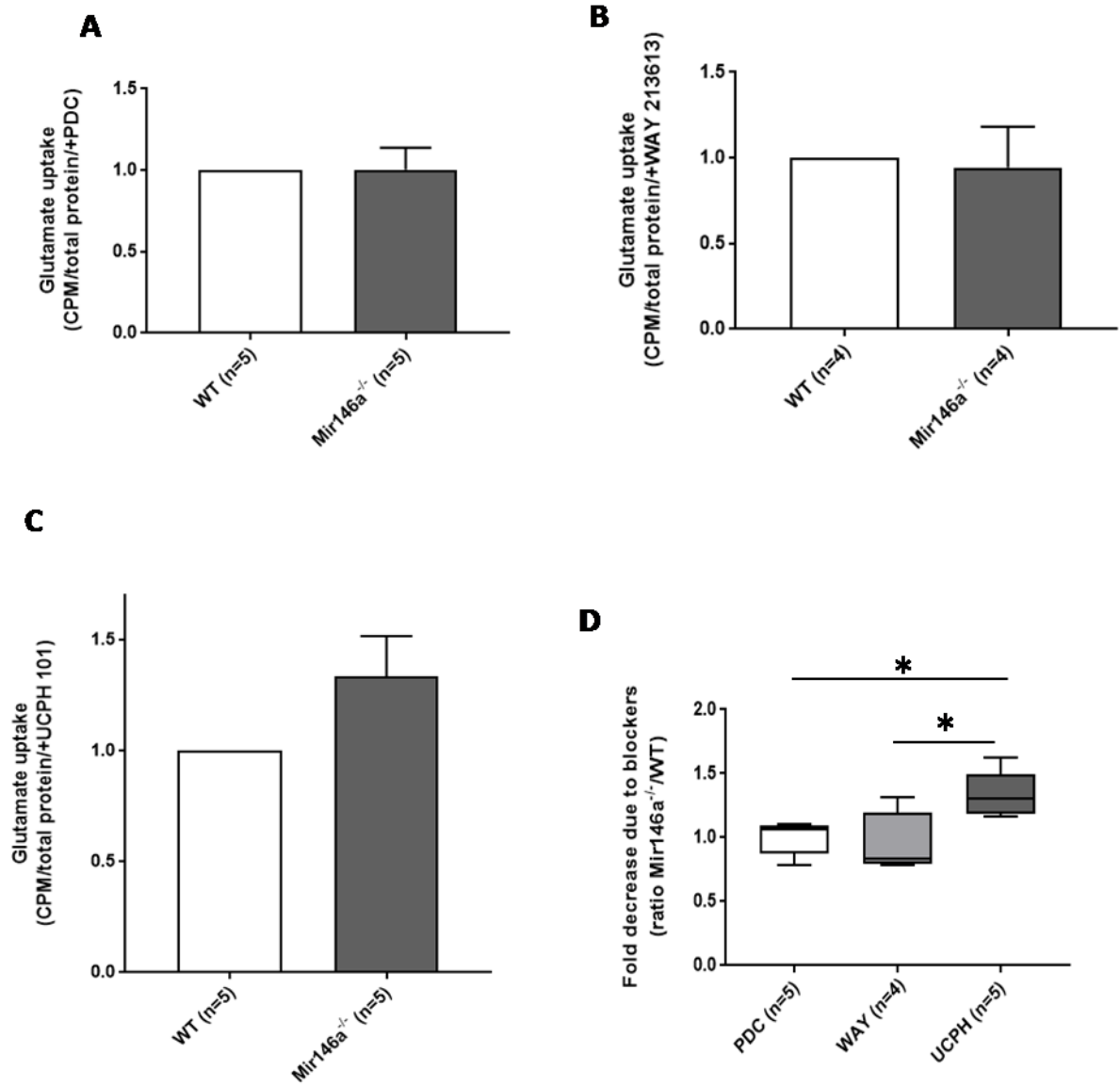


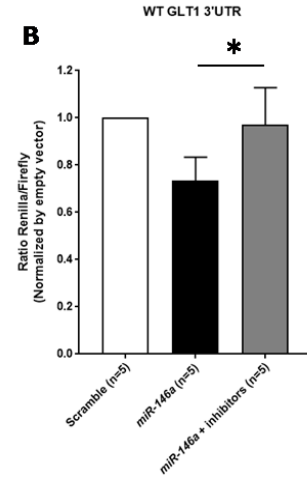
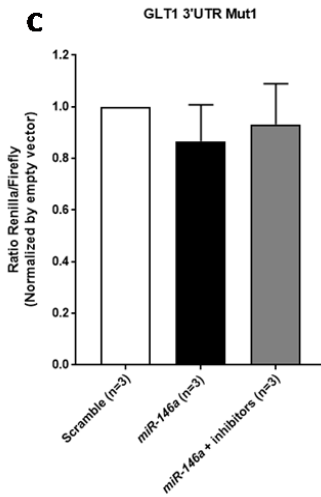
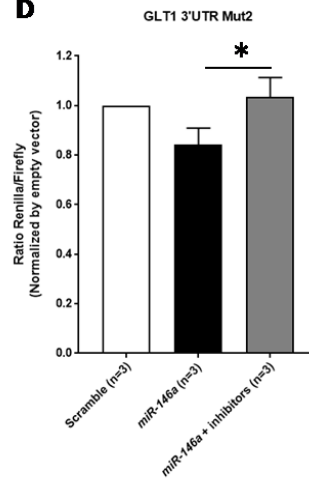
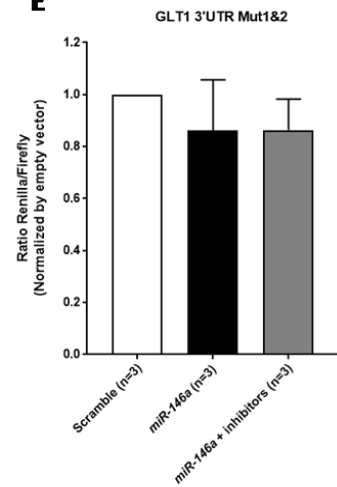
Figure 24: Défaut de capture du glutamate GLT-1-dépendante. (A,B,C) Les histogrammes représentent la mesure de la recapture de glutamate après normalisation par la quantité totale de protéines et les cpm après blocage de (A) des deux transporteurs de glutamate GLT-1 et GLAST par le PDC, (B) GLT-1 seulement avec le WAY213613 ou (C) GLAST uniquement avec le UCPH101. Ces valeurs ont ensuite été normalisées par les résultats obtenus avec les astrocytes WT.(D) Le boxplot représente le ratio Mir146a^{-/-}/WT des valeurs obtenues en A,B et C afin de

A

Slc1a2 site 1 5' UGAUUUCAUUAGAAAGUUCUCC 3'

miR-146a 3' UUGGGUACCUUAAGUCAAGAGU 5'

Slc1a2 site 2 5' CAAACAGAUCCCUAAGUUCUCU 3'

B**C****D****E**

comparer l'effet des différents bloqueurs.

Figure 25: GLT-1 est une cible directe de *miR-146a*. (A) Séquences de *miR-146a* et des deux sites de fixation prédits du 3'UTR de *Slc1a2*. Le cadre rouge entoure la région seed du miARN ainsi que les sites de fixations de l'ARNm (B-E) Les histogrammes représentent le ratio Renilla/Firefly après normalisation par la valeur obtenue avec le vecteur vide dans les conditions suivantes : (B) 3'UTR de *Slc1a2* sauvage, (C) premier site de fixation muté, (D) second site de fixation muté et (E) double mutation des sites de fixation. Les tests statistiques sont effectués entre la condition test (*miR-146a*) et la condition de sauvetage (*miR-146a* + inhibiteurs de *miR-146a*).

C - Conclusion

La sur-expression de *miR-146a* induit une diminution de la prolifération de astrocytes ainsi qu'une augmentation de 50% de la capacité de capture du glutamate. De façon similaire, nous avons observé une baisse de prolifération des astrocytes *Mir146a*^{-/-} et une altération de leurs capacités de capture du glutamate. Cependant, les mécanismes sous-jacents sont probablement différents. Dans le cas des astrocytes sur-exprimant *miR-146a*, le défaut de capture de glutamate ne semble pas être dépendant d'un transporteur en particulier tandis que dans les astrocytes *Mir146a*^{-/-} il est spécifique de GLT-1.

En utilisant la luciférase comme gène rapporteur, nous avons montré pour la première fois que *Slc1a2*, codant GLT-1, est une cible directe de *miR-146a*. Les analyses par mutagenèse dirigée démontrent qu'un seul des deux sites de fixation prédit du miARN est fonctionnel. Les deux sites de fixation ayant la même séquence et montrant tous les deux une complémentarité parfaite avec la région seed de *miR-146a* (Fig.25A), ils devraient être ciblés par le miARN avec la même efficacité. Les deux sites étant distants d'environ 1 kilobase (kb) d'écart, nous proposons que la différence observée entre les deux sites soit due à la conformation de l'ARNm qui empêcherait l'appariement du miARN au site distal. Une étude publiée en 2014 suggère en effet que la séquence entourant le site de fixation de l'ARNm peut avoir un impact sur la capacité d'appariement du miARN³²⁶.

Le défaut de capture de glutamate supporte l'hypothèse du rôle de *miR-146a* dans la régulation de la transmission synaptique et soulève la question du rôle éventuel de ce miR dans la formation des synapses. Ces dernières années, la voie de signalisation du TGF- β a été caractérisée comme principal facteur responsable de la croissance dendritique et de la synaptogenèse astrocyte-dépendantes chez l'homme et la souris^{327,328}. Or, les principaux acteurs de cette voie, les protéines TRAF6 et SMAD2-4, sont des cibles directes de *miR-146a*^{247,265,329,330}, suggérant un possible rôle de *miR-146a* dans la

synaptogenèse. Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser des expériences *ex-vivo* de co-cultures d'astrocytes et de neurones WT ou *Mir146a*^{-/-} et d'évaluer l'effet des différents génotypes sur la croissance dendritiques de neurones.

Il est également intéressant de noter que les propriétés migratoires des astrocytes mutants ne sont pas affectées. Cette observation suggère que l'absence de *miR-146a* n'altère ni leur mouvement en conditions physiologiques ni leur capacité à migrer vers les zones endommagées afin de déclencher la réparation du tissu.

Si mes travaux n'ont pas abordé le rôle de *miR-146a* sur les autres fonctions astrocytaires telles que le contrôle du flux sanguin ou de l'homéostasie des ions et du pH extracellulaire, la littérature fournit des éléments d'informations. Ainsi, *miR-146a* a été identifié comme inhibant la signalisation des facteurs de croissance vasculaires épithéliaux (VEGF) dans le carcinome hépatocellulaire³³¹ et les cellules endothéliales de la rétine³³² via son action sur la voie NFκB. Or, la régulation de l'ouverture de la BHE par les astrocytes est principalement médiée par la voie de signalisation (VEGF)²⁹². La voie NFκB constitue également un des principaux effecteurs de la réponse inflammatoire astrocyte-dépendante et l'effet de *miR-146a* sur cette voie a été clairement établi³²⁵. L'absence de *miR-146a* pourrait donc altérer la capacité des astrocytes à assurer les échanges vasculaires et à maintenir l'intégrité tissulaire du SNC.

Prises ensemble, ces données suggèrent que si le rôle de *miR-146a* dans les astrocytes s'exerce principalement au niveau de leur action modulatrice de la neurotransmission, il est probable que l'absence de ce miARN conduise également à des défauts de la synaptogenèse, des échanges vasculaires ou de la réponse inflammatoire.

DISCUSSION

1 - Bilan des travaux de thèse

Mes travaux de thèse ont permis de montrer que *miR-146a* est le miARN le plus fréquemment dérégulé dans les TSA. Nous avons également décrit pour la première fois l'effet pro-neurogénique de *miR-146a* dans des cultures de progéniteurs neuronaux humains H9. La majeure partie de mon travail a consisté à caractériser le modèle *Mir146a*^{-/-}. Via diverses approches, j'ai décrit dans ces souris une altération de la neurogenèse ainsi que de la prolifération et de la capture de glutamate des astrocytes, un défaut neuro-anatomique de l'hippocampe et une diminution des capacités d'apprentissage et de mémorisation. Outre leurs intérêts pour mieux comprendre le rôle de *miR-146a* dans le neurodéveloppement, mes résultats démontrent également que la souris *Mir146a*^{-/-} est un modèle pertinent pour étudier les MND.

2 - Comparaison des effets de la sur-expression et de l'inactivation de *miR-146a*

Pendant ma thèse, j'ai utilisé différents modèles afin d'étudier le rôle de *miR-146a* dans le neurodéveloppement. J'ai notamment démontré que la sur-expression et l'inactivation de ce miARN avaient des conséquences similaires bien que médiées par des mécanismes moléculaires différents.

La sur-expression de *miR-146a* dans les progéniteurs humains H9 induit un arrêt du cycle cellulaire résultant en une différenciation en neurones accélérée accompagnée d'une augmentation de la croissance dendritique. Cet arrêt est médié par l'inhibition de gènes importants pour la progression du cycle cellulaire tels que *CHECK1*, *BRCA1* ou encore *CDK1* qui sont des cibles de *miR-146a*. A l'inverse, les aRG de la souris *Mir146a*^{-/-} ne semblent pas montrer de défaut de prolifération et aucun enrichissement de gènes liés au cycle cellulaire n'a été observé dans les données issues des expériences de RNAseq réalisées à E14.5. En revanche, plusieurs facteurs de différenciation neuronale tels que

Neurod2 et *Foxg1* et marqueurs de neurones post-mitotiques tels que *Tbr1* et *Satb2* sont surexprimés dans le néocortex des souris *Mir146a*^{-/-}. De plus, une augmentation du nombre d'IP, une diminution du nombre d'aRG ainsi qu'un épaissement de la couche de cellules NeuN⁺ ont été observés à E14.5. Ces résultats suggèrent que la différenciation neuronale est accélérée chez les souris mutantes de façon similaire à ce qui est observé lorsque *miR-146a* est sur-exprimé dans les cellules H9.

De manière remarquable, la même similitude est observée lorsque l'on s'intéresse à l'effet d'une anomalie d'expression de *miR-146a* sur les fonctions astrocytaires. En effet, l'inactivation comme la sur-expression de *miR-146a* sont responsables d'une diminution de la prolifération des astrocytes et d'une augmentation de leurs capacités de capture du glutamate. Si peu d'explorations moléculaires ont été effectuées sur ces modèles cellulaires, le fait que le défaut de capture de glutamate des astrocytes *Mir146a*^{-/-} soit GLT-1-dépendant tandis qu'il ne semble pas avoir de spécificité dans le modèle de sur-expression suggère que des mécanismes différents sont impliqués.

Enfin, cela se vérifie également au niveau des modèles murins. À partir de 6-8 mois, les souris inactivées pour *miR-146a* développent des symptômes de maladies auto-immunes tels qu'une splénomégalie, une inflammation de nombreux organes accompagnée d'infiltrations de lymphocytes ou des tumeurs dans les organes lymphoïdes secondaires²⁷⁷. Les souris transgéniques sur-exprimant *miR-146a* présentent dès l'âge de 3 semaines les symptômes d'un syndrome lymphoprolifératif auto-immun (splénomégalie, lymphadénopathie, infiltrations de monocytes dans le foie et les poumons et prolifération accrue des lymphocytes T notamment) probablement causés par l'inhibition de la protéine FAS, une des cibles de *miR-146a*²⁸⁵. Les deux modèles partagent donc certains symptômes bien que les présentations ne soient pas identiques, notamment au niveau de l'âge de survenue de la maladie. Collectivement, nos résultats montrent une convergence de l'effet de la dérégulation de *miR-146a*, que ce soit au niveau des cellules en culture ou de l'organisme entier.

Il est important de noter que d'autres cas similaires sont rapportés dans la littérature. Par exemple, l'inactivation et la sur-expression de *miR-126* ont pour conséquence de promouvoir la leucémogénèse par des mécanismes différents³³³. Les

auteurs de cette étude décrivent néanmoins la sur-expression de *miR-126* comme ayant un effet plus important sur la progression tumorale tandis que son inactivation sensibilise les cellules cancéreuses à la chimiothérapie. Ces observations démontrent que, même si une convergence fonctionnelle est observée entre la sur-expression et l'inactivation d'un miARN, les mécanismes impliqués dans les deux types de dérégulation sont importants à étudier.

3 - Modèles à développer afin de poursuivre l'étude des fonctions de *miR-146a* dans le neurodéveloppement

Le modèle souris *Mir146a*^{-/-} nous a permis de mieux comprendre le rôle de *miR-146a* dans le neurodéveloppement et de confirmer sa pertinence pour l'étude des MND. Cependant, l'anomalie observée chez les patients est une sur-expression de *miR-146a* et donc vraisemblablement un gain de fonction et non une perte de fonction. Même si nos résultats suggèrent que perte et gain de fonction de ce miARN puissent avoir des conséquences similaires, l'étude d'un modèle *in vivo* sur-exprimant *miR-146a* s'avère nécessaire afin de mieux comprendre son implication dans la survenue des MND.

Une lignée de souris transgénique sur-exprimant *miR-146a* de façon constitutive a été publiée en 2013 par le groupe chinois de Yuzhang WU. Contrairement aux souris *Mir146a*^{-/-} dont les premiers symptômes n'apparaissent qu'à l'âge de 6 mois, comme indiqué ci-dessus, les animaux transgéniques développent des défauts sévères dès 3 semaines de vie. Si le groupe ayant développé ce modèle ne rapporte aucune observation de mort prématurée de ces animaux, la sévérité de leurs symptômes est peu compatible avec des études de comportement. Ces animaux pourraient cependant être très utiles pour analyser les étapes précoces du développement cérébral. Malheureusement, et malgré plusieurs tentatives, cette équipe n'a jamais répondu positivement à nos propositions de collaboration.

