HAL
open science

Compréhension des mécanismes physiopathologiques des malformations du développement cortical associées à des mutations dans les gènes KIF2A et NEDD4L

Loïc Broix

To cite this version:

Loïc Broix. Compréhension des mécanismes physiopathologiques des malformations du développement cortical associées à des mutations dans les gènes KIF2A et NEDD4L. Neurobiologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB103 . tel-02145762

HAL Id: tel-02145762

https://theses.hal.science/tel-02145762v1

Submitted on 3 Jun 2019

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.

THESE DE DOCTORAT
UNIVERSITE PARIS DESCARTES – PARIS V

Spécialité : Neurosciences
Ecole Doctorale : Bio Sorbonne Paris Cité – BioSPC

Présentée par
Loïc BROIX

En vue de l'obtention du grade de
Docteur de l'Université Paris Descartes – Paris V

Titre de la thèse :

Compréhension des Mécanismes Physiopathologiques des Malformations du Développement Cortical Associées à des Mutations dans les Gènes *KIF2A* et *NEDD4L*

Soutenue le jeudi 24 novembre 2016,

Devant le Jury composé de :

Dr. Pascale BOMONT	Rapporteur
Dr. Sandrine HUMBERT	Rapporteur
Dr. Alfonso REPRESA	Examinateur
Dr. Pascal DOLLE	Examinateur
Pr. Jamel CHELLY	Directeur de thèse

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 11

A. Le développement cortical 12

1. La neurogenèse 14
1.1 Les cellules de Cajal-Retzius 15
1.2 Les différents types de progéniteurs corticaux 16
1.2.1 Les progéniteurs apicaux 17
a- Les cellules neuroépithéliales 17
b- Les cellules gliales radiaires apicales 18
c- Les progéniteurs intermédiaires apicaux 19
1.2.2 Les progéniteurs apicaux 20
a- Les progéniteurs intermédiaires basaux 20
b- Les cellules gliales radiaires basales 20
1.3 Mécanismes de régulation de la neurogenèse 21
1.3.1 Organisation subcellulaire des progéniteurs neuronaux 22
a- Le fuseau mitotique et son orientation 22
b- Le domaine apical 23
b-1 Le complexe Par3/Par6/aPKC 25
b-4 Jonctions adhérentes 25
b-3 Cil primaire et centrosomes 27
b-4 Relocalisation de l'appareil de Golgi 31
c- Le prolongement basal 32
1.3.2 La cinétique du cycle cellulaire 32
a- La migration nucléaire intercinétique 32
b- La longueur du cycle cellulaire 34
1.3.3 Signalisations cellulaires impliquées dans la neurogenèse 35
a- La voie de signalisation Notch 35

b- La voie de signalisation Wnt/ß-Caténine 36
c- La voie de signalisation Shh 37
d- La voie de signalisation mTOR 38
1.3.4 Régulations transcriptionnelles 40
1.3.5 Mécanismes épigénétiques 42
1.3.6 L'environnement des progéniteurs 41
1.3.6 Le rôle de l'ubiquitination 45
a- Contrôle de la signalisation Notch par les E3 ligases MIB1 et HUWE1 47
b- Cdh1/APC et la régulation du cycle cellulaire 49
c- TRIM11 et la régulation de gènes pro-neurogéniques 49
1.4 Génération de la diversité neuronale 50

2. La migration neuronale radiaire 56
2.1 Généralités 56
2.2 Les étapes séquentielles de la migration neuronale 57
2.3 Les processus cellulaires impliqués dans la locomotion 59
2.4 Mécanismes moléculaires de régulation de la migration neuronale 60
2.4.1 Le réseau de microtubules et ses protéines associées 60
a- Le complexe Lis1/Ndel1/Dynéine 61
b- Doublecortine 63
c- Les kinésines 64
d- Les tubulines 66
e- Le centrosome 68
f- Les modifications post-traductionnelles des tubulines 69
2.4.2 Le cytosquelette d'actine et ses protéines associées 70
a- La Filamine-A 70
b- La famille Ena/VASP 71
c- La protéine motrice Myosine II 71
2.4.3 Le lien entre les réseaux d'actine et de microtubules 72
2.4.4 Cdk5, une kinase clé pour la régulation de la migration neuronale 73
2.4.5 Les signaux extracellulaires impliqués dans la migration neuronale 74
a- Les signaux de guidage longue distance 74

b- La signalisation Reelin, un modèle de convergence de voies de signalisation 75
b-1 La voie Dab1-Crk-Rap1 76
b-2 La voie Dab1-PI3K-Akt 78
b-3 Régulation de Dab1 par le système ubiquitine/protéasome 80
2.4.6 Rab, Arf et le trafic membranaire intracellulaire 83
2.4.7 Le cil primaire 84
2.4.8 Les régulations épigénétiques et post-transcriptionnelles 86
a- Mécanismes épigénétiques 86
b- Les régulations post-transcriptionnelles 87
b-1 Les microARN 87
b-2 L'épissage alternatif 88

3. Mise en place des connectivités par croissance et guidage axonal 90
3.1 Généralités 90
3.2 Mécanismes cellulaires et moléculaires de la croissance axonale 92
3.3 Mécanismes de guidage axonal 94

B. Malformations du développement cortical 96

1. Généralités 96

2. Anomalies de la taille du cerveau 97
2.1 Microcéphalie 97
2.2 Mégalencéphalie 98

3. Anomalies de la gyration corticale 99
3.1 Lissencéphalie classique et hétérotope laminaire sous-corticale 99
3.2 Polymicrogyrie 100

4. Ectopies 100
4.1 Lissencéphalie type II ou pavimenteuse 100
4.2 Hétérotopie nodulaire périventriculaire 101

RESULTATS 104

1. Article 1 : Des mutations dans les gènes *TUBG1*, *DYNC1H1*, *KIF5C* et *KIF2A* sont responsables de malformations du développement cortical et de microcéphalies..... 106

2. Article 2 : Les mutations dans le gène *KIF2A* responsables de malformations du développement cortical altèrent la ciliogenèse, la migration neuronale et la prolifération des progéniteurs 107

3. Article 3 : Des mutations dans le domaine HECT de *NEDD4L* mènent à des dérégulations des voies AKT-mTOR et sont responsables d'hétérotopies nodulaires périventriculaires.... 108