Nous avons donc entrepris dès le début de ma thèse, et en partenariat avec la compagnie Genoway, de créer un modèle transgénique sur-exprimant *miR-146a* de façon conditionnelle grâce au système Cre/Lox. Notre objectif était de sur-exprimer *miR-146a* de façon cellule-spécifique en croisant cette lignée transgénique avec des lignées exprimant la recombinaise Cre dans différent types cellulaires : NeuN-Cre, GFAP-Cre et NESTIN-Cre afin d'étudier l'effet de la sur-expression de *miR-146a* dans les neurones, les astrocytes et les progéniteurs neuraux respectivement.

Des cellules souches embryonnaires ayant intégré notre construction ont été injectées dans des blastocystes. Plusieurs mâles avec un taux de chimérisme supérieur à 50% ont été obtenus et ont donné naissance à plus de 100 nouveaux nés. Malheureusement, toute la descendance des animaux chimères était WT. Nous avons effectué plusieurs tests et démontré que les cellules souches embryonnaires ayant intégré notre construction avait un niveau d'expression de *miR-146a* plus élevé que les contrôles bien qu'en l'absence de la recombinaise Cre notre construction est supposée être inerte. De telles "fuites" d'expression ont déjà été rapportées dans la littérature³³⁴. Il est donc possible que l'expression anormale de *miR-146a* altère la différenciation des cellules souches, prévenant le développement de souris transgéniques. L'utilisation d'une différente cassette STOP notamment pourrait empêcher l'expression de *miR-146a* en l'absence de recombinaise Cre et permettre la génération du modèle transgénique. D'autres stratégies sont également envisageables comme l'utilisation de la technologie CRISPR/CAS9.

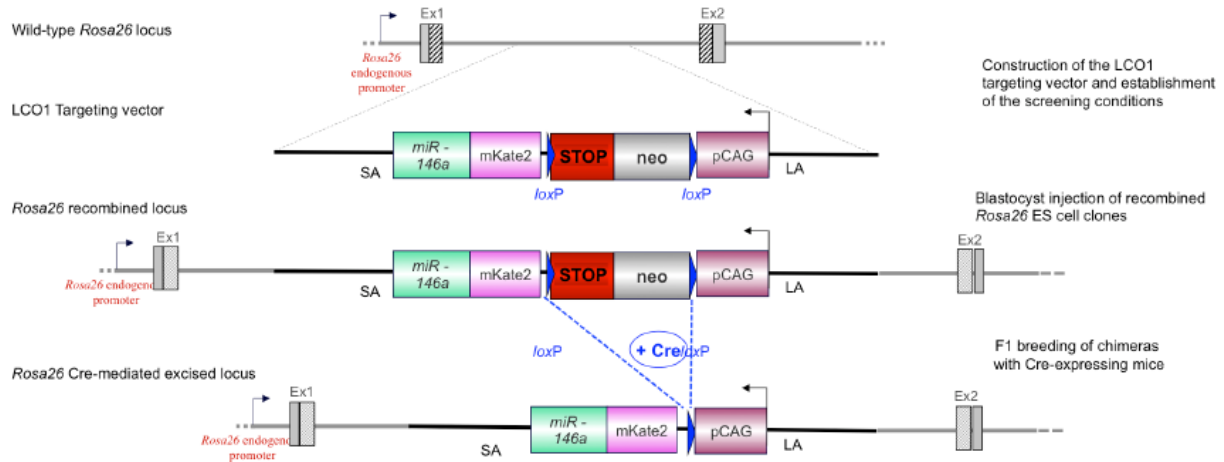


Figure 26: Stratégie d'insertion afin de créer une souris transgénique conditionnelle sur-exprimant *miR-146a*.

Notre groupe a montré que la sur-expression et l'inactivation de *miR-146a* causent un défaut de croissance dendritique dans les neurones d'une part et une augmentation de la capture de glutamate par les astrocytes notamment via un défaut de transport GLT-1-dépendant dans les astrocytes *Mir146a*^{-/-} d'autre part. Or, les neurones et les astrocytes sont deux types cellulaires interdépendants. Les astrocytes participent à la synaptogenèse, à l'élongation des dendrites et jouent un rôle clé dans la transmission synaptique. De même, les neurones influent sur les fonctions astrocytaires. Par exemple, *Slc1a2* codant GLT-1 est plus fortement exprimé que *Slc1a3* codant GLAST et rend compte de 95% de la capture du glutamate *in vivo* mais son expression est fortement diminuée dans les astrocytes en culture à cause de l'absence de certains facteurs neuronaux tels que le facteur de transcription KBBP³³⁵. Il serait donc intéressant de répéter les mêmes expériences en réalisant des co-cultures de neurones et astrocytes afin de reproduire des conditions expérimentales plus proches du contexte physiologique du SNC. Ainsi, en inactivant ou sur-exprimant *miR-146a* dans les neurones, les astrocytes ou les deux types cellulaires simultanément, nous pourrions déterminer quelles associations restaurent ou exacerbent les phénotypes observés.

Les souris *Mir146a*^{-/-} nous ont néanmoins permis de réaliser une étude pionnière et nous sommes parmi les premiers à avoir caractérisé un modèle murin inactivé pour un miARN dans le contexte du neurodéveloppement. En utilisant ce modèle *in vivo*, nous avons pu non seulement identifier un défaut de neurodéveloppement embryonnaire dû à la perte de *miR-146a* mais aussi en décrire les conséquences à différents stades de développement, y compris chez l'adulte.

4 - La perte de *miR-146a* cause un défaut transitoire prévenant la formation de circuits neuronaux fonctionnels

La caractérisation du modèle murin *Mir146a*^{-/-} nous a permis d'identifier une altération de la neurogenèse dans le néocortex à E14.5 et notamment une augmentation du nombre de neurones post-mitotiques. Afin de déterminer si ce défaut persistait dans le temps, j'ai effectué un immuno-marquage avec un anticorps anti-NeuN dans des cerveaux à P30 et P60. Le comptage du nombre de neurones matures dans chaque couche du cortex ne m'a cependant pas permis de mettre en évidence le moindre défaut du nombre ou de la distribution des neurones. Il est cependant important de noter que NeuN étant un marqueur ubiquitaire exprimé par tous les types neuronaux, ce résultat ne permet pas de conclure quant à l'effet de l'absence de *miR-146a* sur les différents sous-types neuronaux. La possibilité d'un défaut d'identité neuronale causé par la dérégulation de *miR-146a* est également supportée par l'analyse des données de RNAseq réalisée dans les cellules H9 et cette hypothèse sera discutée plus loin.

La différenciation et la migration neuronales sont deux mécanismes étroitement liés. Considérant le défaut de neurogenèse que nous avons identifié, nous avons voulu déterminer si la migration des neurones nés à E14.5 était altérée. Par des expériences de birthdating, nous avons montré que la localisation de ces neurones n'était pas altérée à P7. L'absence de défaut de nombre et de position des neurones à des stades post-nataux suggère donc que le défaut de neurogenèse causé par la perte de *miR-146a* est transitoire

et que des mécanismes de compensation sont mis en place. Il est par exemple possible que les neurones surnuméraires soient éliminés par apoptose, ce que nous pourrions analyser par des tests de TUNEL. Par ailleurs, de nouvelles expériences de birthdating avec injection du BrdU à E14.5 suivie d'une dissection à E17.5 sont en cours pour tester l'hypothèse d'un potentiel défaut de migration transitoire.

Si le défaut de neurogenèse semble transitoire, le cerveau des souris adultes présentent cependant des anomalies anatomiques et fonctionnelles sévères. En effet, nous avons mis en évidence une augmentation de l'asymétrie entre les deux hémisphères de l'hippocampe des cerveaux *Mir146a*^{-/-}. Les altérations de l'anatomie du cerveau, et notamment de l'hippocampe, sont fréquentes dans les MND. Chez les personnes saines, l'hippocampe de l'hémisphère droit est légèrement plus grand que celui de l'hémisphère gauche. Si ce trait physiologique est parfois perdu dans le syndrome de Williams par exemple³³⁶, une augmentation de cette asymétrie avec une distribution aléatoire du côté le plus grand n'a été décrit qu'une seule fois auparavant. Une étude réalisée en 2017 montre que les chiens souffrant d'une épilepsie idiopathique présentent une plus grande asymétrie de l'hippocampe que les chiens sans épilepsie, et ce sans préférence de l'hémisphère atteint³³⁷. Aucune hypothèse moléculaire n'a cependant été proposée afin d'expliquer cette observation.

Chez les souris *Mir146a*^{-/-}, l'imagerie a été réalisée à P30 et P60 et nous n'avons aucune information quant à l'anatomie de l'hippocampe à des stades plus précoces. Nous avons donc tenté de réaliser les mêmes expériences d'IRM à P21 mais la résolution des images n'a pas permis une analyse précise du volume de l'hippocampe. Pour confirmer cette observation sur un plus grand nombre d'animaux et déterminer à partir de quel stade de développement cette anomalie survient, nous envisageons d'utiliser la technique de l'HREM (High Resolution Episcopic Microscopy). Cette méthode permet de réaliser des études anatomiques avec une résolution bien meilleure que l'IRM et sur une plus grande variété de tissus. Il est en effet possible de réaliser des coupes de 1 à 4µm (contre une image tous les 100µm avec l'IRM) sur des embryons entiers ou sur des organes issus de souris adultes. Également plus économique que l'IRM, la seule contrainte de l'HREM est

la taille du tissu que l'on veut analyser, l'échantillon ne pouvant pas dépasser quelques millimètres d'épaisseur.

Les défauts d'interaction sociale et une anxiété accrue sont des traits fréquemment retrouvés dans les TSA mais ne sont pas observés chez les souris *Mir146a*^{-/-}. En revanche, elles présentent une sévère diminution des capacités d'apprentissage observées lors de plusieurs tests comportementaux indépendants. Par ailleurs, nous avons montré par test ELISA qu'il n'y avait pas de différence du niveau d'IL-1 β et de TNF α dans le cerveau des souris que nous avons utilisées pour les tests de comportement. Collectivement, ces résultats démontrent que les souris *Mir146a*^{-/-} présentent un profond défaut d'apprentissage dû à une structuration anormale du cerveau qui persiste à l'âge adulte et non à une inflammation du CNS. Cette hypothèse est supportée par l'altération de la croissance dendritique observée dans les neurones primaires. En revanche, nos résultats ne permettent pas de démontrer l'altération des propriétés physiques des synapses *Mir146a*^{-/-}. Pour ce faire, nous avons réalisé des expériences d'électrophysiologie en collaboration avec le groupe de Yann Humeau à Bordeaux. Ces expériences réalisées sur des neurones primaires en culture ne montrent pas de différence des capacités de transmission électriques des synapses mutantes comparées aux contrôles. Il sera donc nécessaire de répéter ces expériences sur tranches d'hippocampe ou sur animaux vivants pour mieux évaluer les paramètres électrophysiologiques des neurones mutants.

La caractérisation de ce modèle nous a donc permis de conclure que la perte de *miR-146a* cause un défaut transitoire de neurogenèse au stade embryonnaire qui, même si un mécanisme de compensation se met en place, entraîne une altération de la formation des circuits neuronaux. Les souris *Mir146a*^{-/-} récapitulent donc certaines présentations cliniques de patients et constituent un modèle pertinent pour l'étude des MND.

5 - Perspectives offertes par les analyses transcriptomiques

L'étude des gènes différentiellement exprimés à P30 et P60 montre que l'absence de *miR-146a* altère principalement le niveau d'expression de gènes exprimés dans les

interneurones et les neurones pyramidaux. De plus, de nombreux marqueurs de sous-types neuronaux ont été trouvés différentiellement exprimés dans les cellules H9 sur-exprimant *miR-146a*. Notamment, des marqueurs de neurones GABA-ergiques tels que *CHODL* et *SNCG* sont sous-exprimés tandis que des marqueurs de neurones glutamatergiques tels que *SYT17* et *CA12* sont sur-exprimés, suggérant un possible défaut d'identité neuronale.

Nous avons réalisé la même analyse sur les souris *Mir146a*^{-/-} à P30 et P60. Une anomalie opposée a été observée à P30 entre marqueurs de cellules neuronales et gliales. En effet, la majorité des marqueurs neuronaux dérégulés sont sur-exprimés tandis que tous les marqueurs de cellules gliales sont sous-exprimés (Fig.26). En revanche, la dérégulation de ces marqueurs à P60 semble plus aléatoire, suggérant qu'une compensation s'est mise en place. Si la quantité totale de neurones n'est pas altérée dans le cortex mature des souris *Mir146a*^{-/-}, il est donc possible que la perte de *miR-146a* altère l'identité acquise par les cellules neurales. Afin de confirmer cette hypothèse, nous aimerions réaliser des expériences de RNAseq sur cellule unique (single cell RNAseq) et évaluer ainsi le nombre de cellules de chaque sous-type neuronal. Cette approche nous permettrait de déterminer quelles populations neuronales sont affectées par la perte de *miR-146a*. J'aimerais également répéter les marquages PH3, NeuN et PAX6/TBR2 à E14.5 sur des coupes coronales au lieu de sagittales afin de déterminer si un défaut de neurogenèse est également présent dans les GE, les régions où les interneurones se différencient, et dans l'hippocampe primitif. Cela permettrait également de savoir si le défaut de neurogenèse est présent dans les deux hémisphères ou dans un seul des deux et donc d'éventuellement rapprocher ses données de nos données d'imagerie.

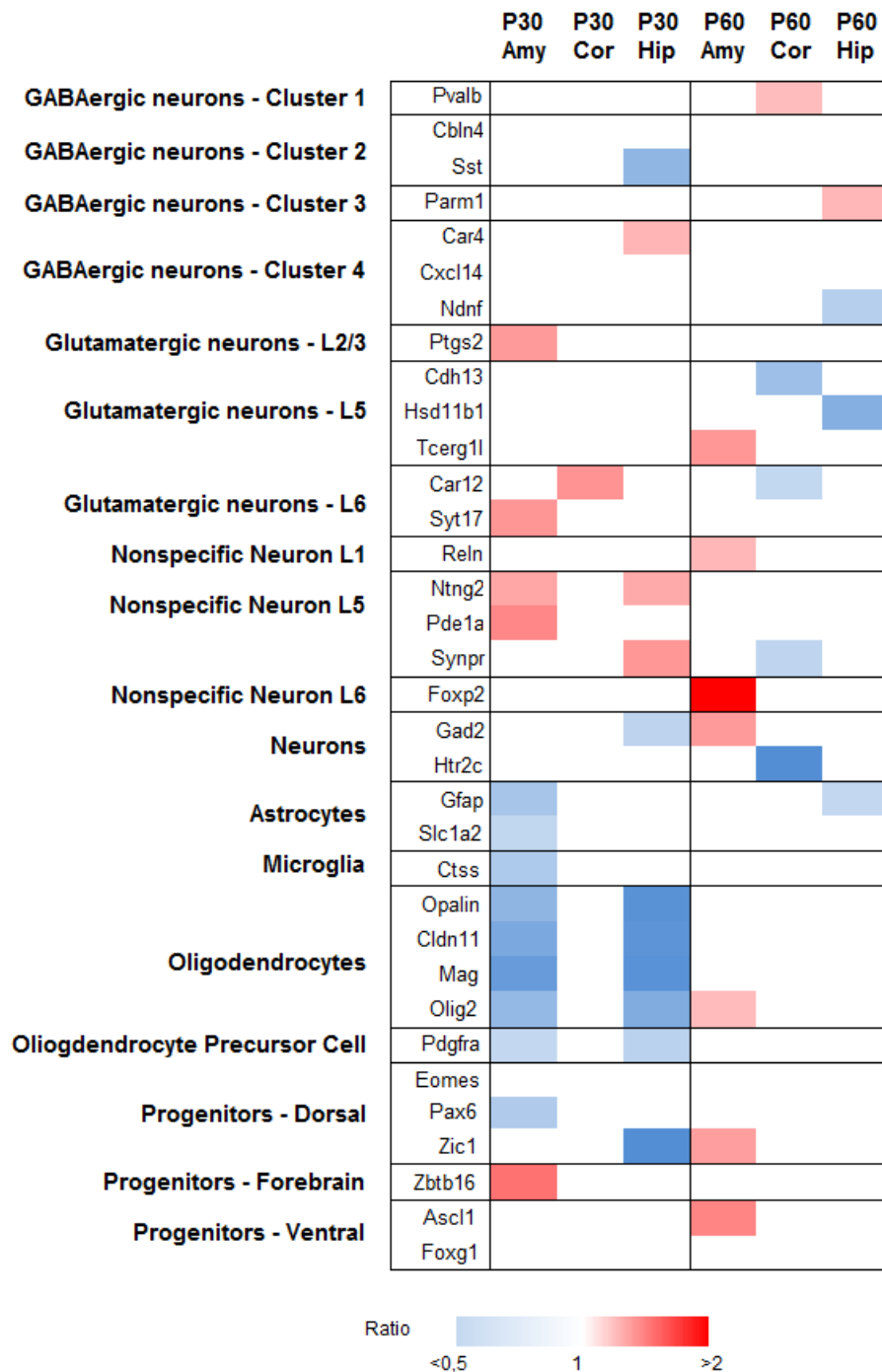


Figure 27: La perte de *miR-146a* altère l'identité des cellules neurales.

Les oligodendrocytes ressortent également comme un type cellulaire fortement perturbé dans le cerveau des souris *Mir146a*^{-/-}. C'est notamment le cas dans l'hippocampe à P30 où, sur 656 gènes dérégulés dans cette région, 109 sont préférentiellement exprimés dans les oligodendrocytes ($p=10^{-66}$) et tous sauf un sont sous-exprimés. Ici encore, un mécanisme de compensation semble s'être mis en place puisque seuls 12 de ces 109 marqueurs oligodendrocytaires restent différentiellement exprimés à P60 et 11 d'entre eux sont sur-exprimés. Ces analyses suggèrent que l'absence de *miR-146a* entraîne un défaut du développement des oligodendrocytes notamment dans l'hippocampe. Il est important de noter qu'une telle altération pourrait participer au défaut anatomique et des capacités d'apprentissage que nous avons observés. Un projet visant à mieux comprendre le rôle de *miR-146a* dans le développement oligodendrocytaire a donc été mené par Antoine Poli, un étudiant en Master dont j'ai assuré l'encadrement pendant 8 mois.

La principale fonction des oligodendrocytes est de produire la gaine de myéline entourant les fibres axonales afin d'assurer la conduction du signal électrique le long de l'axone. Nous avons donc réalisé des expériences de microscopie électronique à P30 afin de déterminer si un défaut de myélinisation était présent dans les cerveaux *Mir146a*^{-/-}. Considérant les résultats de RNseq, nous avons voulu effectuer cette analyse dans l'hippocampe mais l'orientation aléatoire des fibres axonales n'aurait pas permis une mesure précise. Nous avons donc choisi de réaliser ces expériences sur le cervelet, une région du cerveau dans laquelle les axones ont une orientation parallèle. La mesure de l'épaisseur de la gaine de myéline autour de chaque fibre et la quantification des mitochondries, dont l'altération du nombre à l'intérieur des axones est un signe de souffrance axonale, n'ont pas permis de mettre un défaut en évidence. Nous n'avons cependant réalisé aucune autre expérience sur le cervelet, nous ne savons donc pas s'il est affecté par la perte de *miR-146a*. Il n'est donc pas possible de conclure d'après ces expériences si un défaut de myélinisation est présent dans l'hippocampe, le cortex ou l'amygdale. De plus, nous avons effectué les expériences de microscopie électronique à P30, lorsque le processus de myélinisation est terminé. Étant donné que la perte de *miR-146a* cause un défaut de neurogenèse transitoire, il serait intéressant de répéter ces

expériences à des stades plus précoces afin d'identifier un potentiel retard de myélinisation dans les souris mutantes.

Nous avons également voulu tester si un défaut de la quantité d'oligodendrocytes était observable dans les cerveaux *Mir146a*^{-/-}. Nous avons donc réalisé un immunomarquage avec un anticorps dirigé contre OLIG2, un marqueur de la lignée oligodendrocytaire. Le comptage du nombre de cellules OLIG2⁺ dans l'hippocampe n'a pas permis de mettre en évidence une différence entre cerveaux mutants et contrôles. Cependant, plusieurs étapes de maturation sont nécessaires avant que les oligodendrocytes développent la capacité de myéliniser les axones (Fig.27). Il est donc possible qu'un retard du développement de la lignée oligodendrocytaire soit présent dans les cerveaux *Mir146a*^{-/-}. Afin de tester cette hypothèse, nous souhaitons dissocier les cellules de la lignée oligodendrocytaire des autres types cellulaires du CNS et déterminer par cytométrie si un défaut de quantité de progéniteurs ou d'oligodendrocytes matures est présent en utilisant des marqueurs spécifiques de chaque stade de développement.

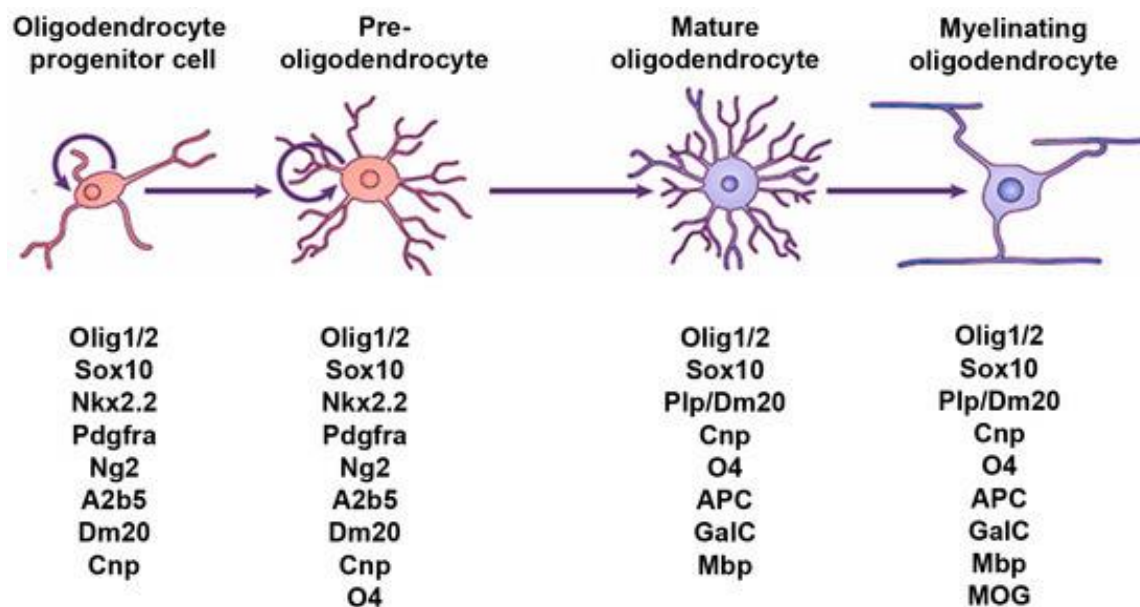


Figure 28: Étapes de maturation de la lignée oligodendrocytaire (extrait de Traiffort et al. 2016).

6 - Les miARNs dans le neurodéveloppement: implication dans les maladies et cibles thérapeutiques

De nombreux miARNs participent au neurodéveloppement et un nombre croissant de liens entre anomalie de séquence ou de niveau d'expression des miARNs et MND est établi. Cela n'est cependant pas le cas pour tous, y compris pour certains miARNs jouant un rôle clé dans ce processus, tels que *miR-9* et *miR-124*. On peut en revanche noter que ces miARNs ont été relié à des maladies neurodégénératives. *miR-9*, dont les fonctions dans la différenciation et migration neuronales ont été évoquées dans l'introduction, est sous-exprimé dans la maladie d'Alzheimer et la chorée de Huntington. *mir-124*, qui participe à la migration neuronale et l'arborisation dendritique, a été impliqué dans les maladies de Parkinson et d'Alzheimer³³⁸. Pourtant, à ce jour, *miR-124* et *miR-9* n'ont jamais été associé à une maladie du neurodéveloppement.

Chez la souris, il existe trois copies de *miR-9/9** localisées sur les chromosomes 3, 7 et 13 et les formes complémentaires de *mir-9-1*, -2 et -3 sont appelées *miR-9b-1*, -2 et -3 respectivement (mirbase.org). Une double inactivation de *miR-9-1* et -2, les formes les plus abondantes durant le neurodéveloppement, cause un défaut majeur d'organisation des couches corticales et de la zone ventriculaire notamment et les souris meurent dans la semaine suivant la naissance³³⁹. Le génome de la souris contient également trois copies de *miR-124* sur les chromosomes 2, 3 et 14 et l'inactivation de *miR-124-1* est suffisante pour causer une réduction de la taille du cerveau et un défaut de croissance axonale³³⁹. Il n'existe cependant pas de modèle murin inactivé pour toutes les copies de *miR-9* ou *mir-124*³³⁹.

Sur la base de ces observations et le rôle majeur de ces miARNs dans le neurodéveloppement, nous proposons qu'une anomalie de l'expression de l'un ou l'autre durant le développement embryonnaire ou fœtal soit incompatible avec le développement d'un embryon humain viable.

Ces dernières années, les miARNs ont émergé comme des cibles thérapeutiques intéressantes. *miR-146a* a déjà fait l'objet de deux études dans des modèles d'épilepsie télencéphaliques chez les rongeurs; *miR-146a* est sur-exprimé dans le modèle de rat et

sous-exprimé chez le modèle murin et corriger son niveau d'expression par injection d'antagomir (séquence complémentaire du miARN permettant sa capture) ou de miARN-mimic (miARN synthétique) respectivement permet de réduire la latence, la durée et l'intensité des crises d'épilepsie induites^{246,280}. Si ces études semblent ouvrir des perspectives thérapeutiques prometteuses, le défaut que nous avons décrit dans les souris *Mir146a*^{-/-} arrive à un stade très précoce, faisant de *miR-146a* une cible thérapeutique peu pertinente pour les TSA ou la DI. Étant donné que *miR-146a* est sur-exprimé chez les patients, il faudra néanmoins déterminer si un défaut de neurodéveloppement aussi précoce est observable sur un modèle transgénique de sur-expression.

7 - Sur-expression de *miR-146a* dans les maladies du neurodéveloppement: cause ou conséquence ?

Les résultats obtenus durant ma thèse démontrent que le niveau d'expression de *miR-146a* doit être finement régulé pour permettre le bon déroulement des processus neurodéveloppementaux. Par ailleurs nous avons également démontré que *miR-146a* est le miARN le plus fréquemment différentiellement exprimé dans les MND et que, contrairement à beaucoup d'autres miARNs dont le niveau d'expression varie de façon mixte, *miR-146a* est toujours sur-exprimé. Ces résultats soulèvent donc la question de déterminer si cette anomalie d'expression est la cause ou la conséquence d'un neurodéveloppement atypique. Les résultats obtenus au laboratoire ainsi que des données de la littérature fournissent quelques éléments de réponse.

Ainsi, j'ai séquencé le promoteur de *MIR146a* de patients et de contrôles sains et établi qu'il n'y avait pas d'enrichissement chez les patients de l'allèle A du polymorphisme rs57095329G/A, induisant une plus forte expression du miARN. Ce résultat exclut donc l'hypothèse selon laquelle les modifications d'expression du miARN seraient liées à une variation de sa séquence primaire.

En revanche, plusieurs études suggèrent que la présence de mutations dans des gènes de MND corrélient avec un niveau d'expression anormal de *miR-146a*. Ainsi, l'expression de *miR-146a* est diminuée dans un modèle souris inactivé pour *Mecp2*²³⁴⁰ et mimant le syndrome de Rett. De même, en réalisant un séquençage "whole exome" des malades sur lesquels nous avons réalisé des biopsies d'OMSCs, nous avons observé que l'un d'entre eux était porteur d'une mutation non-sens dans le gène de MND *SCN2A*. Ces données suggèrent donc que l'expression anormale de *miR-146a* puisse être la conséquence d'une mutation mendélienne dans un gène connu de MND. A l'inverse, plusieurs cibles connues de *miR-146a* sont des gènes dont les mutations sont responsables de MND. C'est par exemple le cas des gènes *GRIA3* ou *L1CAM*. La sur-expression de *miR-146a* mimerait alors une mutation perte de fonction de l'un de ces gènes.

L'expression de ce miARN varie en réponse à l'activation de la voie NFκB. Nous proposons donc qu'elle puisse être modulée par différents facteurs environnementaux comme l'inflammation ou l'exposition à des substances toxiques, dont l'exposition *in utero* est connue pour augmenter le risque de développer une MND. Nous projetons d'ailleurs de quantifier le niveau d'expression de *miR-146a* dans des modèles de souris présentant des traits relatifs aux MND causés par un agent environnemental et notamment le valproate de sodium qui entraîne des modifications des profils d'acétylation ou l'acide polyinosinique-polycytidylique (poly-IC) qui mime les infections virales en activant la voie NFκB.

Enfin, l'étude de modèles murins et humains sur-exprimant ou inactivés pour *miR-146a* démontrent clairement que des anomalies de ce miARN sont suffisantes pour conduire à un développement anormal du cerveau soit du fait d'une anomalie du contrôle de la réponse inflammatoire soit du fait d'un défaut de la balance entre prolifération et différenciation des progéniteurs neuraux.

Collectivement, ces observations suggèrent donc que la sur-expression de *miR-146a* puisse être à la fois la cause directe d'un neurodéveloppement atypique et la conséquence d'une maladie du neurodéveloppement (Fig.28), faisant de ce miARN un élément clé pour l'étude de ces maladies.

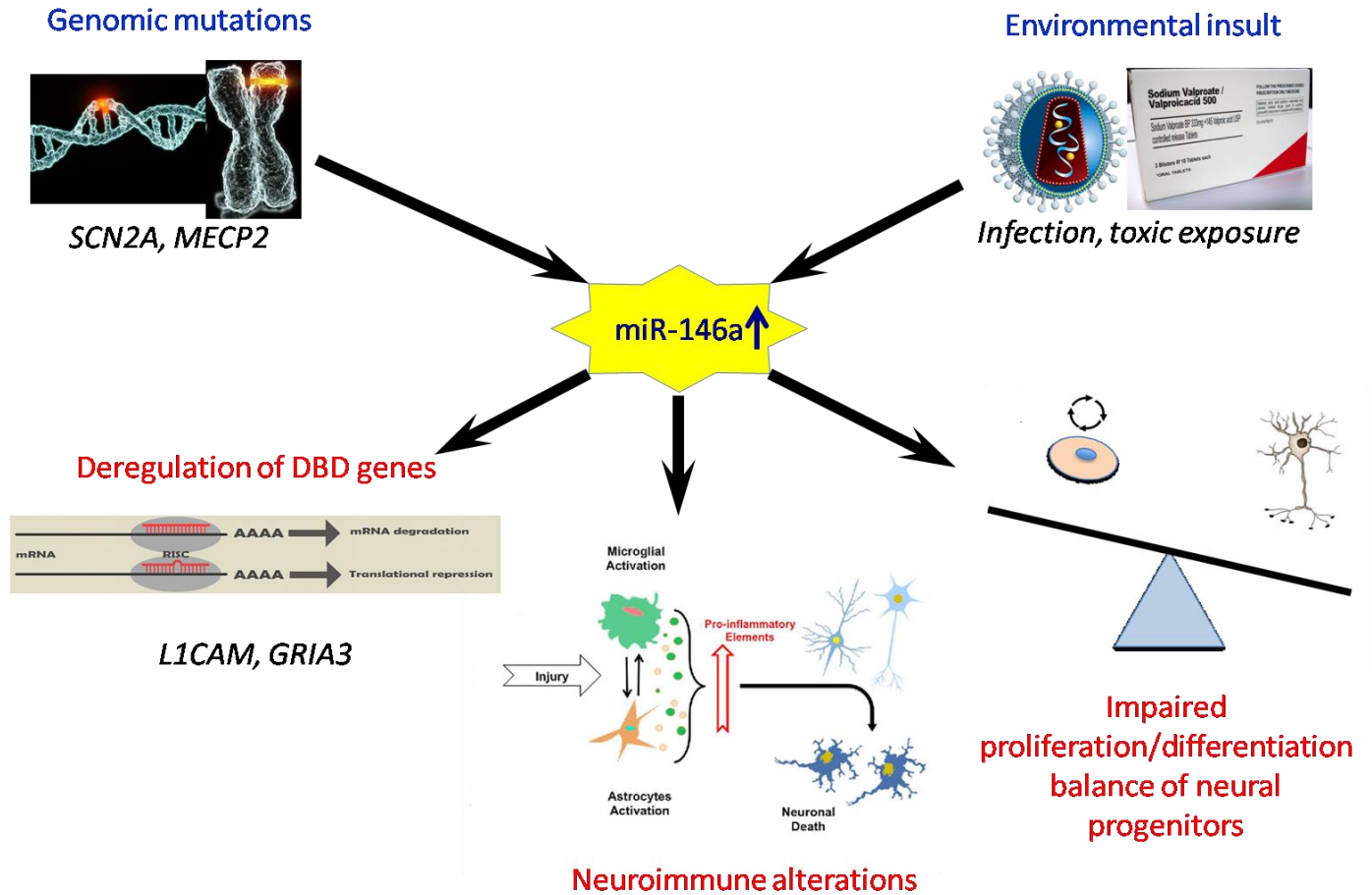


Figure 29: Causes et conséquences de la sur-expression de *miR-146a* dans le CNS. Les causes sont écrites en bleu et les conséquences en rouge. DBD: Developmental Brain Disorder

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1 - Western blot CTNNB1

Des protéines extraites de néocortex total à E14.5 ont été utilisées pour ce WB. Après une dénaturation à 95°C pendant 10min, 20µg de protéines ont été déposées sur un gel de polyacrylamide 4-20% (Biorad). Les protéines ont migré pendant 1h à 100V puis ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose grâce au système Transblot (1,3A, 25V, 7min)(Biorad). La quantité totale de protéines chargées dans chaque puits a été mesurée par le système Odyssey CLx (Li-cor) puis la membrane a été bloquée pendant 1h avec une solution de lait dilué à 5% dans du PBS-Triton X-100 0,1% avant d'être incubée sur la nuit à 4°C dans l'anticorps primaire (Abcam ab32572, 1:5000). 3 lavages de 10 minutes au PBS-Triton X-100 0,1% ont été effectués avant d'incuber la membrane avec l'anticorps secondaire pendant 1h (Li-cor 925-68073, 1:10000). Après 3 nouveaux lavages, la révélation de la membrane a été faite en utilisant le système Odyssey CLx. La quantification du signal a été réalisée par le logiciel Image Studio et normalisée par la quantité totale de protéines dans chaque puits.