4. Article 4 : Les isoformes de tubulines β ne sont pas interchangeables pour restaurer l'altération de la migration radiaire due à l'inactivation de Tubb3 109

DISCUSSION 110

A. NEDD4L, mécanismes moléculaires des mutations et altération des voies de signalisation mTOR-AKT et TGFβ-Smad2/3 112

1. Un nouveau mécanisme moléculaire responsable de pathologies humaines 112

2. Différentes voies de signalisation altérées entre l'excès de NEDD4L et l'expression des mutants 115

2.1 L'excès de NEDD4L sauvage et les voies mTORC1-Dab1 116

2.2 L'expression des mutants NEDD4L associées à des HNP et les voies mTOR-AKT et TGFβ-Smad2/3..... 117

3. Quels sont les mécanismes à l'origine de ces différences ?..... 120

3.1 Une implication de la monoubiquitination? 120

3.2 Une modulation différentielle de l'activité de NEDD4L ?..... 122

B. KIF2A, classification des MDC et ciliogenèse 123

1. Une classification des MDC basée sur les processus biologiques affectés 123

1.1 Un gène - une malformation?..... 124

1.2 Une fonction - un mécanisme - une malformation?..... 125

2. Couplage cil primaire et cycle cellulaire et régulation de la neurogenèse..... 127

2.1 Le rôle des kinésines à activité microtubule dépolymérase dans le désassemblage du cil primaire 127

2.2 Le couplage entre le désassemblage du cil primaire et la progression dans le cycle cellulaire dans les progéniteurs neuronaux 129

2.3 L'émergence du rôle du sytème ubiquitine/protéasome dans la régulation de la ciliogenèse 131

C. Hypothèse unificatrice des mécanismes physiopathologiques 132

BIBLIOGRAPHIE 134

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Régionalisation anatomique du cerveau antérieur en développement chez la souris 12
Figure 2 : Schéma d'une coupe coronale d'un hémisphère cérébral de souris en développement 14
Figure 3 : La vitesse de migration des cellules CR contrôle la taille des aires corticales d'ordre supérieur 16
Figure 4 : Les différents types de progéniteurs dans le cortex en développement chez des espèces lissencéphale et gyrencéphale 17
Figure 5 : Les différents modes de divisions des progéniteurs neuronaux 22
Figure 6 : Modèle de la division symétrique/asymétrique selon le plan de clivage du fuseau mitotique 23
Figure 7 : Les différents modes de division des progéniteurs neuronaux sont déterminés par l'orientation du fuseau mitotique et l'héritage des déterminants moléculaires du destin cellulaire 24
Figure 8 : Modèle de la régulation de la prolifération des progéniteurs neuronaux par interaction entre cellules via la N-Cadhérine 26
Figure 9 : L'héritage asymétrique de la membrane du cil primaire souligne la ciliogenèse asynchrone dans les cellules filles et dirige la destinée cellulaire 28
Figure 10 : CPAP régule le désassemblage du cil primaire afin de maintenir le pool de progéniteurs neuronaux 30
Figure 11 : Les voies de synthèses et de trafic canoniques et non conventionnelles des membranes plasmiques vers les différents domaines des cellules gliales radiaires 31
Figure 12 : La migration nucléaire intercinétique des progéniteurs neuronaux 33
Figure 13 : Schéma récapitulant l'influence des voies de signalisation sur la balance entre prolifération et différenciation des progéniteurs neuronaux 35
Figure 14 : La localisation subcellulaire de l'Axine dirige l'amplification et la différenciation des progéniteurs intermédiaires via différents réseaux de signalisation 37
Figure 15 : Schéma de l'implication de la voie Shh dans la neurogenèse 38
Figure 16 : La voie de signalisation mTOR 39
Figure 17 : Régulations transcriptionnelles de la balance entre neurogenèse directe et indirecte 41
Figure 18 : Modèle du contrôle de la prolifération des progéniteurs neuronaux par la régulation de la structure de la chromatine par BAF170 43
Figure 19 : Signaux environnementaux régulant la prolifération et la différenciation des progéniteurs neuronaux 44
Figure 20 : La migration nucléaire intercinétique est nécessaire pour optimiser l'espace occupé par les corps cellulaires des progéniteurs de la zone ventriculaire 45
Figure 21 : Le processus d'ubiquitination des protéines 46
Figure 22 : Modèle proposé pour la régulation de la neurogenèse dépendant du niveau d'ubiquitine via la régulation de la signalisation Notch 47
Figure 23 : Régulation de la neurogenèse par l'ubiquitination 49
Figure 24 : Modèle de la génération des neurones pyramidaux destinés aux couches superficielles et profondes par les différents lignages de cellules gliales radiaires 52
Figure 25 : Les progéniteurs intermédiaires précoces peuvent produire des neurones des couches superficielles et profondes 53
Figure 26 : Modèle du rôle critique joué par Sufu dans la spécification des neurones pyramidaux 54
Figure 27 : Modèle de l'acquisition de l'identité neuronale de la couche IV via le positionnement correct dans le cortex 55

Figure 28 : Mise en place de la plaque corticale selon une organisation inside-out 56
Figure 29 : Les différents modes de migration des neurones pyramidaux dans le cortex cérébral en développement 57
Figure 30 : Etapes séquentielles de la migration neuronale radiaire 58
Figure 31 : Les étapes cellulaires principales de la locomotion neuronale et des exemples de molécules impliquées dans chaque étape 60
Figure 32 : Modèles de la régulation de la migration neuronale par le complexe Lis1/Ndel1/dynéine 62
Figure 33 : Fonctions cellule autonome et non-autonome de Ndel1 dans la migration neuronale 63
Figure 34 : Modèle de la régulation de la migration neuronale par la kinésine-5 65
Figure 35 : Structure et assemblage d'un microtubule 67
Figure 36 : Modèle illustrant le rôle de SDCCAG8 dans la régulation du recrutement du matériel péricentriolaire dans les neurones en migration 69
Figure 37 : Rôles de la myosine II et de la dynéine cytoplasmique durant la migration neuronale 72
Figure 38 : Cdk5 régule la formation du renflement cytosplasmique du processus antérieur et l'élongation du noyau dans les neurones en migration 74
Figure 39 : Migration des neurones pyramidaux et organisation laminaire du cortex de souris sauvage ou Reeler 75
Figure 40 : La voie de signalisation Reelin-Dab1 76
Figure 41 : Modèle du contrôle de la translocation somatique terminale et de la mise en place de la lamination corticale par la signalisation Reelin 78
Figure 42 : Modèle de l'effet d'une mutation mosaïque somatique activatrice de AKT3 sur la migration neuronale 80
Figure 43 : La dérégulation de la signalisation Reelin-Dab1 souligne les défauts de migration neuronale des scléroses tubéreuses complexes 82
Figure 44 : Les voies d'endocytoses dépendantes des protéines Rab régulent la migration neuronale 84
Figure 45 : Les gènes associés à des ciliopathies et le développement cortical 86
Figure 46 : Le ciblage de CoREST par les microARN régule la polarisation des neurones corticaux en migration 88
Figure 47 : La régulation de la migration neuronale par épissage alternatif de Dab1 89
Figure 48 : Les Principaux types de neurones de projection du cortex en développement 90
Figure 49 : Interactions entre les principaux facteurs de transcription clés régulant la différenciation des neurones corticaux 92
Figure 50 : Mise en place de la polarité neuronale durant le développement cortical 92
Figure 51 : Les réorganisations du cytosquelette intervenant durant l'élongation axonale 93
Figure 52 : Modèle du rôle de KIF2A dans la suppression des branchements collatéraux de l'axone 94
Figure 53 : Schéma récapitulatif des principaux processus de régulation du guidage axonal 95
Figure 54 : Modèle de régulation de la traversée de la ligne médiane par les axones commissuraux 95
Figure 55 : Les différentes malformations du développement cortical et leur phénotype associé 97
Figure 56 : Protéines de la voie PI3K-AKT-mTOR identifiées dans les malformations du développement cortical 99
Figure 57 : Schéma récapitulatif des gènes impliqués dans les malformations du développement cortical selon les mécanismes cellulaires altérés et les phénotypes associés 103
Figure 58 : Modèle représentant les conséquences des mutations dans NEDD4L sur sa stabilité 113
Figure 59 : Modèle de l'auto-ubiquitination de NEDD4L selon un mécanisme bi-moléculaire 114
Figure 60 : Co-expressions des protéines NEDD4L sauvages et mutées dans les cas de HNP 115
Figure 61 : Schéma récapitulatif des dérégulations observées dans des conditions basales résultant de l'excès de NEDD4L sauvage et de l'expression des mutants NEDD4L responsable de HNP 115

Figure 62 : Modèle de la boucle de régulation positive entre Akt et mTORC2 119
Figure 63 : Modèle de la régulation de la balance entre le trafic nucléocytoplasmique et la dégradation de PTEN par NEDD4-1 121
Figure 64 : Modèle de la modulation de l'activité de NEDD4L 122
Figure 65 : Modèle de la régulation croisée entre le positionnement neuronal et la prolifération des progéniteurs neuronaux 126
Figure 66 : Schéma représentatif de la base du cil primaire 128
Figure 67 : Couplage de la ciliogenèse avec le cycle cellulaire 130
Figure 68 : Principaux composants du système ubiquitine/protéasome impliqués dans le contrôle de la ciliogenèse dépendant du cycle cellulaire 131

INTRODUCTION

INTRODUCTION

A. Le développement cortical

Le système nerveux trouve son origine dans le tube neural qui est mis en place à l'issue de la gastrulation et de la neurulation. Le tube neural est divisé en une succession de trois vésicules (prosencéphale, mésencéphale et rhombencéphale) qui se dilateront pour finalement donner cinq vésicules (télencéphale, diencéphale, mésencéphale, métencéphale, myélencéphale). Le télencéphale est composé de deux régions que sont le pallium (partie dorsale) et le subpallium (partie ventrale). Le pallium est à l'origine du cortex cérébral et de l'hippocampe tandis que le subpallium donnera naissance aux éminences ganglionnaires médianes et latérales (Figure 1) (Marín and Rubenstein, 2003).

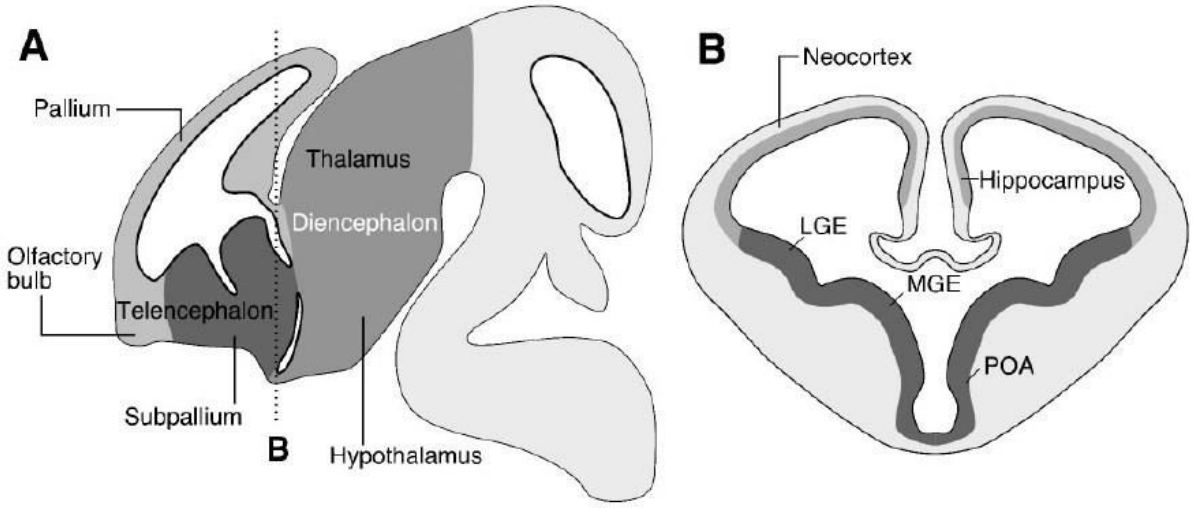


Figure 1 : Régionalisation anatomique du cerveau antérieur en développement chez la souris

(A) Schéma d'une coupe sagittale de cerveau de souris au jour de développement embryonnaire E12.5 présentant les deux régions du cerveau antérieur, le télencéphale (constitué du pallium en dorsal et du subpallium en ventral) et le diencéphale (comprenant l'hypothalamus et le thalamus). (B) Coupe coronale du télencéphale caudal passant à travers le pallium et le subpallium représentés en (A). Le pallium est constitué du futur hippocampe et du neocortex, le subpallium comprend les éminences ganglionnaires latérales (LGE) et médianes (MGE), ainsi que l'aire antérieure préoptique (POA). (D'après Marin et Rubenstein 2003)

Le développement du cortex cérébral est un processus particulièrement conservé chez les mammifères, ainsi les descriptions qui vont suivre concernant le modèle souris sont majoritairement applicables à l'homme.