2 - Mise en culture des astrocytes primaires

Les astrocytes primaires ont été extraits de cortex total à P1 puis mis en culture dans du DMEM low glucose (ThermoFischer, 10567) avec 10% de sérum de veau fœtal et 1% de pénicilline/streptomycine. Pour les expériences de sur-expression, les astrocytes ont été infectés avec le p-lenti 146a ou le vecteur vide et les mesures des différentes expériences ont commencé 24h après infection tandis qu'elles ont débuté sans délai pour les astrocytes Mir146a^{-/-}. Pour les expériences de capture de glutamate et de migration, les

astrocytes à confluence ont été traités avec 8 μ M β -D-arabinofuranoside (ARAC, Sigma), un bloqueur mitotique, pendant 5 à 6 jours puis 1h avec 75mM de L-leucine methyl ester (LME, Sigma), un agent permettant l'élimination de la microglie.

3 - Tests de prolifération

Les astrocytes primaires ont été mis en culture à une concentration de 10.000 astrocytes par puits dans une plaque RTCA (Ozyme) mise dans le système Xcelligence qui mesure la surface occupée par les cellules grâce à leur impédance. Les mesures d'impédance dans chaque puits ont été prises toutes les 15 minutes pendant 5 à 6 jours et analysées par le logiciel RTCA.

4 - Tests de capture de glutamate

2h avant le début de l'expérience, les astrocytes ont été incubés avec du milieu de culture sans sérum. Dans les puits servant de contrôle négatif, 250 μ m de L-trans-Pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid (PDC, Sigma), un inhibiteur des transporteurs de glutamate, ont également été ajouté. Puis les cellules ont été incubées pendant 30 minutes dans du milieu sans sérum contenant du glutamate radioactif (dilution 1/1000 du tube stock) et non radioactif (50 μ M) en maintenant le PDC pour les contrôles négatifs. Les astrocytes sont ensuite lavés trois fois avec du PBS froid afin d'éliminer le glutamate radioactif pouvant être contenu dans le milieu de culture avant d'être lysés avec du NaOH 1M contenant 0,1% de Triton X-100 pendant 10 minutes à 42°C. Le lysat a ensuite été mélangé avec du liquide de scintillation et la radioactivité de chaque échantillon a été mesurée par un compteur à scintillation. Une petite quantité du lysat a été gardée afin de mesurer la quantité totale de protéines dans chaque puits par mesure de Bradford. Pour

les expériences réalisées sur les astrocytes *Mir146a*^{-/-}, deux autres bloqueurs de transport de glutamate, UCPH101 et WAY213613 (Tocris), spécifiques de GLAST et GLT-1 respectivement ont été utilisés. L'analyse a été réalisée en normalisant la mesure de radioactivité par la concentration de protéines et par la mesure obtenue par le bloqueur correspondant à la condition testée.

5 - Tests de migration

Après traitement des astrocytes par ARAC et LME, une blessure a été réalisée par l'outil WoundMaker (Essenbioscience) puis le milieu a été changé afin d'éliminer les débris. La plaque de culture a ensuite été mise dans le système Incucyte (Essenbioscience) qui a permis de mesurer la vitesse de fermeture de la blessure en prenant une photo toutes les heures pendant 48h. L'analyse a été réalisée automatiquement par le logiciel Incucyte Zoom qui mesure à chaque point de temps la taille de la blessure, permettant ainsi de calculer la vitesse de migration des astrocytes.

6 - Tests de luciférase

Un fragment d'environ 1kb du 3'UTR de GLT-1 contenant les deux sites de fixation prédits de *miR-146a* a été cloné dans le vecteur Psichex-2 (Promega). Le vecteur contient deux types de luciférase: la Firefly indépendante des conditions testées servant de facteur de normalisation et la Renilla qui est fusionnée à la séquence clonée dans le vecteur. Les amorces d'amplification suivantes ont été utilisées:

Sens : CCACCCCTCGAGCCTGGAGAGAGGATT^{*}TGATT^{*}G

Antisens : TAAGCCGCGGCCGCGCTGAGTT^{*}TCTGGT^{*}TGTGTGT

Le plasmide a ensuite été co-transfecté dans des cellules HEK293T en utilisant du Jetprime Polyplus Transfection Reagent (Ozyme) avec du *miR-146a* synthétique, du *miR-scramble* (une séquence aléatoire) ou du *miR-146a* synthétique en concomitance avec des

inhibiteurs du miARN. La quantification de la luciférase a ensuite été effectuée en utilisant le Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) 48h après transfection et la mesure utilisée pour l'analyse est le ratio Renilla/Firefly.

ANNEXE

miRNA	Target Gene	References (PMID)
hsa-miR-146a-5p	CXCR4	18568019
hsa-miR-146a-5p	CXCR4	20375304
hsa-miR-146a-5p	CXCR4	26082201
hsa-miR-146a-5p	CFH	19540598
hsa-miR-146a-5p	CFH	18801740
hsa-miR-146a-5p	IRAK2	20124483
hsa-miR-146a-5p	IRAK2	25889446
hsa-miR-146a-5p	IRAK2	28077577
hsa-miR-146a-5p	TLR2	20375304
hsa-miR-146a-5p	FADD	19965651
hsa-miR-146a-5p	TRAF6	18504431
hsa-miR-146a-5p	TRAF6	20061417
hsa-miR-146a-5p	TRAF6	20375304
hsa-miR-146a-5p	TRAF6	18759964
hsa-miR-146a-5p	TRAF6	19898489
hsa-miR-146a-5p	TRAF6	19918258
hsa-miR-146a-5p	TRAF6	16885212
hsa-miR-146a-5p	TRAF6	20542134
hsa-miR-146a-5p	TRAF6	21178010
hsa-miR-146a-5p	TRAF6	21610143
hsa-miR-146a-5p	TRAF6	22593544
hsa-miR-146a-5p	TRAF6	20110513
hsa-miR-146a-5p	TRAF6	24107356
hsa-miR-146a-5p	TRAF6	25205119
hsa-miR-146a-5p	TRAF6	23685241
hsa-miR-146a-5p	TRAF6	26151128
hsa-miR-146a-5p	TRAF6	25889446
hsa-miR-146a-5p	TRAF6	27904767
hsa-miR-146a-5p	IRAK1	18504431
hsa-miR-146a-5p	IRAK1	20061417
hsa-miR-146a-5p	IRAK1	18759964
hsa-miR-146a-5p	IRAK1	19918258
hsa-miR-146a-5p	IRAK1	16885212
hsa-miR-146a-5p	IRAK1	20542134
hsa-miR-146a-5p	IRAK1	21178010

hsa-miR-146a-5p	IRAK1	21632853
hsa-miR-146a-5p	IRAK1	22593544
hsa-miR-146a-5p	IRAK1	20110513
hsa-miR-146a-5p	IRAK1	23680172
hsa-miR-146a-5p	IRAK1	22992343
hsa-miR-146a-5p	IRAK1	23018031
hsa-miR-146a-5p	IRAK1	24867582
hsa-miR-146a-5p	IRAK1	24107356
hsa-miR-146a-5p	IRAK1	23952003
hsa-miR-146a-5p	IRAK1	25623956
hsa-miR-146a-5p	IRAK1	26151128
hsa-miR-146a-5p	IRAK1	27636999
hsa-miR-146a-5p	IRAK1	25889446
hsa-miR-146a-5p	IRAK1	27922090
hsa-miR-146a-5p	IRAK1	25805648
hsa-miR-146a-5p	ROCK1	18174313
hsa-miR-146a-5p	ROCK1	26306811
hsa-miR-146a-5p	ROCK1	27221467
hsa-miR-146a-5p	BRCA2	18660546
hsa-miR-146a-5p	BRCA1	18660546
hsa-miR-146a-5p	BRCA1	19944095
hsa-miR-146a-5p	BRCA1	23671131
hsa-miR-146a-5p	FAF1	20459811
hsa-miR-146a-5p	CCNA2	19944095
hsa-miR-146a-5p	PA2G4	19944095
hsa-miR-146a-5p	CXCL8	18504431
hsa-miR-146a-5p	CXCL8	20124483
hsa-miR-146a-5p	NFKB1	18504431
hsa-miR-146a-5p	NFKB1	20124483
hsa-miR-146a-5p	NFKB1	18660546
hsa-miR-146a-5p	NFKB1	23706078
hsa-miR-146a-5p	NFKB1	25052989
hsa-miR-146a-5p	CDKN1A	20101223
hsa-miR-146a-5p	EGFR	20124483
hsa-miR-146a-5p	EGFR	21632853
hsa-miR-146a-5p	EGFR	22161865
hsa-miR-146a-5p	EGFR	19190326
hsa-miR-146a-5p	EGFR	23555954
hsa-miR-146a-5p	EGFR	24839931
hsa-miR-146a-5p	EGFR	27818285

hsa-miR-146a-5p	MTA2	20124483
hsa-miR-146a-5p	CD40LG	21236257
hsa-miR-146a-5p	FAS	20656888
hsa-miR-146a-5p	FAS	23645835
hsa-miR-146a-5p	CDKN3	19944095
hsa-miR-146a-5p	KIF22	19944095
hsa-miR-146a-5p	ERBB4	20864407
hsa-miR-146a-5p	ERBB4	23619365
hsa-miR-146a-5p	SMAD4	22507670
hsa-miR-146a-5p	SMAD4	21968601
hsa-miR-146a-5p	SMAD4	22020746
hsa-miR-146a-5p	SMAD4	24939082
hsa-miR-146a-5p	SMAD4	23832538
hsa-miR-146a-5p	SMAD4	27438138
hsa-miR-146a-5p	TLR4	21329689
hsa-miR-146a-5p	WASF2	23435376
hsa-miR-146a-5p	WASF2	28387985
hsa-miR-146a-5p	IRF7	18057241
hsa-miR-146a-5p	PPP1R1C	18057241
hsa-miR-146a-5p	ITGB2	18057241
hsa-miR-146a-5p	SNTG2	18057241
hsa-miR-146a-5p	RSAD2	18057241
hsa-miR-146a-5p	BGLAP	20110513
hsa-miR-146a-5p	SYT12	18057241
hsa-miR-146a-5p	STAT1	20110513
hsa-miR-146a-5p	STAT1	23890093
hsa-miR-146a-5p	STAT1	23698745
hsa-miR-146a-5p	STAT1	25889446
hsa-miR-146a-5p	STAT1	28077577
hsa-miR-146a-5p	IFTT1	18057241
hsa-miR-146a-5p	IFTTM1	18057241
hsa-miR-146a-5p	OLFML2A	18057241
hsa-miR-146a-5p	ISG15	18057241
hsa-miR-146a-5p	UHRF1	23982143
hsa-miR-146a-5p	IFTTM3	18057241
hsa-miR-146a-5p	RGS13	18057241
hsa-miR-146a-5p	MTUS2	18057241
hsa-miR-146a-5p	NMI	18057241
hsa-miR-146a-5p	HSPA1A	18057241
hsa-miR-146a-5p	TRIM22	18057241

hsa-miR-146a-5p	ITGBL1	18057241
hsa-miR-146a-5p	SPATS2L	18057241
hsa-miR-146a-5p	IFI44	18057241
hsa-miR-146a-5p	OASL	18057241
hsa-miR-146a-5p	IFI44L	18057241
hsa-miR-146a-5p	IFI27	18057241
hsa-miR-146a-5p	METTL7A	22100165
hsa-miR-146a-5p	LINC00304	18057241
hsa-miR-146a-5p	STON2	18057241
hsa-miR-146a-5p	BCL2A1	18057241
hsa-miR-146a-5p	MX2	18057241
hsa-miR-146a-5p	EPSTI1	18057241
hsa-miR-146a-5p	OSBPL1A	18057241
hsa-miR-146a-5p	IFIT5	18057241
hsa-miR-146a-5p	C1orf21	18057241
hsa-miR-146a-5p	GIMAP4	18057241
hsa-miR-146a-5p	CCR9	18057241
hsa-miR-146a-5p	SAMD9L	18057241
hsa-miR-146a-5p	IFTT3	18057241
hsa-miR-146a-5p	CD80	26505653
hsa-miR-146a-5p	SPP1	20110513
hsa-miR-146a-5p	SLPI	20110513
hsa-miR-146a-5p	L1CAM	22711166
hsa-miR-146a-5p	MSC	23622248
hsa-miR-146a-5p	SMN1	22020746
hsa-miR-146a-5p	CARD10	22992343
hsa-miR-146a-5p	CARD10	24985472
hsa-miR-146a-5p	COPS8	22992343
hsa-miR-146a-5p	ELAVL1	23733368
hsa-miR-146a-5p	NUMB	24302991
hsa-miR-146a-5p	NUMB	24092752
hsa-miR-146a-5p	ICAM1	24867582
hsa-miR-146a-5p	SMAD2	24892945
hsa-miR-146a-5p	KCTD15	23592263
hsa-miR-146a-5p	KCTD15	23446348
hsa-miR-146a-5p	KCTD15	21572407
hsa-miR-146a-5p	KCTD15	20371350
hsa-miR-146a-5p	ARL8A	21572407
hsa-miR-146a-5p	SQSTM1	24398324
hsa-miR-146a-5p	SQSTM1	21572407

hsa-miR-146a-5p	PMAIP1	21572407
hsa-miR-146a-5p	PTGS2	22699322
hsa-miR-146a-5p	CCL5	24996260
hsa-miR-146a-5p	S100A12	22815788
hsa-miR-146a-5p	ZNF117	22815788
hsa-miR-146a-5p	MYO6	22815788
hsa-miR-146a-5p	CCDC6	22815788
hsa-miR-146a-5p	IL1RAP	22815788
hsa-miR-146a-5p	IL1RL2	22815788
hsa-miR-146a-5p	ROBO1	25445498
hsa-miR-146a-5p	PTGES2	23589616
hsa-miR-146a-5p	CNOT6L	23591815
hsa-miR-146a-5p	SIKE1	23963696
hsa-miR-146a-5p	CXCL12	23963696
hsa-miR-146a-5p	PRKCE	23457043
hsa-miR-146a-5p	PRKCE	25308712
hsa-miR-146a-5p	HOXD10	25010866
hsa-miR-146a-5p	RAC1	25214035
hsa-miR-146a-5p	LAMC2	25214035
hsa-miR-146a-5p	COX2	25047043
hsa-miR-146a-5p	COX2	25767384
hsa-miR-146a-5p	DUSP1	23825193
hsa-miR-146a-5p	RNF11	23345523
hsa-miR-146a-5p	SERPINA4	22100165
hsa-miR-146a-5p	ESD	22100165
hsa-miR-146a-5p	ST6GAL2	22100165
hsa-miR-146a-5p	SFRP1	22100165
hsa-miR-146a-5p	MKRN2	22100165
hsa-miR-146a-5p	PARD6B	22100165
hsa-miR-146a-5p	ACTBL2	22100165
hsa-miR-146a-5p	LIMD2	22100165
hsa-miR-146a-5p	TMPRSS5	23592263
hsa-miR-146a-5p	HAAO	23592263
hsa-miR-146a-5p	TMEM214	23592263
hsa-miR-146a-5p	BCL7B	23592263
hsa-miR-146a-5p	BCL7B	27292025
hsa-miR-146a-5p	SRPRB	23592263
hsa-miR-146a-5p	SRPRB	21572407
hsa-miR-146a-5p	SRPRB	20371350
hsa-miR-146a-5p	SHCBP1	23592263

hsa-miR-146a-5p	RHOBTB3	23592263
hsa-miR-146a-5p	RAB2B	23592263
hsa-miR-146a-5p	PPP1R11	23592263
hsa-miR-146a-5p	PPP1R11	27292025
hsa-miR-146a-5p	NACC1	23592263
hsa-miR-146a-5p	NACC1	26701625
hsa-miR-146a-5p	ATG9A	23592263
hsa-miR-146a-5p	ATG9A	26701625
hsa-miR-146a-5p	GXYLT2	23592263
hsa-miR-146a-5p	MICAL2	23592263
hsa-miR-146a-5p	MICAL2	20371350
hsa-miR-146a-5p	COPA	23592263
hsa-miR-146a-5p	GRAP2	23592263
hsa-miR-146a-5p	CD300LB	22291592
hsa-miR-146a-5p	MBD4	24398324
hsa-miR-146a-5p	MBD4	21572407
hsa-miR-146a-5p	PPWD1	23446348
hsa-miR-146a-5p	PPWD1	22012620
hsa-miR-146a-5p	PPWD1	20371350
hsa-miR-146a-5p	TMEM136	23446348
hsa-miR-146a-5p	ZNF292	22012620
hsa-miR-146a-5p	USP48	22012620
hsa-miR-146a-5p	PLEKHG5	22012620
hsa-miR-146a-5p	CCDC83	21572407
hsa-miR-146a-5p	DECR1	21572407
hsa-miR-146a-5p	TMEM101	21572407
hsa-miR-146a-5p	ZNF260	21572407
hsa-miR-146a-5p	AKAP8	21572407
hsa-miR-146a-5p	AKAP8	20371350
hsa-miR-146a-5p	TMEM167A	21572407
hsa-miR-146a-5p	TMEM167A	20371350
hsa-miR-146a-5p	RUFY2	21572407
hsa-miR-146a-5p	C16orf52	21572407
hsa-miR-146a-5p	ATP13A3	21572407
hsa-miR-146a-5p	SERTAD2	20371350
hsa-miR-146a-5p	LBR	20371350
hsa-miR-146a-5p	FANCF	20371350
hsa-miR-146a-5p	LSM4	20371350
hsa-miR-146a-5p	LSM4	27292025
hsa-miR-146a-5p	BTN2A2	20371350