Le développement cortical durant l'embryogenèse peut être divisé en trois étapes majeures que sont la prolifération neuronale, la migration neuronale et mise en place de lamination, et l'établissement des connectivités corticales par croissance et guidage axonal des neurones arrivés à destination. Deux types majeurs de neurones corticaux peuvent être distingués : les neurones pyramidaux (ou de projection) et les interneurones. Les neurones de projection représentent environ 80% des neurones corticaux et utilisent principalement le glutamate comme neurotransmetteur excitateur. Les interneurones utilisent principalement le neurotransmetteur GABA et correspondent donc majoritairement à des neurones inhibiteurs.

Ces deux types de neurones proviennent de deux régions proliératives distinctes et empruntent donc des voies de migration différentes afin d'atteindre leur emplacement final dans le cortex. Les interneurones sont générés au niveau des éminences ganglionnaires médianes et latérales du subpallium et migrent ensuite de manière tangentielle à la surface du cortex pour venir se placer dans les différentes couches corticales, tandis que les neurones de projection sont produits dans les zones ventriculaire et sous-ventriculaire du pallium et migrent de manière radiaire (Ayala et al., 2007a; Rakic, 2009) (Figure 2).

Enfin, selon leur positionnement final au sein du cortex, les neurones pyramidaux vont acquérir des propriétés morphologiques et des fonctions différentes et vont permettre l'établissement de voies de communication en projetant (d'où l'autre appellation commune de neurone de projection) de longues fibres axonales vers d'autres régions du cortex ou vers des cibles extra-corticales.

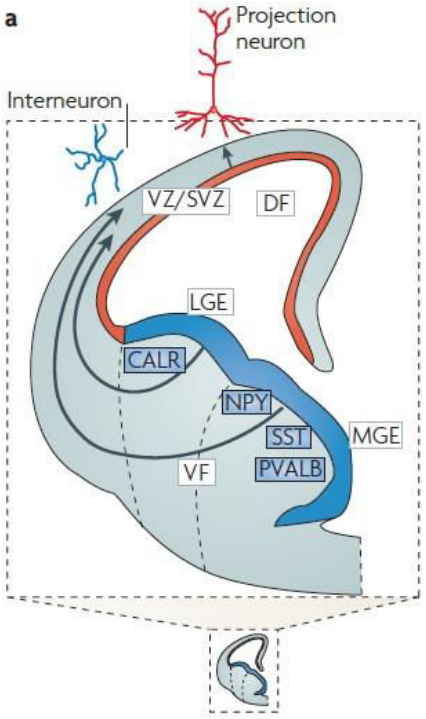


Figure 2 : Schéma d'une coupe coronale d'un hémisphère cérébral de souris en développement

Chez la souris, les interneurones sont produits majoritairement au niveau des éminences ganglionnaires latérales et médianes (LGE et MGE) du télencéphale ventral (VF) et migrent tangentiellement pour atteindre le cortex. Les neurones pyramidaux ou de projection (en rouge) sont générés dans les zones ventriculaire et sous-ventriculaire (VZ et SVZ) du télencéphale dorsal (DF) et migrent radialement vers leur destination dans la plaque corticale. Les interneurones originaires des LGE et MGE expriment des marqueurs différents tels que la calrétinine (CALR), le neuropeptide Y (NPY), la somatostatine (SST) et la parvalbumine (PVALB). (D'après Rakic, 2009)

Au cours de cette introduction, nous nous focaliserons uniquement sur les processus développementaux et les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la neurogenèse, la migration et la croissance et le guidage axonal des neurones de projection glutamatergiques. Enfin, une partie sera dédiée à la description des principales malformations du développement cortical qui résultent de la perturbation de l'un ou de plusieurs de ces processus développementaux et qui sont principalement à l'origine de déficiences intellectuelles et d'épilepsies.

1. La neurogenèse

Chez la souris, la fermeture du tube neural a lieu à environ E9 (4ème semaine de vie embryonnaire chez l'homme) et est suivie par la neurogenèse embryonnaire qui débute vers E10 (jour embryonnaire 33 chez l'homme). La neurogenèse fait intervenir de multiples types de progéniteurs qui sont soumis à

l'influence de différents processus de régulation génétiques et extrinsèques permettant le contrôle précis du nombre de neurones produit ainsi que leur spécification.

1.1 Les cellules de Cajal-Retzius

Les cellules de Cajal-Retzius (CR) représentent une variété de cellules neuronales transitoires localisées dans la couche la plus supérieure du cerveau en développement. Ces cellules ont été nommées d'après Ramon y Cajal et Gustav Retzius, qui ont été les premiers à décrire ces cellules en 1891 et 1893 respectivement. Très peu de recherches ont été effectuées sur ces cellules durant la centaine d'années suivant leur description mais l'observation que ces cellules sont la source majeure de la Reelin, une protéine de la matrice extracellulaire essentielle pour la formation en couches du cerveau, a relancé l'intérêt pour ce type cellulaire (D'Arcangelo et al., 1995; Ogawa et al., 1995).

Les cellules de CR sont les premiers neurones glutamatergiques produit dans le cerveau de souris en développement et occupent la couche la plus supérieure qui est nommée la couche moléculaire ou la couche I dans le cerveau adulte (Bystron et al., 2008). Durant le développement précoce (environ E10), cette couche contient différents types de neurones et est appelée la zone marginale. La zone marginale provient de la partie supérieure de la préplaque qui est une couche cellulaire transitoire recouvrant l'épithélium ventriculaire du télencéphale avant la formation de la plaque corticale. La première vague de migration de neurones originaires de la zone ventriculaire va provoquer la scission de la préplaque et de la sous-plaque pour donner respectivement la zone marginale superficielle et la plaque corticale (Bystron et al., 2006).

Les cellules de CR possèdent une morphologie caractéristique avec des branchements dendritiques s'étendant en direction de la surface piale et des processus axonaux qui se limitent à la partie profonde de la zone marginale indépendamment de l'orientation du corps cellulaire (Meyer et al., 1999). Dans le cerveau de souris, ces cellules disparaissent en grande partie durant les premières semaines suivant la naissance par mort cellulaire programmée indiquant un rôle majeur joué par les cellules de CR principalement durant la neurogenèse (Derer and Derer, 1990; Del Río et al., 1995). Le rôle le plus décrit pour ces cellules et qui fera l'objet d'une plus grande description ultérieurement est la régulation de la lamination corticale via la sécrétion de la Reelin. En plus de ce rôle, les cellules de CR sont aussi connues pour réguler l'identité et la fonction des cellules gliales radiaires, la différenciation des neurones occupant la plaque corticale, la mise en place des connexions hippocampales et le contrôle temporel de la migration des interneurones (Caronia-Brown and Grove, 2011; Kupferman et al., 2014; Del Río et al., 1997; Supèr et al., 2000). Il existe plusieurs sous-populations de cellules de CR qui sont générées à partir d'au moins trois sites différents que sont l'hème cortical, le pallium ventral, et la région du septum (Bielle et al., 2005; García-Moreno et al., 2007; Villar-Cerviño and Marín, 2012). Ces

différentes sous-populations migrent ensuite tangentiellement afin de recouvrir l'ensemble de la surface corticale. La distribution appropriée de ces différentes sous-populations se fait par l'intermédiaire de mécanismes de répulsion par contact entre cellules de CR (Villar-Cerviño et al., 2013). Il est intéressant de noter qu'une étude récente suggère que les différentes sous-populations de cellules CR ne présentent pas les mêmes cinétiques de migration, ce qui va déterminer leur positionnement spécifique à la surface du cortex (Barber et al., 2015) (Figure 3). Les auteurs révèlent également que la protéine VAMP3 (*vesicle-associated membrane protein 3*), impliquée dans le trafic vésiculaire, est exprimée de manière différentielle par les sous-populations de cellules de CR et permet de moduler la vitesse de migration des cellules CR et leur distribution dans les différents territoires corticaux, ce qui va en retour influencer la taille et le degré de connectivité des aires corticales d'ordre supérieur au niveau du cortex cérébral adulte (Barber et al., 2015).

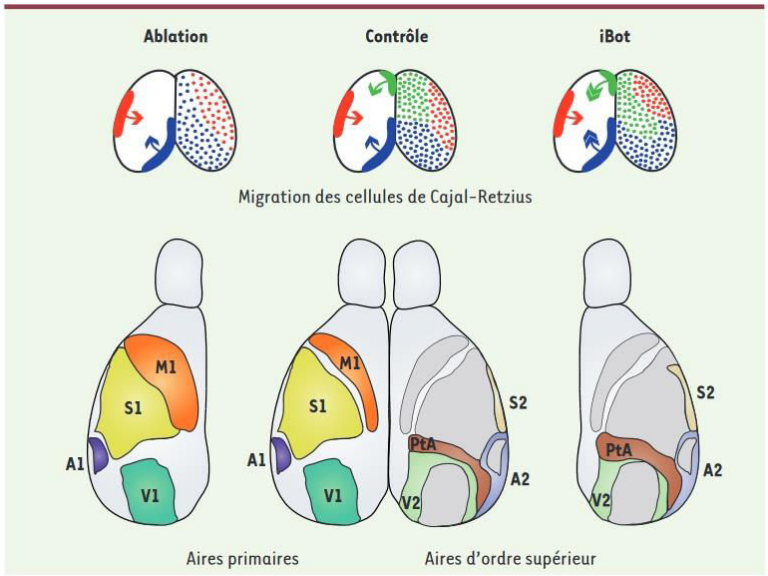


Figure 3 : La vitesse de migration des cellules CR contrôle la taille des aires corticales d'ordre supérieur.

Lors du développement cortical précoce (partie supérieure de la figure), trois sous-populations distinctes de cellules CR (rouge, verte, bleue) migrent tangentiellement et recouvrent la surface du cortex (contrôle). L'ablation d'une sous-population entraine la répartition des deux autres sur l'ensemble de la surface corticale (à gauche) tandis que l'altération de la vitesse de migration (iBot : souris transgénique inactivant VAMP3 dans les cellules CR) perturbe la répartition finale mais sans modification du nombre total de cellule CR. Au niveau post-natal (partie inférieure), l'ablation d'une sous-population entraine des défauts de mise en place des aires primaires alors que le mutants iBot entraine l'expansion d'aires d'ordre supérieur (PtA et S2). Aires primaires : motrice (M1), somato-sensorielle (S1), auditive (A1), visuelle (V1). Aires d'ordre supérieur : somato-sensorielle secondaire (S2), auditive secondaire (A2), visuelle secondaire (V2), pariétale associative (PtA). (Barber et al., 2015; Causeret and Pierani, 2016)

1.2 Les différents types de progéniteurs corticaux

Durant la corticogenèse, les neurones pyramidaux sont produits à partir d'un ensemble de progéniteurs corticaux qui sont généralement classés en deux groupes selon le lieu où prend place la

mitose dans le cortex. Les progéniteurs apicaux (PA), comprenant les cellules neuroépithéliales (NE), les cellules gliales radiaires apicales (GRa) et les progéniteurs intermédiaires apicaux (PIa), se divisent au niveau de la bordure du ventricule tandis que les progéniteurs basaux (PB) comprenant les progéniteurs intermédiaires basaux (PIb) et les cellules gliales radiaires basales (GRb), se divisent de manière abventriculaire (Figure 4).