hsa-miR-146a-5p	SERBP1	20371350
hsa-miR-146a-5p	GPM6B	23824327
hsa-miR-146a-5p	GPM6B	27418678
hsa-miR-146a-5p	ELP2	23824327
hsa-miR-146a-5p	ZNF629	23824327
hsa-miR-146a-5p	ZNF629	28735896
hsa-miR-146a-5p	MDN1	23824327
hsa-miR-146a-5p	POU3F1	23824327
hsa-miR-146a-5p	TLL1	23824327
hsa-miR-146a-5p	HORMAD2	23824327
hsa-miR-146a-5p	MFSD6	23824327
hsa-miR-146a-5p	ENTPD5	23824327
hsa-miR-146a-5p	UTP15	23824327
hsa-miR-146a-5p	CYTIP	23824327
hsa-miR-146a-5p	CYTIP	23706177
hsa-miR-146a-5p	CYTIP	27292025
hsa-miR-146a-5p	CYTIP	27418678
hsa-miR-146a-5p	ZNF738	23706177
hsa-miR-146a-5p	UMPS	23313552
hsa-miR-146a-5p	MRPS30	23313552
hsa-miR-146a-5p	MRPL10	23313552
hsa-miR-146a-5p	RGS9BP	23313552
hsa-miR-146a-5p	ALG10B	23313552
hsa-miR-146a-5p	PACS2	23313552
hsa-miR-146a-5p	EDEM3	23313552
hsa-miR-146a-5p	CDC73	23313552
hsa-miR-146a-5p	AVL9	23313552
hsa-miR-146a-5p	CYBRD1	19536157
hsa-miR-146a-5p	MYLK	19536157
hsa-miR-146a-5p	DGCR6L	19536157
hsa-miR-146a-5p	SOS1	25469565
hsa-miR-146a-5p	CASP7	27449900
hsa-miR-146a-5p	BCLAF1	27449900
hsa-miR-146a-5p	CPM	28186967
hsa-miR-146a-5p	NOTCH2	27832663
hsa-miR-146a-5p	NOTCH2	28278511
hsa-miR-146a-5p	NOTCH2	26165719
hsa-miR-146a-5p	SOX2	26159827
hsa-miR-146a-5p	IL6	25265569
hsa-miR-146a-5p	RHOA	27175941

hsa-miR-146a-5p	IS2	26238771
hsa-miR-146a-5p	FOS	26112171
hsa-miR-146a-5p	KDM2B	28202285
hsa-miR-146a-5p	LFNG	27311960
hsa-miR-146a-5p	TGFB1	28337286
hsa-miR-146a-5p	MIF	27569893
hsa-miR-146a-5p	FANCM	27351285
hsa-miR-146a-5p	NOTCH1	26165719
hsa-miR-146a-5p	LIN52	28454266
hsa-miR-146a-5p	LRP2	27241555
hsa-miR-146a-5p	CCND2	27494902
hsa-miR-146a-5p	CCND1	27494902
hsa-miR-146a-5p	NFAT5	25515214
hsa-miR-146a-5p	RHO	25515214
hsa-miR-146a-5p	RARB	27011326
hsa-miR-146a-5p	NOS1	28218896
hsa-miR-146a-5p	PLAUR	26082201
hsa-miR-146a-5p	BRWD1	26701625
hsa-miR-146a-5p	KDM6B	26701625
hsa-miR-146a-5p	MPP2	26701625
hsa-miR-146a-5p	WSB2	26701625
hsa-miR-146a-5p	GPRIN2	27292025
hsa-miR-146a-5p	MAN1C1	27292025
hsa-miR-146a-5p	SLC10A3	27292025
hsa-miR-146a-5p	NSL1	27418678
mmu-miR-146a-5p	Ifng	23142080
mmu-miR-146a-5p	Irak2	23142080
mmu-miR-146a-5p	Irak1	23142080
mmu-miR-146a-5p	Irak1	23142080
mmu-miR-146a-5p	Irak1	23142080
mmu-miR-146a-5p	Irak1	23142080
mmu-miR-146a-5p	Irak1	23142080
mmu-miR-146a-5p	Traf6	23142080
mmu-miR-146a-5p	Traf6	23142080
mmu-miR-146a-5p	Traf6	23142080
mmu-miR-146a-5p	Traf6	23142080
mmu-miR-146a-5p	Traf6	23142080
mmu-miR-146a-5p	Traf6	23142080
mmu-miR-146a-5p	Traf6	23142080
mmu-miR-146a-5p	Nos2	23142080

mmu-miR-146a-5p	Stat1	23142080
mmu-miR-146a-5p	Notch1	23142080
mmu-miR-146a-5p	Notch1	23142080
mmu-miR-146a-5p	Notch1	23142080
mmu-miR-146a-5p	Med1	23142080
mmu-miR-146a-5p	Relb	23142080
mmu-miR-146a-5p	IRAK1	23142080
mmu-miR-146a-5p	IRAK1	23142080
mmu-miR-146a-5p	Map1b	23142080
mmu-miR-146a-5p	RNF11	23142080
mmu-miR-146a-5p	Slc47a1	23142080
mmu-miR-146a-5p	Slc47a1	23142080
mmu-miR-146a-5p	Cd93	23142080
mmu-miR-146a-5p	Mllt3	23142080
mmu-miR-146a-5p	Nrp2	23142080
mmu-miR-146a-5p	Camk2a	23142080
mmu-miR-146a-5p	Camk2a	23142080
mmu-miR-146a-5p	Camk2a	23142080
mmu-miR-146a-5p	Tnni1	23142080
mmu-miR-146a-5p	Rsad2	23142080
mmu-miR-146a-5p	Ndor1	23142080
mmu-miR-146a-5p	Sgk3	23142080
mmu-miR-146a-5p	Gpr157	23142080
mmu-miR-146a-5p	Wnt1	23142080
mmu-miR-146a-5p	Wnt5a	23142080
mmu-miR-146a-5p	TRAF6	23142080
mmu-miR-146a-5p	Hes1	23142080
mmu-miR-146a-5p	Pparg	23142080
mmu-miR-146a-5p	NFKB1	23142080
mmu-miR-146a-5p	Il6	23142080
mmu-miR-146a-5p	Vegfa	23142080
mmu-miR-146a-5p	Rc3h1	23142080
mmu-miR-146a-5p	EGR1	23142080
mmu-miR-146a-5p	Ppp3r2	23142080
mmu-miR-146a-5p	Tgif1	23142080
mmu-miR-146a-5p	Camk2d	23142080
mmu-miR-146a-5p	VSIVgp2	23142080

Table annexe 1: Cibles validées de *miR-146a* (modifié depuis <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>)

BIBLIOGRAPHIE

1. Taniguchi, T. & Weissmann, C. Inhibition of Q β RNA 70S ribosome initiation complex formation by an oligonucleotide complementary to the 3'; terminal region of E. coli 16S ribosomal RNA [33]. *Nature* (1978). doi:10.1038/275770a0
2. Izant, J. G. & Weintraub, H. Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: A molecular approach to genetic analysis. *Cell* (1984). doi:10.1016/0092-8674(84)90050-3
3. Napoli, C. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *PLANT CELL ONLINE* (1990). doi:10.1105/tpc.2.4.279
4. Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *caenorhabditis elegans*. *Nature* (1998). doi:10.1038/35888
5. Kennerdell, J. R. & Carthew, R. W. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* (1998). doi:10.1016/S0092-8674(00)81725-0
6. Fregeac, J., Colleaux, L. & Nguyen, L. S. The emerging roles of MicroRNAs in autism spectrum disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **71**, (2016).
7. Ha, M. & Kim, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2014). doi:10.1038/nrm3838
8. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* (1993). doi:10.1016/0092-8674(93)90529-Y
9. Kozomara, A. & Griffiths-Jones, S. MiRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* (2014). doi:10.1093/nar/gkt1181
10. Di Leva, G., Garofalo, M. & Croce, C. M. MicroRNAs in cancer. *Annu. Rev. Pathol.* (2014). doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104715
11. Huntzinger, E. & Izaurralde, E. Gene silencing by microRNAs: Contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics* (2011). doi:10.1038/nrg2936
12. Krol, J., Loedige, I. & Filipowicz, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis,

- function and decay. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 597–610 (2010).
13. Barry, G. Integrating the roles of long and small non-coding RNA in brain function and disease. *Molecular Psychiatry* (2014). doi:10.1038/mp.2013.196
 14. Grimson, A. *et al.* Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature* (2008). doi:10.1038/nature07415
 15. Peterson, K. J., Dietrich, M. R. & McPeck, M. A. MicroRNAs and metazoan macroevolution: Insights into canalization, complexity, and the Cambrian explosion. *BioEssays* **31**, 736–747 (2009).
 16. Baskerville, S. & Bartel, D. P. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *Rna* **11**, 241–247 (2005).
 17. Rajman, M. & Schratt, G. MicroRNAs in neural development: from master regulators to fine-tuners. *Development* **144**, 2310–2322 (2017).
 18. Kim, V. N., Han, J. & Siomi, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 126–139 (2009).
 19. Davis-Dusenbery, B. N. & Hata, A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *J. Biochem.* **148**, 381–392 (2010).
 20. Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I. & Diederichs, S. Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* **11**, 228–234 (2009).
 21. Meister, G. Argonaute proteins: Functional insights and emerging roles. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 447–459 (2013).
 22. Abdelfattah, A. M., Park, C. & Choi, M. Y. Update on non-canonical microRNAs. *Biomolecular Concepts* (2014). doi:10.1515/bmc-2014-0012
 23. Ruby, J. G., Jan, C. H. & Bartel, D. P. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* (2007). doi:10.1038/nature05983
 24. Okamura, K., Hagen, J. W., Duan, H., Tyler, D. M. & Lai, E. C. The Mirtron Pathway Generates microRNA-Class Regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* (2007). doi:10.1016/j.cell.2007.06.028
 25. Wen, J., Ladewig, E., Shenker, S., Mohammed, J. & Lai, E. C. Analysis of Nearly One Thousand Mammalian Mirtrons Reveals Novel Features of Dicer Substrates. *PLoS Comput. Biol.* (2015). doi:10.1371/journal.pcbi.1004441
 26. Taft, R. J. *et al.* Small RNAs derived from snoRNAs. *Rna* **15**, 1233–1240 (2009).
 27. Saraiya, A. A. & Wang, C. C. snoRNA, a novel precursor of microRNA in *Giardia lamblia*.

- PLoS Pathog.* **4**, (2008).
28. Babiarz, J. E., Ruby, J. G., Wang, Y., Bartel, D. P. & Blelloch, R. Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other microprocessor-independent, dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev.* (2008). doi:10.1101/gad.1705308
 29. Cole, C., Sobala, A., Lu, C., Thatcher, S. & Bowman, A. Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicer- *RNA (New York, NY)* 2147–2160 (2009). doi:10.1261/rna.1738409.2008b
 30. Bogerd, H. P. *et al.* A Mammalian Herpesvirus Uses Noncanonical Expression and Processing Mechanisms to Generate Viral MicroRNAs. *Mol. Cell* (2010). doi:10.1016/j.molcel.2009.12.016
 31. Pfeffer, S. *et al.* Identification of Virus-Encoded MicroRNAs. *Science* (80-.). (2004). doi:10.1126/science.1096781
 32. Cifuentes, D. *et al.* A novel miRNA processing pathway independent of dicer requires argonaute2 catalytic activity. *Science* (80-.). (2010). doi:10.1126/science.1190809
 33. Cheloufi, S., Dos Santos, C. O., Chong, M. M. W. & Hannon, G. J. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* (2010). doi:10.1038/nature09092
 34. Yoda, M. *et al.* Poly(A)-specific ribonuclease mediates 3'-end trimming of argonaute2-cleaved precursor micrornas. *Cell Rep.* (2013). doi:10.1016/j.celrep.2013.09.029
 35. Tang, X. *et al.* Acetylation of Drosha on the N-Terminus Inhibits Its Degradation by Ubiquitination. *PLoS One* **8**, (2013).
 36. Tang, X., Li, M., Tucker, L. & Ramratnam, B. Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β) phosphorylates the RNAase III enzyme Drosha at S300 and S302. *PLoS One* **6**, 1–6 (2011).
 37. Wada, T., Kikuchi, J. & Furukawa, Y. Histone deacetylase 1 enhances microRNA processing via deacetylation of DGCR8. *EMBO Rep.* **13**, 142–149 (2012).
 38. Cheng, T. L. *et al.* MeCP2 Suppresses Nuclear MicroRNA Processing and Dendritic Growth by Regulating the DGCR8/Drosha Complex. *Dev. Cell* **28**, 547–560 (2014).
 39. Qu, B. *et al.* Type I interferon inhibition of microRNA-146a maturation through up-regulation of monocyte chemotactic protein-induced protein 1 in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* **67**, 3209–3218 (2015).
 40. Tokumaru, S., Suzuki, M., Yamada, H., Nagino, M. & Takahashi, T. let-7 regulates Dicer expression and constitutes a negative feedback loop. *Carcinogenesis* **29**, 2073–2077 (2008).

41. Zeng, Y., Sankala, H., Zhang, X. & Graves, P. R. Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies. *Biochem. J.* **413**, 429–436 (2008).
42. Horman, S. R. *et al.* Akt-mediated phosphorylation of argonaute 2 downregulates cleavage and upregulates translational repression of MicroRNA targets. *Mol. Cell* (2013). doi:10.1016/j.molcel.2013.03.015
43. Smibert, P., Yang, J. S., Azzam, G., Liu, J. L. & Lai, E. C. Homeostatic control of Argonaute stability by microRNA availability. *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2013). doi:10.1038/nsmb.2606
44. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N. & Sonenberg, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: Are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* **9**, 102–114 (2008).
45. Barca-Mayo, O. & De Pietri Tonelli, D. *Convergent microRNA actions coordinate neocortical development. Cellular and Molecular Life Sciences* **71**, (2014).
46. Vasudevan, S., Tong, Y. & Steitz, J. A. Switching from repression to activation: MicroRNAs can up-regulate translation. *Science* (80-.). (2007). doi:10.1126/science.1149460
47. Ørom, U. A., Nielsen, F. C. & Lund, A. H. MicroRNA-10a Binds the 5'UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation. *Mol. Cell* **30**, 460–471 (2008).
48. Lal, A. *et al.* miR-24 Inhibits Cell Proliferation by Targeting E2F2, MYC, and Other Cell-Cycle Genes via Binding to 'Seedless' 3'UTR MicroRNA Recognition Elements. *Mol. Cell* (2009). doi:10.1016/j.molcel.2009.08.020
49. Hammond, S. M. An overview of microRNAs. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2015). doi:10.1016/j.addr.2015.05.001
50. Eulalio, A. *et al.* Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA* (2009). doi:10.1261/rna.1399509
51. Porrello, E. R. microRNAs in cardiac development and regeneration. *Clin. Sci.* (2013). doi:10.1042/CS20130011
52. Almeida, M. I., Reis, R. M. & Calin, G. A. MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **717**, 1–8 (2011).
53. Chen, Y. *et al.* Oncogenic and tumor suppressive roles of microRNAs in apoptosis and autophagy. *Apoptosis* (2014). doi:10.1007/s10495-014-0999-7
54. Leivonen, S. K. *et al.* High-throughput screens identify microRNAs essential for HER2 positive breast cancer cell growth. *Mol. Oncol.* **8**, 93–104 (2014).
55. Jeker, L. T. & Bluestone, J. A. MicroRNA regulation of T-cell differentiation and function.