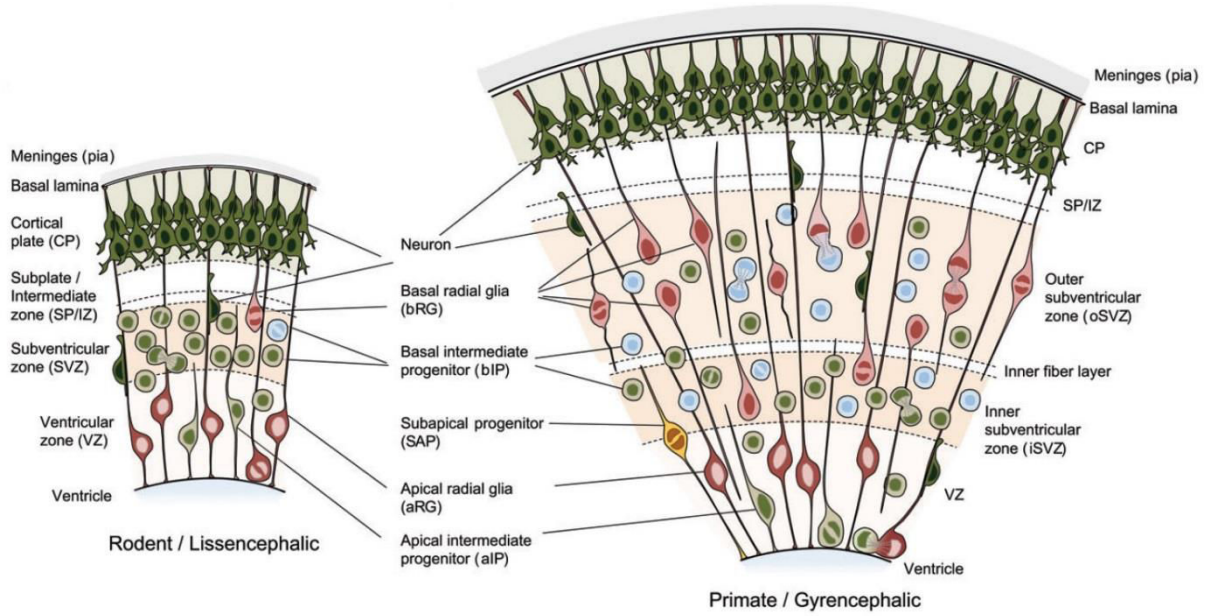


Figure 4 : Les différents types de progéniteurs dans le cortex en développement chez des espèces lissencéphale et gyrencéphale.

Coupes coronales d'un cortex en développement de rongeur (lissencéphale : dépourvu de circonvolutions) et de primate (gyrencéphale) représentant les différents types de progéniteurs neuronaux fréquemment observés dans chaque zone germinale. Pour plus de détails, voir le texte principal. (D'après Florio & Huttner 2014)

1.2.1 Les progéniteurs apicaux

a- Les cellules neuroépithéliales

L'ensemble des cellules neuronales et gliales qui vont composer le cortex cérébral sont originaires des cellules NE de l'épithélium pseudo-stratifié qui compose la plaque neurale (Götz and Huttner, 2005; Noctor, 2011). Les cellules NE sont hautement polarisées le long de leur axe apico-basal avec leur membrane apicale attachée au ventricule et leur côté basal au contact de la membrane piale. Des jonctions adhérentes (JA) sont localisées dans la partie la plus apicale de la membrane latérale où elles ont pour fonction de relier les cellules NE voisines entre elles (Aaku-Saraste et al., 1996; Marthiens and Ffrench-Constant, 2009). La membrane apicale est aussi caractérisée par la présence d'un cil primaire qui est un organite sensoriel permettant de détecter de nombreux signaux présent dans le liquide cérébro-spinal (Lehtinen et al., 2011). Le centrosome étant localisé au niveau de la membrane

plasmique apicale, il va servir de corps basal pour la nucléation du cil primaire. Le cil primaire est présent durant l'interphase et se désassemble juste avant l'entrée de la cellule en mitose ce qui libère les centrioles qui vont se placer au niveau des pôles du fuseau mitotique pour réguler son organisation (Garcia-Gonzalo and Reiter, 2012; Kim and Dynlacht, 2013; Seeley and Nachury, 2010). Avant le début de la neurogenèse, les cellules NE subissent de nombreuses divisions symétriques proliératives qui donnent naissance à deux progéniteurs identiques et permet l'expansion des cellules NE (Rakic, 1995). Lors de ces divisions successives le corps cellulaire des cellules NE se déplace le long de l'axe apico-basal, ce phénomène est appelé migration nucléaire intercinétique (Sauer & Walker 1959; Taverna & Huttner 2010). La mitose est réalisée uniquement au niveau le plus apical puis le corps cellulaire se déplace vers la région basale lors de la phase G1 pour atteindre le niveau le plus basal lors de la phase S et enfin le corps cellulaire retourne vers la position la plus apicale lors de la phase G2 pour pouvoir à nouveau entrer en mitose. Ce mouvement a pour conséquence de retrouver des noyaux de cellules NE à différentes positions le long de l'axe apico-basal à un temps donné et confère ainsi au neuroépithélium sa fausse apparence stratifiée (Sidman and Rakic, 1973; Taverna et al., 2014). La neurogenèse débute vers le jour embryonnaire E10.5 lorsque les cellules NE commencent à se diviser de manière asymétrique ce qui permet de générer des neurones et de s'auto-renouveler (Götz and Huttner, 2005). A mesure que le développement se déroule, les cellules NE subissent des changements dans l'expression de leurs gènes et commencent à exprimer des marqueurs spécifiques des glies ce qui va donner naissance à des cellules gliales radiaires apicales (GRa). La transition des cellules NE vers les cellules GRa a lieu vers E9-E10 et est dépendante de l'action du morphogène FGF10 (Sahara and O'Leary, 2009).

b. Les cellules gliales radiaires apicales

Les cellules GRa expriment des protéines spécifiques des astrocytes telles que la *Brain lipid binding protein* (BLBP), le *Glutamate aspartate transporter* (GLAST), ou la Glial fibrillary acidic protein (GFAP) et activent l'expression de facteur de transcription tel que Pax6 (Campbell and Götz, 2002; Kriegstein and Götz, 2003). Mais comme les cellules NE, les GRa continuent d'exprimer la nestine, ont une forte polarité apico-basale, maintiennent le contact avec les régions apicales et basales du cortex en développement et disposent d'un cil primaire au niveau de la membrane apicale (Hartfuss et al., 2001; Paridaen et al., 2013). Les GRa disposent d'un court processus apical qui permet le contact avec la surface du ventricule et d'un long processus basal qui va entrer en contact avec la membrane piale. A mesure que le cortex s'épaissit, le processus basal des GRa s'allonge de telle manière que le pied basal de la cellule reste en contact avec la membrane piale. Ce processus basal n'est pas réabsorbé quand les GRa se divisent mais est hérité par une des cellules filles (Miyata et al., 2001, 2004; Noctor et al.,

2001; Shitamukai et al., 2011). Les GRa réalisent également une migration nucléaire intercinétique, mais à cette période plus tardive du développement la région basale du cortex est peuplée d'un nombre de plus en plus important de neurones et de fibres axonales, par conséquent les corps cellulaires des GRa commencent à se confiner dans la région la plus apicale constituant ainsi la couche germinale corticale principale appelée la zone ventriculaire (ZV).

Les GRa ont été initialement décrites pour leur rôle d'échafaudage permettant aux neurones de traverser de longues distances à travers l'épaisseur du cortex vers leur destination finale dans la plaque corticale (Rakic, 1971). Plus tard, les GRa ont été identifiées comme des progéniteurs corticaux capables de générer directement ou indirectement les neurones pyramidaux (Malatesta et al., 2003; Miyata et al., 2001; Noctor et al., 2001). Ces cellules peuvent subir des divisions symétriques prolifératives (une GRa génère deux GRa) afin d'amplifier leur population, des divisions asymétriques neurogéniques (une GRa génère une GRa et un neurone) ou également des divisions asymétriques prolifératives (une GRa génère une GRa et une cellule progénitrice différente) (Götz and Huttner, 2005). Cette division asymétrique proliférative va permettre de produire de nouveaux types de progéniteurs, les progéniteurs basaux, qui vont subir des mitoses dans une position basale par rapport à la VZ et former ainsi la seconde couche germinale nommée zone sous-ventriculaire (ZSV) (Fish et al., 2008; Haubensak et al., 2004; Kowalczyk et al., 2009; Noctor et al., 2004). Les GRa et les progéniteurs basaux sont généralement distingués selon le profil d'expression de deux facteurs de transcription que sont *Paired-box transcription factor* 6 (Pax6) et *T-box transcription factor* 2 (Tbr2), Pax6 est très fortement exprimé dans les GRa mais absent dans les progéniteurs basaux tandis que Tbr2 est fortement exprimé dans les progéniteurs basaux et absent dans les GRa (Englund, 2005). Une seconde classe de cellules gliales radiaires apparait dans des stades plus avancés du développement du cortex et sont nommées les cellules gliales radiaires basales (GRb) (Shitamukai et al., 2011; Wang et al., 2011b).

c. Les progéniteurs intermédiaires apicaux

Les progéniteurs intermédiaires apicaux (PIa), aussi connus sous le nom de Short neural precursors (SNP) représentent une petite population de progéniteurs localisés dans la ZV et qui ont une polarité apico-basale avec des processus apicaux et basaux et se divisent de manière apicale comme les GRa. Les PIa sont bipolaires durant l'interphase et présentent un court processus basal dans la ZV contrairement aux GRa, qui se rétractent durant la mitose (Gal et al., 2006). Ces progéniteurs sont identifiés par l'expression de la tubuline α-1 et l'absence d'activation de la signalisation Notch, laquelle est activée dans les GRa. Les PIa génèrent moins de progéniteurs intermédiaires que les GRa et donnent naissance préférentiellement à des neurones par neurogenèse directe (Stancik et al., 2010).

Les PIa expriment également Pax6 et très rarement Tbr2 ce qui permet de les classer comme une population distincte des GRa plutôt qu'une population de progéniteurs basaux. Ces progéniteurs sont présents seulement en faible abondance dans le cerveau de souris embryonnaire et leur rôle précis dans le développement du cortex reste à définir (Pilz et al., 2013).

1.2.2 Les progéniteurs basaux

a- Les progéniteurs intermédiaires basaux

Les progéniteurs intermédiaires basaux (PIb) sont des cellules progénitrices basales non-épithéliales qui sont générées par les cellules NE et les GRa et qui se détachent des jonctions adhérentes apicales présentes entre ces cellules bordant le ventricule pour migrer dans la ZSV. A l'inverse des progéniteurs apicaux, les PIb présentent une morphologie multipolaire mais rétractent leurs processus apicaux et basaux et perdent ainsi leur polarité apico-basale juste avant d'entrer en mitose (Haubensak et al., 2004; Miyata et al., 2004; Noctor et al., 2004). Ces cellules diffèrent également des progéniteurs apicaux en diminuant l'expression des marqueurs des astrocytes au profit de l'expression de Tbr2 ou de l'ARN non codant Svet1 (Englund, 2005; Tarabykin et al., 2001). La majorité des PIb subissent directement une division symétrique neurogénique terminale pour produire deux neurones afin de doubler le nombre de neurones produits mais ils peuvent également réaliser une division symétrique proliférative avant de réaliser une division neurogénique terminale (Attardo et al., 2008; Kriegstein et al., 2006). Ces cellules progénitrices permettent donc de doubler le potentiel neurogénique des GRa et génèrent la majorité des neurones présents dans l'ensemble des couches du cortex ce qui montre leur rôle fondamental dans la neurogenèse.

b- Les cellules gliales radiaires basales

Les cellules gliales radiaires basales (GRb) ont été initialement identifiées dans le cortex cérébral de l'Homme et du furet en développement (cerveaux gyrencéphales) comme des progéniteurs basaux partageant plusieurs caractéristiques communes avec les GRa mais avec leur corps cellulaire situé dans la zone sous-ventriculaire externe (OSVZ; outer subventricular zone) plutôt que dans la VZ (Fietz et al., 2010; Hansen et al., 2010; Reillo et al., 2011). Comme les GRa, ces cellules expriment le marqueur Pax6 et la vimentine mais pas Tbr2, et possèdent un long prolongement basal qui va entrer en contact avec la membrane piale. Cependant les GRb se distinguent des GRa par le fait qu'elles n'émettent pas de prolongement apical et sont donc détachées des jonctions adhérentes présentes à la surface du ventricule. Ainsi, elles ne reçoivent pas les signaux provenant du liquide cérébro-spinal (Fietz et al., 2010; Hansen et al., 2010; Reillo et al., 2011; Shitamukai et al., 2011; Wang et al., 2011b). Les GRb subissent principalement des mitoses symétriques neurogéniques au niveau de la SVZ comme les PIb

(Wang et al., 2011b). Mais contrairement aux PIb ces cellules sont retrouvées en très faible abondance dans le cerveau en développement de souris et leur rôle reste à éclaircir (Shitamukai et al., 2011; Wang et al., 2011b).