- Immunological Reviews* (2013). doi:10.1111/imr.12061
56. Yang, Y., Yang, L., Liang, X. & Zhu, G. MicroRNA-155 Promotes Atherosclerosis Inflammation via Targeting SOCS1. *Cell. Physiol. Biochem.* (2015). doi:10.1159/000430303
 57. Calin, G. A. *et al.* Nonlinear partial differential equations and applications: Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 15524–15529 (2002).
 58. Edwards, J. K., Pasqualini, R., Arap, W. & Calin, G. A. MicroRNAs and ultraconserved genes as diagnostic markers and therapeutic targets in cancer and cardiovascular diseases. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **3**, 271–279 (2010).
 59. Nakasa, T. *et al.* Expression of MicroRNA-146 in Rheumatoid Arthritis Synovial Tissue. **58**, 1284–1292 (2009).
 60. Kim, J. *et al.* A microRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science* (80-.). (2007). doi:10.1126/science.1140481
 61. Luo, Y., Guo, Z. & Li, L. Evolutionary conservation of microRNA regulatory programs in plant flower development. *Dev. Biol.* **380**, 133–144 (2013).
 62. Ordas, A. *et al.* MicroRNA-146 function in the innate immune transcriptome response of zebrafish embryos to *Salmonella typhimurium* infection. *BMC Genomics* **14**, 1 (2013).
 63. Bernstein, E. *et al.* Dicer is essential for mouse development. *Nat. Genet.* **35**, 215–217 (2003).
 64. Cheng, S. *et al.* Age-dependent neuron loss is associated with impaired adult neurogenesis in forebrain neuron-specific Dicer conditional knockout mice. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (2014). doi:10.1016/j.biocel.2014.10.029
 65. Rosengauer, E. *et al.* Egr2::Cre Mediated Conditional Ablation of Dicer Disrupts Histogenesis of Mammalian Central Auditory Nuclei. *PLoS One* (2012). doi:10.1371/journal.pone.0049503
 66. Pan, Y., Balazs, L., Tigyi, G. & Yue, J. Conditional deletion of Dicer in vascular smooth muscle cells leads to the developmental delay and embryonic mortality. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2011). doi:10.1016/j.bbrc.2011.02.119
 67. Xia, J., Joyce, C. E., Bowcock, A. M. & Zhang, W. Noncanonical microRNAs and endogenous siRNAs in normal and psoriatic human skin. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 737–748 (2013).
 68. Ling, H. Y. *et al.* Changes in microrna (mir) profile and effects of mir-320 in insulin-

- resistant 3t3-l1 adipocytes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **36**, 32–39 (2009).
69. Chen, W. & Qin, C. General hallmarks of microRNAs in brain evolution and development of in Running head : General hallmarks of brain miRNAs. 701–708 (2015).
doi:10.1080/15476286.2015.1048954
 70. Li, L. *et al.* Location of transient ectodermal progenitor potential in mouse development. *Development* **140**, 4533–4543 (2013).
 71. Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M. & Noble-Haeusslein, L. J. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in Neurobiology* (2013).
doi:10.1016/j.pneurobio.2013.04.001
 72. Li, L. *et al.* Location of transient ectodermal progenitor potential in mouse development. *Development* **140**, 4533–4543 (2013).
 73. Huang, X. & Saint-Jeannet, J. P. Induction of the neural crest and the opportunities of life on the edge. *Dev. Biol.* **275**, 1–11 (2004).
 74. Keller, R. *et al.* Mechanisms of convergence and extension by cell intercalation. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **355**, 897–922 (2000).
 75. Copp, A. J. Neurulation in the cranial region - Normal and abnormal. *J. Anat.* **207**, 623–635 (2005).
 76. Ybot-Gonzalez, P., Cogram, P., Gerrelli, D. & Copp, A. J. Sonic hedgehog and the molecular regulation of mouse neural tube closure. *Development* **129**, 2507–2517 (2002).
 77. Yamashita, M. From neuroepithelial cells to neurons: Changes in the physiological properties of neuroepithelial stem cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **534**, 64–70 (2013).
 78. Paridaen, J. T. & Huttner, W. B. Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep.* **15**, 351–364 (2014).
 79. Kwan, K. Y., Sestan, N. & Anton, E. S. Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Development* **139**, 1535–1546 (2012).
 80. Suzuki, I. K. & Vanderhaeghen, P. Is this a brain which I see before me? Modeling human neural development with pluripotent stem cells. *Development* (2015).
doi:10.1242/dev.120568
 81. Clotman, F., Van Maele-Fabry, G. & Picard, J. J. Retinoic acid induces a tissue-specific deletion in the expression domain of Otx2. *Neurotoxicol. Teratol.* (1997).
doi:10.1016/S0892-0362(97)00017-2

82. Belgacem, Y., Hamilton, A., Shim, S., Spencer, K. & Borodinsky, L. The Many Hats of Sonic Hedgehog Signaling in Nervous System Development and Disease. *J. Dev. Biol.* **4**, 35 (2016).
83. Burke, a C., Nelson, C. E., Morgan, B. a & Tabin, C. Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology. *Development* (1995). doi:7768176
84. Quinonez, S. C. & Innis, J. W. Human HOX gene disorders. *Molecular Genetics and Metabolism* (2014). doi:10.1016/j.ymgme.2013.10.012
85. Parker, H. J. & Krumlauf, R. Segmental arithmetic: summing up the Hox gene regulatory network for hindbrain development in chordates. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* (2017). doi:10.1002/wdev.286
86. Uzquiano, A. *et al.* Cortical progenitor biology: key features mediating proliferation versus differentiation. *J. Neurochem.* (2018). doi:10.1111/jnc.14338
87. Englund, C. Pax6, Tbr2, and Tbr1 Are Expressed Sequentially by Radial Glia, Intermediate Progenitor Cells, and Postmitotic Neurons in Developing Neocortex. *J. Neurosci.* (2005). doi:10.1523/JNEUROSCI.2899-04.2005
88. Taverna, E. & Huttner, W. B. Neural progenitor nuclei IN motion. *Neuron* (2010). doi:10.1016/j.neuron.2010.08.027
89. Malatesta, P., Appolloni, I. & Calzolari, F. Radial glia and neural stem cells. *Cell and Tissue Research* (2008). doi:10.1007/s00441-007-0481-8
90. Taverna, E., Götz, M. & Huttner, W. B. The Cell Biology of Neurogenesis: Toward an Understanding of the Development and Evolution of the Neocortex. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* (2014). doi:10.1146/annurev-cellbio-101011-155801
91. Miyata, T. Development of three-dimensional architecture of the neuroepithelium: Role of pseudostratification and cellular ‘community’. *Dev. Growth Differ.* **50**, (2008).
92. Malatesta, P., Hartfuss, E. & Götz, M. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* (2000).
93. Pinto, L. & Götz, M. Radial glial cell heterogeneity-The source of diverse progeny in the CNS. *Progress in Neurobiology* (2007). doi:10.1016/j.pneurobio.2007.02.010
94. Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W. & Huttner, W. B. From The Cover: Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: A major site of neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2004). doi:10.1073/pnas.0308600100
95. Yamanishi, E., Yoon, K., Alberi, L., Gaiano, N. & Mizutani, K. I. NF- κ B signaling

- regulates the generation of intermediate progenitors in the developing neocortex. *Genes to Cells* (2015). doi:10.1111/gtc.12267
96. Louvi, A. & Artavanis-Tsakonas, S. Notch signalling in vertebrate neural development. *Nature Reviews Neuroscience* (2006). doi:10.1038/nrn1847
 97. Woodhead, G. J., Mutch, C. A., Olson, E. C. & Chenn, A. Cell-Autonomous beta-Catenin Signaling Regulates Cortical Precursor Proliferation. *J. Neurosci.* (2006). doi:10.1523/JNEUROSCI.3180-06.2006
 98. Hirabayashi, Y. *et al.* The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development* (2004). doi:10.1242/dev.01165
 99. Marin-Padilla, M. Dual origin of the mammalian neocortex and evolution of the cortical plate. *Anat. Embryol. (Berl)*. (1978). doi:10.1007/BF00315920
 100. Molliver, M. E., Kostović, I. & Van Der Loos, H. The development of synapses in cerebral cortex of the human fetus. *Brain Res.* **50**, 403–407 (1973).
 101. Kwan, K. Y., Sestan, N. & Anton, E. S. Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Development* **139**, 1535–1546 (2012).
 102. Hawthorne, A. L. Repurposing Reelin: The new role of radial glia, Reelin and Notch in motor neuron migration. *Exp. Neurol.* **256**, 17–20 (2014).
 103. Noctor, S. C., Martinez-Cerdeño, V., Ivic, L. & Kriegstein, A. R. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat. Neurosci.* **7**, 136–144 (2004).
 104. Hawthorne, A. L. Repurposing Reelin: The new role of radial glia, Reelin and Notch in motor neuron migration. *Exp. Neurol.* **256**, 17–20 (2014).
 105. Herrmann, K., Antonini, A. & Shatz, C. J. Ultrastructural Evidence for Synaptic Interactions between Thalamocortical Axons and Subplate Neurons. *Eur. J. Neurosci.* **6**, 1729–1742 (1994).
 106. Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Menezes, J. R. L. & Macklis, J. D. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 427–437 (2007).
 107. Yokota, Y. *et al.* Radial glial dependent and independent dynamics of interneuronal migration in the developing cerebral cortex. *PLoS One* **2**, (2007).
 108. Farhy-Tselnicker, I. & Allen, N. J. Astrocytes, neurons, synapses: A tripartite view on cortical circuit development. *Neural Development* (2018). doi:10.1186/s13064-018-0104-y
 109. Robichaux, M. A. & Cowan, C. W. Signaling mechanisms of axon guidance and early

- synaptogenesis. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* (2014). doi:10.1007/7854_2013_255
110. Allen, N. J. & Barres, B. A. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature* (2009). doi:10.1038/457675a
 111. Mitew, S. *et al.* Mechanisms regulating the development of oligodendrocytes and central nervous system myelin. *Neuroscience* (2014). doi:10.1016/j.neuroscience.2013.11.029
 112. Riccomagno, M. M. & Kolodkin, A. L. Sculpting Neural Circuits by Axon and Dendrite Pruning. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* (2015). doi:10.1146/annurev-cellbio-100913-013038
 113. Nowakowski, T. J., Mysiak, K. S., Pratt, T. & Price, D. J. Functional dicer is necessary for appropriate specification of radial glia during early development of mouse telencephalon. *PLoS One* (2011). doi:10.1371/journal.pone.0023013
 114. Demyanenko, G. P. *et al.* Abnormal neocortical development in mice lacking cGMP-dependent protein kinase I. *Dev. Brain Res.* (2005). doi:10.1016/j.devbrainres.2005.07.013
 115. Yamamoto, H. *et al.* Impairment of radial glial scaffold-dependent neuronal migration and formation of double cortex by genetic ablation of afadin. *Brain Res.* (2015). doi:10.1016/j.brainres.2015.05.012
 116. Rodriguez, M., Choi, J., Park, S. & Sockanathan, S. Gde2 regulates cortical neuronal identity by controlling the timing of cortical progenitor differentiation. *Development* **139**, 3870–3879 (2012).
 117. Leone, D. P., Srinivasan, K., Chen, B., Alcamo, E. & McConnell, S. K. The determination of projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Current Opinion in Neurobiology* (2008). doi:10.1016/j.conb.2008.05.006
 118. Kanner, L. Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child* **2**, 217–250 (1943).
 119. Asperger, H. Autistic psychopathy' in childhood (translated by Frith U). in *Frith U ed Autism and Asperger syndrome* 37–92 (1991).
 120. Wing, L. Asperger's syndrome: A clinical account. *Psychol. Med.* (1981). doi:10.1017/S0033291700053332
 121. Bourgeron, T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat. Rev. Neurosci.* **16**, 551–563 (2015).
 122. Ronemus, M., Iossifov, I., Levy, D. & Wigler, M. The role of de novo mutations in the genetics of autism spectrum disorders. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 133–141 (2014).
 123. Rutter, M. Diagnosis and definition of childhood autism. *J. Autism Child. Schizophr.* **8**, 139–161 (1978).

124. Geschwind, D. H. Advances in Autism. *Annu. Rev. Med.* **60**, 367–380 (2009).
125. Witmer, L. Retardation through Neglect in Children of Rich. *Psychol. Clin.* **1**, 157–179 (1907).
126. Daily, D. K., Ardinger, H. H. & Holmes, G. E. Identification and evaluation of mental retardation. *Am. Fam. Physician* (2000). doi:10.1128/mBio.01827-14.Editor
127. Lejeune, J., Gautier, M. & Turpin, R. Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *Comptes rendus des seances l'Academie des Sci.* (1959).
128. Chiurazzi, P. & Pirozzi, F. Advances in understanding – genetic basis of intellectual disability. *F1000Research* (2016). doi:10.12688/f1000research.7134.1
129. Schaaf, C. P. & Zoghbi, H. Y. Solving the Autism Puzzle a Few Pieces at a Time. *Neuron* **70**, 806–808 (2011).
130. Ellison, J. W., Rosenfeld, J. A. & Shaffer, L. G. Genetic Basis of Intellectual Disability. *Annu. Rev. Med.* **64**, 441–450 (2013).
131. Sebat, J. *et al.* Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* (80-.). (2007). doi:10.1126/science.1138659
132. Marshall, C. R. *et al.* Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *J. Hum. Genet.* 477–488 (2008). doi:10.1016/j.ajhg.2007.12.009.
133. Jacquemont, M. L. *et al.* Array-based comparative genomic hybridisation identifies high frequency of cryptic chromosomal rearrangements in patients with syndromic autism spectrum disorders. *J. Med. Genet.* **43**, 843–849 (2006).
134. Miller, D. T. *et al.* Consensus Statement: Chromosomal Microarray Is a First-Tier Clinical Diagnostic Test for Individuals with Developmental Disabilities or Congenital Anomalies. *Am. J. Hum. Genet.* **86**, 749–764 (2010).
135. Lugtenberg, D., Veltman, J. A. & Van Bokhoven, H. High-resolution genomic microarrays for X-linked mental retardation. *Genetics in Medicine* (2007). doi:10.1097/GIM.0b013e318149e647
136. Wright, C. F. *et al.* Genetic diagnosis of developmental disorders in the DDD study: A scalable analysis of genome-wide research data. *Lancet* (2015). doi:10.1016/S0140-6736(14)61705-0
137. Harris, S. W. *et al.* Autism Profiles of Males With Fragile X Syndrome. *Am. J. Ment. Retard.* (2008). doi:10.1352/2008.113:427-438
138. Moretti, P. & Zoghbi, H. Y. MeCP2 dysfunction in Rett syndrome and related disorders.

- Curr. Opin. Genet. Dev.* (2006). doi:10.1016/j.gde.2006.04.009
139. Vissers, L. E. L. M., Gilissen, C. & Veltman, J. A. Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nat. Rev. Genet.* (2015). doi:10.1038/nrg3999
 140. Coffee, B. *et al.* Incidence of Fragile X Syndrome by Newborn Screening for Methylated FMR1 DNA. *Am. J. Hum. Genet.* **85**, 503–514 (2009).
 141. Pieretti, M. *et al.* Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell* (1991). doi:10.1016/0092-8674(91)90125-I
 142. Berkel, S. *et al.* Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. *Nat. Genet.* **42**, 489–491 (2010).
 143. Durand, C. M. *et al.* Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat. Genet.* **39**, 25–27 (2007).
 144. Jamain, S. *et al.* Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat. Genet.* **34**, 27–29 (2003).
 145. Autism Genome Project, T. *et al.* Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat. Genet.* (2007). doi:10.1038/ng1985
 146. Iossifov, I. *et al.* De Novo Gene Disruptions in Children on the Autistic Spectrum. *Neuron* **74**, 285–299 (2012).
 147. Neale, B. M. *et al.* Spectrum Disorders. **485**, 242–245 (2013).
 148. Roak, B. J. O. *et al.* Genes in Autism Spectrum Disorders. **338**, 1619–1622 (2013).
 149. Grozeva, D. *et al.* Targeted Next-Generation Sequencing Analysis of 1,000 Individuals with Intellectual Disability. *Hum. Mutat.* **36**, 1197–1204 (2015).
 150. Heikura, U. *et al.* Variations in prenatal sociodemographic factors associated with intellectual disability: A study of the 20-year interval between two birth cohorts in Northern Finland. *Am. J. Epidemiol.* **167**, 169–177 (2008).
 151. Chapman, D. a, Scott, K. G. & Mason, C. a. Early risk factors for mental retardation: role of maternal age and maternal education. *Am. J. Ment. Retard.* (2002). doi:10.1352/0895-8017(2002)107<0046:ERFFMR>2.0.CO;2
 152. Tordjman, S. *et al.* Gene × environment interactions in autism spectrum disorders: Role of epigenetic mechanisms. *Front. Psychiatry* **5**, 1–17 (2014).
 153. Zerbo, O. *et al.* Maternal Infection during Pregnancy and Autism Spectrum Disorders. *J. Autism Dev. Disord.* **45**, 4015–4025 (2016).
 154. Clifford, A., Lang, L. & Chen, R. Effects of maternal cigarette smoking during pregnancy

- on cognitive parameters of children and young adults: A literature review. *Neurotoxicol. Teratol.* **34**, 560–570 (2012).
155. Mendola, P., Selevan, S. G., Gutter, S. & Rice, D. Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* (2002). doi:10.1002/mrdd.10033
 156. Williams, G. *et al.* Fetal valproate syndrome and autism: Additional evidence of an association. *Dev. Med. Child Neurol.* **43**, 202–206 (2001).
 157. Wong, C. C. Y. *et al.* Methylomic analysis of monozygotic twins discordant for autism spectrum disorder and related behavioural traits. *Mol. Psychiatry* (2014). doi:10.1038/mp.2013.41
 158. Gregory, S. G. *et al.* Genomic and epigenetic evidence for oxytocin receptor deficiency in autism. *BMC Med.* **7**, 1–13 (2009).
 159. Nardone, S. *et al.* DNA methylation analysis of the autistic brain reveals multiple dysregulated biological pathways. *Transl. Psychiatry* **4**, e433-9 (2014).
 160. Horvath, S. *et al.* Accelerated epigenetic aging in Down syndrome. *Aging Cell* **14**, 491–495 (2015).
 161. Kerkel, K. *et al.* Altered DNA methylation in leukocytes with trisomy 21. *PLoS Genet.* **6**, (2010).
 162. Vogel-Ciernia, A. & Wood, M. A. Neuron-specific chromatin remodeling: A missing link in epigenetic mechanisms underlying synaptic plasticity, memory, and intellectual disability disorders. *Neuropharmacology* (2014). doi:10.1016/j.neuropharm.2013.10.002
 163. Ropers, H. H. Genetics of Early Onset Cognitive Impairment. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **11**, 161–187 (2010).
 164. Ropers, H. H. Genetics of intellectual disability. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **18**, 241–250 (2008).
 165. O’Roak, B. J. *et al.* Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. *Science* (80-.). (2012). doi:10.1126/science.1227764
 166. O ’ Roak, B. J. *et al.* Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature* (2012). doi:10.1038/nature10989
 167. Ebrahimi-Fakhari, D. & Sahin, M. Autism and the synapse: Emerging mechanisms and mechanism-based therapies. *Current Opinion in Neurology* (2015). doi:10.1097/WCO.0000000000000186
 168. Schieve, L. A., Clayton, H. B., Durkin, M. S., Wingate, M. S. & Drews-Botsch, C.

- Comparison of Perinatal Risk Factors Associated with Autism Spectrum Disorder (ASD), Intellectual Disability (ID), and Co-occurring ASD and ID. *J. Autism Dev. Disord.* **45**, 2361–2372 (2015).
169. Betancur, C. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: More than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Res.* **1380**, 42–77 (2011).
 170. Chiurazzi, P. & Pirozzi, F. Advances in understanding – genetic basis of intellectual disability. *F1000Research* **5**, 599 (2016).
 171. Abernathy, D. G. & Yoo, A. S. MicroRNA-dependent genetic networks during neural development. *Cell and Tissue Research* (2015). doi:10.1007/s00441-014-1899-4
 172. O’Carroll, D. & Schaefer, A. General principals of miRNA biogenesis and regulation in the brain. *Neuropsychopharmacology* **38**, 39–54 (2013).
 173. Thiebes, K. P. *et al.* MiR-218 is essential to establish motor neuron fate as a downstream effector of Isl1-Lhx3. *Nat. Commun.* (2015). doi:10.1038/ncomms8718
 174. Jovičić, A. *et al.* Comprehensive expression analyses of neural cell-type-specific miRNAs identify new determinants of the specification and maintenance of neuronal phenotypes. *Ann. Intern. Med.* **158**, 5127–5137 (2013).
 175. Edbauer, D. *et al.* Regulation of Synaptic Structure and Function by FMRP-Associated MicroRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron* (2010). doi:10.1016/j.neuron.2010.01.005
 176. Cougot, N. *et al.* Dendrites of Mammalian Neurons Contain Specialized P-Body-Like Structures That Respond to Neuronal Activation. *J. Neurosci.* **28**, 13793–13804 (2008).
 177. Banerjee, S., Neveu, P. & Kosik, K. S. A Coordinated Local Translational Control Point at the Synapse Involving Relief from Silencing and MOV10 Degradation. *Neuron* (2009). doi:10.1016/j.neuron.2009.11.023
 178. Lugli, G., Larson, J., Martone, M. E., Jones, Y. & Smalheiser, N. R. Dicer and eIF2c are enriched at postsynaptic densities in adult mouse brain and are modified by neuronal activity in a calpain-dependent manner. *J. Neurochem.* (2005). doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03224.x
 179. Zhao, C. *et al.* MicroRNA let-7b regulates neural stem cell proliferation and differentiation by targeting nuclear receptor TLX signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 1876–1881 (2010).
 180. Zhao, C., Sun, G., Li, S. & Shi, Y. A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate determination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2009). doi:10.1038/nsmb.1576

181. Sun, G. *et al.* MiR-137 forms a regulatory loop with nuclear receptor TLX and LSD1 in neural stem cells. *Nat. Commun.* **2**, 510–529 (2011).
182. Ghosh, T. *et al.* MicroRNAs Establish Robustness and Adaptability of a Critical Gene Network to Regulate Progenitor Fate Decisions during Cortical Neurogenesis. *Cell Rep.* (2014). doi:10.1016/j.celrep.2014.05.029
183. Bian, S. *et al.* MicroRNA Cluster miR-17-92 Regulates Neural Stem Cell Expansion and Transition to Intermediate Progenitors in the Developing Mouse Neocortex. *Cell Rep.* (2013). doi:10.1016/j.celrep.2013.03.037
184. Abdullah, A. I., Zhang, H., Nie, Y., Tang, W. & Sun, T. CDK7 and miR-210 Co-regulate Cell-Cycle Progression of Neural Progenitors in the Developing Neocortex. *Stem Cell Reports* (2016). doi:10.1016/j.stemcr.2016.06.005
185. Rago, L., Beattie, R., Taylor, V. & Winter, J. MiR379-410 cluster miRNAs regulate neurogenesis and neuronal migration by fine-tuning N-cadherin. *EMBO J.* (2014). doi:10.1002/emboj.201386591
186. Gaughwin, P., Ciesla, M., Yang, H., Lim, B. & Brundin, P. Stage-specific modulation of cortical neuronal development by Mmu-miR-134. *Cereb. Cortex* **21**, 1857–1869 (2011).
187. Volvert, M. L. *et al.* MicroRNA targeting of CoREST controls polarization of migrating cortical neurons. *Cell Rep.* **7**, 1168–1183 (2014).
188. Lunyak, V. V. *et al.* Corepressor-dependent silencing of chromosomal regions encoding neuronal genes. *Science* (80-.). **298**, 1747–1752 (2002).
189. Franke, K. *et al.* miR-124-regulated RhoG reduces neuronal process complexity via ELMO/Dock180/Rac1 and Cdc42 signalling. *EMBO J.* **31**, 2908–2921 (2012).
190. Lippi, G. *et al.* MicroRNA-101 Regulates Multiple Developmental Programs to Constrain Excitation in Adult Neural Networks. *Neuron* **92**, 1337–1351 (2016).
191. Schratt, G. M. *et al.* A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* **439**, 283–289 (2006).
192. Olde Loohuis, N. F. M. *et al.* MicroRNA-137 Controls AMPA-Receptor-Mediated Transmission and mGluR-Dependent LTD. *Cell Rep.* **11**, 1876–1884 (2015).
193. Siegert, S. *et al.* The schizophrenia risk gene product miR-137 alters presynaptic plasticity. *Nat. Neurosci.* (2015). doi:10.1038/nn.4023
194. Ripke, S. *et al.* Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nat. Genet.* (2011). doi:10.1038/ng.940

195. Coolen, M., Katz, S. & Bally-Cuif, L. miR-9: a versatile regulator of neurogenesis. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, 1–11 (2013).
196. Tan, S. L., Ohtsuka, T., González, A. & Kageyama, R. MicroRNA9 regulates neural stem cell differentiation by controlling Hes1 expression dynamics in the developing brain. *Genes to Cells* **17**, 952–961 (2012).
197. Shibata, M., Nakao, H., Kiyonari, H., Abe, T. & Aizawa, S. MicroRNA-9 Regulates Neurogenesis in Mouse Telencephalon by Targeting Multiple Transcription Factors. *J. Neurosci.* (2011). doi:10.1523/JNEUROSCI.5085-10.2011
198. Coolen, M., Thieffry, D., Drivenes, Ø., Becker, T. S. & Bally-Cuif, L. MiR-9 Controls the Timing of Neurogenesis through the Direct Inhibition of Antagonistic Factors. *Dev. Cell* **22**, 1052–1064 (2012).
199. Zhao, J. *et al.* Ngn1 inhibits astrogliogenesis through induction of miR-9 during neuronal fate specification. *Elife* **4**, 1–11 (2015).
200. Yoo, A. S. *et al.* MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature* (2011). doi:10.1038/nature10323
201. Pedersen, M. E. *et al.* An epidermal microRNA regulates neuronal migration through control of the cellular glycosylation state. *Science* (80-.). (2013). doi:10.1126/science.1242528
202. Clovis, Y. M., Enard, W., Marinaro, F., Huttner, W. B. & De Pietri Tonelli, D. Convergent repression of Foxp2 3'UTR by miR-9 and miR-132 in embryonic mouse neocortex: implications for radial migration of neurons. *Development* **139**, 3332–3342 (2012).
203. Giusti, S. A. *et al.* MicroRNA-9 controls dendritic development by targeting REST. *Elife* **3**, 1–22 (2014).
204. Fiaschetti, G. *et al.* Epigenetic silencing of miRNA-9 is associated with HES1 oncogenic activity and poor prognosis of medulloblastoma. *Br. J. Cancer* (2014). doi:10.1038/bjc.2013.764
205. Wu, Z. *et al.* Increased expression of microRNA-9 predicts an unfavorable prognosis in human glioma. *Mol. Cell. Biochem.* (2013). doi:10.1007/s11010-013-1805-5
206. Grasso, M., Piscopo, P., Confaloni, A. & Denti, M. A. Circulating miRNAs as biomarkers for neurodegenerative disorders. TL - 19. *Molecules* (2014). doi:10.3390/molecules19056891
207. Romano, G. L. *et al.* MicroRNA target prediction in glaucoma. in *Progress in Brain Research*

- (2015). doi:10.1016/bs.pbr.2015.04.013
208. Nissan, X. *et al.* Unique preservation of neural cells in hutchinson- gilford progeria syndrome is due to the expression of the neural-specific miR-9 microRNA. *Cell Rep.* (2012). doi:10.1016/j.celrep.2012.05.015
 209. Krol, J. *et al.* Characterizing Light-Regulated Retinal MicroRNAs Reveals Rapid Turnover as a Common Property of Neuronal MicroRNAs. *Cell* **141**, 618–631 (2010).
 210. Nowakowski, T. J. *et al.* Loss of functional Dicer in mouse radial glia cell-autonomously prolongs cortical neurogenesis. *Dev. Biol.* **382**, 530–537 (2013).
 211. Mei, H., Lin, Z. Y. & Tong, Q. S. The roles of microRNAs in neuroblastoma. *World Journal of Pediatrics* (2014). doi:10.1007/s12519-014-0448-2
 212. Areeb, Z. *et al.* MicroRNA as potential biomarkers in Glioblastoma. *J. Neurooncol.* **125**, 237–248 (2015).
 213. MINN, Y.-K. *et al.* MicroRNA-200 family members and ZEB2 are associated with brain metastasis in gastric adenocarcinoma. *Int. J. Oncol.* **45**, 2403–2410 (2014).
 214. Hwang, S. J. *et al.* Overexpression of microRNA-95-3p suppresses brain metastasis of lung adenocarcinoma through downregulation of cyclin D1. *Oncotarget* **6**, 20434–20448 (2015).
 215. Rink, C. & Khanna, S. MicroRNA in ischemic stroke etiology and pathology. *Physiol. Genomics* (2011). doi:10.1152/physiolgenomics.00158.2010
 216. Vinciguerra, A. *et al.* MicroRNA-103-1 selectively downregulates brain NCX1 and its inhibition by anti-miRNA ameliorates stroke damage and neurological deficits. *Mol. Ther.* **22**, 1829–1838 (2014).
 217. Lau, P. *et al.* Alteration of the microRNA network during the progression of Alzheimer's disease. *EMBO Mol. Med.* **5**, 1613–1634 (2013).
 218. Abe, M. & Bonini, N. M. MicroRNAs and neurodegeneration: Role and impact. *Trends in Cell Biology* (2013). doi:10.1016/j.tcb.2012.08.013
 219. Bekris, L. M. *et al.* MicroRNA in Alzheimer's disease: an exploratory study in brain, cerebrospinal fluid and plasma. *Biomarkers* (2013). doi:10.3109/1354750X.2013.814073
 220. Chan, A. W. S. & Kocerha, J. The path to microRNA therapeutics in psychiatric and neurodegenerative disorders. *Front. Genet.* **3**, 1–10 (2012).
 221. Junn, E. *et al.* Repression of α -synuclein expression and toxicity by microRNA-7. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2009). doi:10.1073/pnas.0906277106
 222. Haramati, S. *et al.* miRNA malfunction causes spinal motor neuron disease. *Proc. Natl.*

- Acad. Sci.* (2010). doi:10.1073/pnas.1006151107
223. van Os, J. & Kapur, S. Schizophrenia. *The Lancet* (2009). doi:10.1016/S0140-6736(09)60995-8
 224. Wei, H. *et al.* Detection of circulating miRNA levels in schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* (2015). doi:10.1176/appi.ajp.2015.14030273
 225. Chang, C. Y., Chen, Y. W., Wang, T. W. & Lai, W. S. Akt1 deficiency modulates GABAergic functions and hippocampus-dependent functions. *Sci. Rep.* (2016). doi:10.1038/srep33095
 226. Gumerov, V. & Hegyi, H. MicroRNA-derived network analysis of differentially methylated genes in schizophrenia, implicating GABA receptor B1 [GABBR1] and protein kinase B [AKT1]. *Biol. Direct* (2015). doi:10.1186/s13062-015-0089-y
 227. Chen, W. *et al.* Mutation screening of brain-expressed X-chromosomal miRNA genes in 464 patients with nonsyndromic X-linked mental retardation. *Eur. J. Hum. Genet.* **15**, 375–378 (2007).
 228. Basu, S. N., Kollu, R. & Banerjee-Basu, S. AutDB: A gene reference resource for autism research. *Nucleic Acids Res.* (2009). doi:10.1093/nar/gkn835
 229. Marrale, M., Albanese, N. N., Cali, F. & Romano, V. Assessing the impact of copy number variants on miRNA Genes in autism by Monte Carlo simulation. *PLoS One* **9**, (2014).
 230. Qiao, Y. *et al.* MiRNA and miRNA target genes in copy number variations occurring in individuals with intellectual disability. *BMC Genomics* (2013). doi:10.1186/1471-2164-14-544
 231. Pandey, A. *et al.* Critical role of the miR-200 family in regulating differentiation and proliferation of neurons. *J. Neurochem.* **133**, 640–652 (2015).
 232. Fregeac, J., Colleaux, L. & Nguyen, L. S. L. S. The emerging roles of MicroRNAs in autism spectrum disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **71**, 729–738 (2016).
 233. Tuck-Muller, C. M. *et al.* DNA hypomethylation and unusual chromosome instability in cell lines from ICF syndrome patients. *Cytogenet Cell Genet* (2000). doi:15590
 234. Saferali, A. *et al.* Cell culture-induced aberrant methylation of the imprinted IG DMR in human lymphoblastoid cell lines. *Epigenetics* (2010). doi:10.4161/epi.5.1.10436
 235. Lopez-Atalaya, J. P. *et al.* Histone acetylation deficits in lymphoblastoid cell lines from patients with rubinstein-Taybi syndrome. *J. Med. Genet.* (2012). doi:10.1136/jmedgenet-2011-100354

236. Li, J. Z. *et al.* Systematic changes in gene expression in postmortem human brains associated with tissue pH and terminal medical conditions. *Hum. Mol. Genet.* (2004). doi:10.1093/hmg/ddh065
237. Mackay-Sim, A. Concise review: Patient-derived olfactory stem cells: New models for brain diseases. *Stem Cells* (2012). doi:10.1002/stem.1220
238. Borgmann-Winter, K. *et al.* Translational potential of olfactory mucosa for the study of neuropsychiatric illness. *Translational Psychiatry* (2015). doi:10.1038/tp.2014.141
239. Nguyen, L. S. *et al.* Profiling olfactory stem cells from living patients identifies miRNAs relevant for autism pathophysiology. *Mol. Autism* **7**, (2016).
240. Tan, Y. Y., Xu, X. Y., Wang, J. F., Zhang, C. W. & Zhang, S. C. MiR-654-5p attenuates breast cancer progression by targeting EPSTI1. *Am. J. Cancer Res.* (2016). doi:27186421
241. Laddha, S. V. *et al.* Genome-wide analysis reveals downregulation of miR-379/miR-656 cluster in human cancers. *Biol. Direct* (2013). doi:10.1186/1745-6150-8-10
242. Qiu, D. & Sun, Y.-C. Overexpression of miR-221 inhibits proliferation and promotes apoptosis of human astrocytoma cells. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* (2015).
243. Tsai, P. C. *et al.* Serum microRNA-21 and microRNA-221 as potential biomarkers for cerebrovascular disease. *J. Vasc. Res.* (2013). doi:10.1159/000351767
244. Manzine, P. R. *et al.* MicroRNA 221 Targets ADAM10 mRNA and is Downregulated in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* (2018). doi:10.3233/JAD-170592
245. Delphin, N. *et al.* Intellectual disability associated with retinal dystrophy in the Xp11.3 deletion syndrome: ZNF674 on trial. Guilty or innocent. *Eur. J. Hum. Genet.* (2012). doi:10.1038/ejhg.2011.217
246. He, F. *et al.* Modulation of miR-146a/complement factor H-mediated inflammatory responses in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Biosci Rep* (2016). doi:10.1042/BSR20160290
247. Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K.-J. & Baltimore, D. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2006). doi:10.1073/pnas.0605298103
248. Jiang, M. *et al.* Dysregulated expression of miR-146a contributes to age-related dysfunction of macrophages. *Aging Cell* **11**, 29–40 (2012).
249. Li, Z. *et al.* Oxidized low-density lipoprotein upregulates microRNA-146a via JNK and NF- κ B signaling. *Mol. Med. Rep.* **13**, 1709–1716 (2016).

250. Motsch, N., Pfuhl, T., Mrazek, J., Barth, S. & Grässer, F. A. Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) induces the expression of the cellular microRNA miR-146a. *RNA Biol.* **4**, 131–137 (2007).
251. Chang, T. C. *et al.* Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat. Genet.* **40**, 43–50 (2008).
252. Sun, X. *et al.* miR-146a is directly regulated by STAT3 in human hepatocellular carcinoma cells and involved in anti-tumor immune suppression. *Cell Cycle* **14**, 243–52 (2015).
253. Luo, X. *et al.* A functional variant in microRNA-146a promoter modulates its expression and confers disease risk for systemic lupus erythematosus. *PLoS Genet.* **7**, (2011).
254. Hwang, W. L. *et al.* MicroRNA-146a directs the symmetric division of Snail-dominant colorectal cancer stem cells. *Nat. Cell Biol.* **16**, 268–280 (2014).
255. Lu, Y., Cao, D. L., Jiang, B. C., Yang, T. & Gao, Y. J. MicroRNA-146a-5p attenuates neuropathic pain via suppressing TRAF6 signaling in the spinal cord. *Brain. Behav. Immun.* **49**, 119–129 (2015).
256. Doxaki, C., Kampranis, S. C., Eliopoulos, A. G., Spilianakis, C. & Tsatsanis, C. Coordinated Regulation of miR-155 and miR-146a Genes during Induction of Endotoxin Tolerance in Macrophages. *J. Immunol.* **195**, 5750–5761 (2015).
257. Cui, L. *et al.* A functional polymorphism in the promoter region of microRNA-146a is associated with the risk of alzheimer disease and the rate of cognitive decline in patients. *PLoS One* **9**, (2014).
258. Cui, L. *et al.* A functional polymorphism of the microRNA-146a gene is associated with susceptibility to drug-resistant epilepsy and seizures frequency. *Seizure* (2015). doi:10.1016/j.seizure.2015.02.032
259. Forloni, M. *et al.* miR-146a promotes the initiation and progression of melanoma by activating Notch signaling. *Elife* **2014**, 1–20 (2014).
260. Gao, J. *et al.* Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces the expression of proinflammatory cytokines in macrophages and re-educates tumor-associated macrophages to an antitumor phenotype. *Mol. Biol. Cell* **26**, 3178–3189 (2015).
261. Wang, X. *et al.* Demethylation of the miR-146a promoter by 5-Aza-2'-deoxycytidine correlates with delayed progression of castration-resistant prostate cancer. *BMC Cancer* **14**, 1–11 (2014).
262. Bhaumik, D. *et al.* Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with

- reduction of metastatic potential in breast cancer cells. *Oncogene* (2008).
doi:10.1038/onc.2008.171
263. Zhao, J. L. & Starczynowski, D. T. Role of microRNA-146a in normal and malignant hematopoietic stem cell function. *Front. Genet.* **5**, 1–6 (2014).
 264. Macias, M. J., Martin-Malpartida, P. & Massagué, J. Structural determinants of Smad function in TGF- β signaling. *Trends in Biochemical Sciences* (2015).
doi:10.1016/j.tibs.2015.03.012
 265. Cheung, K. S. C. *et al.* MicroRNA-146a regulates human foetal femur derived skeletal stem cell differentiation by down-regulating SMAD2 and SMAD3. *PLoS One* **9**, 1–16 (2014).
 266. Sun, Y. *et al.* MIR-146a-5p acts as a negative regulator of TGF- β signaling in skeletal muscle after acute contusion. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. (2017).
doi:10.1093/abbs/gmx052
 267. Hwang, S. J. *et al.* MicroRNA-146a suppresses metastatic activity in brain metastasis. *Mol. Cells* (2012). doi:10.1007/s10059-012-0171-6
 268. Hayward, P., Kalmar, T. & Martinez Arias, A. Wnt/Notch signalling and information processing during development. *Development* (2008). doi:10.1242/dev.000505
 269. Kwon, C. *et al.* Notch post-translationally regulates β -catenin protein in stem and progenitor cells. *Nat. Cell Biol.* (2011). doi:10.1038/ncb2313
 270. Liu, R., Li, W. & Wu, C. A functional polymorphism in the pre-miR-146a gene influences the prognosis of glioblastoma multiforme by interfering with the balance between Notch1 and Notch2. *Mol. Med. Rep.* **12**, 5475–5481 (2015).
 271. Kuang, W. *et al.* Cyclic stretch induced miR-146a upregulation delays C2C12 myogenic differentiation through inhibition of Numb. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2009).
doi:10.1016/j.bbrc.2008.11.041
 272. Ghorpade, D. S., Sinha, A. Y., Holla, S., Singh, V. & Balaji, K. N. NOD2-nitric oxide-responsive microRNA-146a activates Sonic hedgehog signaling to orchestrate inflammatory responses in murine model of inflammatory bowel disease. *J. Biol. Chem.* **288**, 33037–33048 (2013).
 273. Paik, J. H. *et al.* MicroRNA-146a downregulates NF κ B activity via targeting TRAF6 and functions as a tumor suppressor having strong prognostic implications in NK/T cell lymphoma. *Clin. Cancer Res.* **17**, 4761–4771 (2011).
 274. Xiao, B. *et al.* Increased miR-146a in gastric cancer directly targets SMAD4 and is involved

- in modulating cell proliferation and apoptosis. *Oncol. Rep.* (2012).
doi:10.3892/or.2011.1514
275. Mei, J., Bachoo, R. & Zhang, C.-L. MicroRNA-146a Inhibits Glioma Development by Targeting Notch1. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 3584–3592 (2011).
 276. Xu, W. D., Lu, M. M., Pan, H. F. & Ye, D. Q. Association of microRNA-146a with autoimmune diseases. *Inflammation* (2012). doi:10.1007/s10753-012-9467-0
 277. Zhao, J. L. *et al.* NF- B dysregulation in microRNA-146a-deficient mice drives the development of myeloid malignancies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 9184–9189 (2011).
 278. Alexandrov, P. N., Dua, P. & Lukiw, W. J. Up-regulation of miRNA-146a in progressive, age-related inflammatory neurodegenerative disorders of the human CNS. *Front. Neurol.* (2014). doi:10.3389/fneur.2014.00181
 279. Lukiw, W. J., Zhao, Y. & Jian, G. C. An NF- κ B-sensitive micro RNA-146a-mediated inflammatory circuit in alzheimer disease and in stressed human brain cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 31315–31322 (2008).
 280. Tao, H. *et al.* Intranasal Delivery of miR-146a Mimics Delayed Seizure Onset in the Lithium-Pilocarpine Mouse Model. *Mediators Inflamm.* (2017). doi:10.1155/2017/6512620
 281. Wang, L. *et al.* The role of miR-146a in dorsal root ganglia neurons of experimental diabetic peripheral neuropathy. *Neuroscience* **259**, 155–163 (2014).
 282. Jia, L. *et al.* MicroRNA 146a locally mediates distal axonal growth of dorsal root ganglia neurons under high glucose and sildenafil conditions. *Neuroscience* (2016).
doi:10.1016/j.neuroscience.2016.05.005
 283. Zhou, X. *et al.* MicroRNA-146a down-regulation correlates with neuroprotection and targets pro-apoptotic genes in cerebral ischemic injury in vitro. *Brain Res.* **1648**, 136–143 (2016).
 284. Chen, Y.-L. & Shen, C.-K. J. Modulation of mGluR-Dependent MAP1B Translation and AMPA Receptor Endocytosis by MicroRNA miR-146a-5p. *J. Neurosci.* **33**, 9013–9020 (2013).
 285. Guo, Q. *et al.* Forced miR-146a expression causes autoimmune lymphoproliferative syndrome in mice via downregulation of Fas in germinal center B cells Forced miR-146a expression causes autoimmune lymphoproliferative syndrome in mice via downregulation of Fas in germinal . **121**, 4875–4884 (2013).
 286. García-Marqués, J. & López-Mascaraque, L. Clonal identity determines astrocyte cortical

- heterogeneity. *Cereb. Cortex* (2013). doi:10.1093/cercor/bhs134
287. Molofsky, A. V. & Deneen, B. Astrocyte development: A Guide for the Perplexed. *Glia* **63**, 1320–1329 (2015).
 288. Bayraktar, O. A., Fuentealba, L. C., Alvarez-Buylla, A. & Rowitch, D. H. Astrocyte development and heterogeneity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, 1–16 (2015).
 289. Schitine, C., Nogaroli, L., Costa, M. R. & Hedin-Pereira, C. Astrocyte heterogeneity in the brain: from development to disease. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 1–11 (2015).
 290. Molofsky, A. V. *et al.* Astrocytes and disease: A neurodevelopmental perspective. *Genes Dev.* **26**, 891–907 (2012).
 291. Vasile, F., Dossi, E. & Rouach, N. Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Struct. Funct.* **222**, 2017–2029 (2017).
 292. Chapouly, C. *et al.* Astrocytic TYMP and VEGFA drive blood-brain barrier opening in inflammatory central nervous system lesions. *Brain* **138**, 1548–1567 (2015).
 293. Sofroniew, M. V. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nature Reviews Neuroscience* (2015). doi:10.1038/nrn3898
 294. Pekny, M. *et al.* Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol.* **131**, 323–345 (2016).
 295. Verkhratsky, A., Nedergaard, M. & Hertz, L. Why are Astrocytes Important? *Neurochem. Res.* **40**, 389–401 (2014).
 296. Sloan, S. A. & Barres, B. A. Mechanisms of astrocyte development and their contributions to neurodevelopmental disorders. *Current Opinion in Neurobiology* (2014). doi:10.1016/j.conb.2014.03.005
 297. Jacobs, S., Nathwani, M. & Doering, L. C. Fragile X astrocytes induce developmental delays in dendrite maturation and synaptic protein expression. *BMC Neurosci.* **11**, 132 (2010).
 298. Ballas, N., Liou, D. T., Grunseich, C. & Mandel, G. Non-cell autonomous influence of MeCP2-deficient glia on neuronal dendritic morphology. *Nat. Neurosci.* **12**, 311–317 (2009).
 299. Okabe, Y. *et al.* Alterations of gene expression and glutamate clearance in astrocytes derived from an MeCP2-null mouse model of Rett syndrome. *PLoS One* (2012). doi:10.1371/journal.pone.0035354
 300. Perez-Alvarez, A., Navarrete, M., Covelo, A., Martin, E. D. & Araque, A. Structural and Functional Plasticity of Astrocyte Processes and Dendritic Spine Interactions. *J. Neurosci.*

- 34**, 12738–12744 (2014).
301. Achour, S. Ben & Pascual, O. Astrocyte-neuron communication: Functional consequences. *Neurochem. Res.* **37**, 2464–2473 (2012).
 302. Eroglu, C. & Barres, B. A. Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature* **468**, 223–231 (2015).
 303. Allen, N. J. Astrocyte Regulation of Synaptic Behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**, 439–463 (2014).
 304. Blondel, O. *et al.* A glia-derived signal regulating neuronal differentiation. *J. Neurosci.* **20**, 8012–8020 (2000).
 305. Ullian, E. M., Sapperstein, S. K., Christopherson, K. S. & Barres, B. A. Control of synapse number by glia. *Science (80-.)*. **291**, 657–661 (2001).
 306. Sofroniew, M. V. *et al.* Genetically-targeted and conditionally-regulated ablation of astroglial cells in the central, enteric and peripheral nervous systems in adult transgenic mice. *Brain Res.* **835**, 91–95 (1999).
 307. Delaney, C. L., Brenner, M. & Messing, a. Conditional ablation of cerebellar astrocytes in postnatal transgenic mice. *J. Neurosci.* **16**, 6908–6918 (1996).
 308. Beattie, E. C. Control of Synaptic Strength by Glial TNFalpha. *Science (80-.)*. **295**, 2282–2285 (2002).
 309. Kucukdereli, H. *et al.* Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, E440–E449 (2011).
 310. López-Bayghen, E. & Ortega, A. Glial glutamate transporters: New actors in brain signaling. *IUBMB Life* **63**, 816–823 (2011).
 311. Murphy-Royal, C., Dupuis, J., Groc, L. & Oliet, S. H. R. Astroglial glutamate transporters in the brain: Regulating neurotransmitter homeostasis and synaptic transmission. *J. Neurosci. Res.* **95**, 2140–2151 (2017).
 312. Danbolt, N. C., Storm-Mathisen, J. & Kanner, B. I. An [Na⁺⁺ K⁺]coupled l-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes. *Neuroscience* **51**, 295–310 (1992).
 313. Haugeto, Ø. *et al.* Brain Glutamate Transporter Proteins Form Homomultimers *. **271**, 27715–27722 (1996).
 314. Tanaka, K., Watase, K., Manabe, T. & Yamada, K. Epilepsy and Exacerbation of Brain Injury in Mice Lacking the Glutamate Transporter GLT-1 Epilepsy and Exacerbation of

- Brain Injury in Mice Lacking the Glutamate Transporter GLT-1. *Situ* **1699**, 1699–1703 (2009).
315. Petr, G. T. *et al.* Conditional Deletion of the Glutamate Transporter GLT-1 Reveals That Astrocytic GLT-1 Protects against Fatal Epilepsy While Neuronal GLT-1 Contributes Significantly to Glutamate Uptake into Synaptosomes. *J. Neurosci.* **35**, 5187–5201 (2015).
 316. Watase, K. *et al.* Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur. J. Neurosci.* **10**, 976–988 (1998).
 317. Rothstein, J. D., Van Kammen, M., Levey, a I., Martin, L. J. & Kuncl, R. W. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **38**, 73–84 (1995).
 318. Chung, E. K. Y., Chen, L. W., Chan, Y. S. & Yung, K. K. L. Downregulation of glial glutamate transporters after dopamine denervation in the striatum of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J. Comp. Neurol.* **511**, 421–437 (2008).
 319. Takahashi, K., Foster, J. B. & Lin, C.-L. G. Glutamate transporter EAAT2: regulation, function, and potential as a therapeutic target for neurological and psychiatric disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 3489–3506 (2015).
 320. Jacob, C. P. *et al.* Alterations in expression of glutamatergic transporters and receptors in sporadic Alzheimer ' s disease Alterations in Expression of Glutamatergic Transporters and Receptors in Sporadic Alzheimer ' s Disease. *J. Alzheimer's Dis.* **11**, 97–116 (2007).
 321. Lauriat, T. L. & McInnes, L. A. EAAT2 regulation and splicing: Relevance to psychiatric and neurological disorders. *Mol. Psychiatry* **12**, 1065–1078 (2007).
 322. Higashimori, H. *et al.* Selective Deletion of Astroglial FMRP Dysregulates Glutamate Transporter GLT1 and Contributes to Fragile X Syndrome Phenotypes In Vivo. *J. Neurosci.* **36**, 7079–7094 (2016).
 323. Xu, S. *et al.* Characterization of 11p14-p12 deletion in WAGR syndrome by array CGH for identifying genes contributing to mental retardation and autism. *Cytogenet. Genome Res.* **122**, 181–187 (2008).
 324. Bristot Silvestrin, R. *et al.* Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Altered glutamate metabolism in the hippocampus. *Brain Res.* **1495**, 52–60 (2013).
 325. Iyer, A. *et al.* MicroRNA-146a: A Key Regulator of Astrocyte-Mediated Inflammatory Response. *PLoS One* **7**, 17–19 (2012).

326. Erhard, F. *et al.* Widespread context dependency of microRNA-mediated regulation. *Genome Res.* (2014). doi:10.1101/gr.166702.113
327. Diniz, L. P. *et al.* Astrocyte-induced synaptogenesis is mediated by transforming growth factor β signaling through modulation of d-serine levels in cerebral cortex neurons. *J. Biol. Chem.* **287**, 41432–41445 (2012).
328. Yu, C. Y. *et al.* Neuronal and astroglial TGF β -Smad3 signaling pathways differentially regulate dendrite growth and synaptogenesis. *NeuroMolecular Med.* **16**, 457–472 (2014).
329. Liu, Z. *et al.* MicroRNA-146a modulates TGF- β 1-induced phenotypic differentiation in human dermal fibroblasts by targeting SMAD4. *Arch. Dermatol. Res.* **304**, 195–202 (2012).
330. He, Y. *et al.* MicroRNA-146a modulates TGF-beta1-induced hepatic stellate cell proliferation by targeting SMAD4. *Cell. Signal.* **24**, 1923–1930 (2012).
331. Zhang, Z., Zhang, Y., Sun, X. X., Ma, X. & Chen, Z. N. MicroRNA-146a inhibits cancer metastasis by downregulating VEGF through dual pathways in hepatocellular carcinoma. *Mol. Cancer* **14**, 1–15 (2015).
332. Ye, E. A. & Steinle, J. J. miR-146a suppresses STAT3/VEGF pathways and reduces apoptosis through IL-6 signaling in primary human retinal microvascular endothelial cells in high glucose conditions. *Vision Res.* **139**, 15–22 (2017).
333. Li, Z. *et al.* Overexpression and knockout of miR-126 both promote leukemogenesis. *Blood* (2015). doi:10.1182/blood-2015-04-639062
334. Song, A. J. & Palmiter, R. D. Detecting and Avoiding Problems When Using the Cre-lox System. *Trends in Genetics* (2018). doi:10.1016/j.tig.2017.12.008
335. Yang, Y. *et al.* Presynaptic Regulation of Astroglial Excitatory Neurotransmitter Transporter GLT1. *Neuron* (2009). doi:10.1016/j.neuron.2009.02.010
336. Sampaio, A. *et al.* Williams syndrome and memory: A neuroanatomic and cognitive approach. *J. Autism Dev. Disord.* (2010). doi:10.1007/s10803-010-0940-z
337. Estey, C. M. *et al.* A Subset of Dogs with Presumptive Idiopathic Epilepsy Show Hippocampal Asymmetry: A Volumetric Comparison with Non-Epileptic Dogs Using MRI. *Front. Vet. Sci.* (2017). doi:10.3389/fvets.2017.00183
338. Sun, Y., Luo, Z.-M., Guo, X.-M., Su, D.-F. & Liu, X. An updated role of microRNA-124 in central nervous system disorders: a review. *Front. Cell. Neurosci.* (2015). doi:10.3389/fncel.2015.00193
339. Åkerblom, M., Sachdeva, R. & Jakobsson, J. Functional studies of microRNAs in neural

stem cells: Problems and perspectives. *Frontiers in Neuroscience* (2012).
doi:10.3389/fnins.2012.00014

340. Urduingio, R. G. *et al.* Disrupted microrna expression caused by Mecp2 loss in a mouse model of Rett syndrome. *Epigenetics* (2010). doi:10.4161/epi.5.7.13055