1.3 Mécanismes de régulation de la neurogenèse

Le développement du cortex de souris nécessite une fine régulation de la balance entre prolifération et différenciation des progéniteurs neuronaux afin d'assurer la génération du nombre approprié de neurones corticaux et en définitive de contrôler la taille du cerveau. Au début du développement cortical, les progéniteurs neuronaux se divisent de manière asymétrique afin d'assurer leur expansion, s'ensuit alors une phase de divisions asymétriques neurogéniques marquant le début de la neurogenèse (Figure 5). Le choix entre division symétrique proliférative et division asymétrique neurogénique est soumis à de nombreux mécanismes impliquant des facteurs aussi bien intrinsèques qu'extrinsèques. Nous allons donc discuter l'influence sur ce choix de l'organisation subcellulaire des progéniteurs, la cinétique du cycle cellulaire, les voies de signalisation, les régulations transcriptionnelles et épigénétiques, l'environnement des progéniteurs et le processus d'ubiquitination. La compréhension des mécanismes régulant le mode de division des progéniteurs corticaux est critique étant donné que la dérégulation de ces mécanismes participe dans la plupart des cas à l'apparition de malformations corticales chez l'homme.

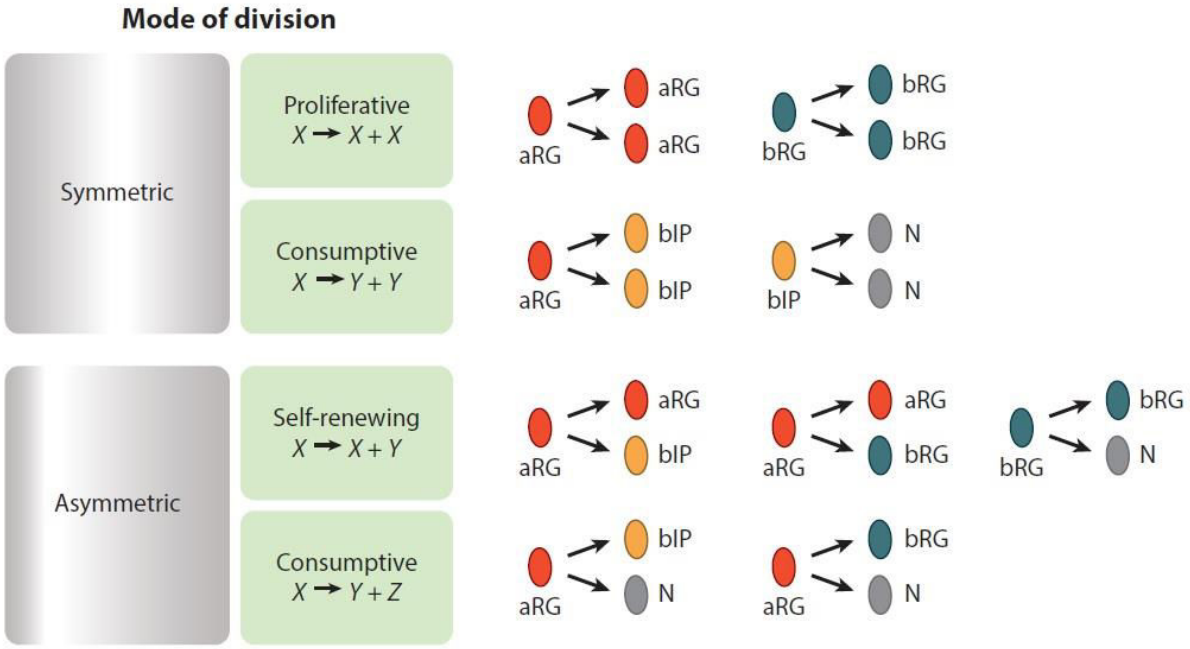


Figure 5 : Les différents modes de divisions des progéniteurs neuronaux.

Les divisions des progéniteurs peuvent être symétriques ou asymétriques. Les divisions symétriques sont proliératives (production de deux progéniteurs identiques au progéniteur de base) ou consommatrices (production de deux progéniteurs identiques mais différents du progéniteur de base ou deux neurones). Les divisions asymétriques permettent l'auto-renouvellement (génération d'un progéniteur identique au progéniteur de base et autre un progéniteur ou un neurone) ou sont consommatrices (génération d'un progéniteur différent et d'un neurone). Des exemples sont donnés sur la droite de la figure. aRG : cellule gliale radiaire apicale; bRG : cellule gliale radiaire basale; bIP : progéniteur intermédiaire basal; N : neurone. (D'après Taverna et al. 2014)

1.3.1 Organisation subcellulaire des progéniteurs neuronaux

a- Le fuseau mitotique et son orientation

Le fuseau mitotique, en particulier la régulation de son orientation, est un élément clé régulant la symétrie et l'asymétrie des divisions cellulaires (Figure 6). L'orientation du fuseau mitotique, et donc du plan de clivage pour la cytokinèse, va définir la répartition égale ou inégale des composants cellulaires dans les deux cellules filles et ainsi jouer un rôle dans la détermination du destin cellulaire des progéniteurs (di Pietro et al., 2016). Il a été proposé initialement qu'un plan de clivage vertical par rapport au ventricule conduirait à une division proliférative symétrique par répartition égale des composants de la cellule mère dans les deux cellules filles alors qu'un plan de clivage horizontal résulterait en une division asymétrique neurogénique (Chenn and McConnell, 1995). Cependant, chez les mammifères la majorité des divisions que subissent les cellules gliales radiaires sont des divisions avec un plan de clivage vertical, ce qui ne semblerait donc pas expliquer correctement le nombre de divisions neurogéniques présentes pendant le développement. Il a donc ensuite été suggéré qu'une légère inclinaison (oblique) du plan de clivage mitotique peut résulter en une division asymétrique du

fait de la répartition inégale de la membrane apicale qui ne représente qu'une partie infime de la membrane plasmique des progéniteurs apicaux (1-2%) (Kosodo et al., 2004). Chez la Drosophile, les divisions avec un plan de clivage horizontal sont fréquentes pendant l'ensemble de la neurogenèse et sont responsables des divisions asymétriques alors que chez les mammifères se sont des divisions peu fréquentes qui apparaissent plus tardivement et semblent importantes pour la production des progéniteurs basaux (Knoblich, 2008; LaMonica et al., 2013).

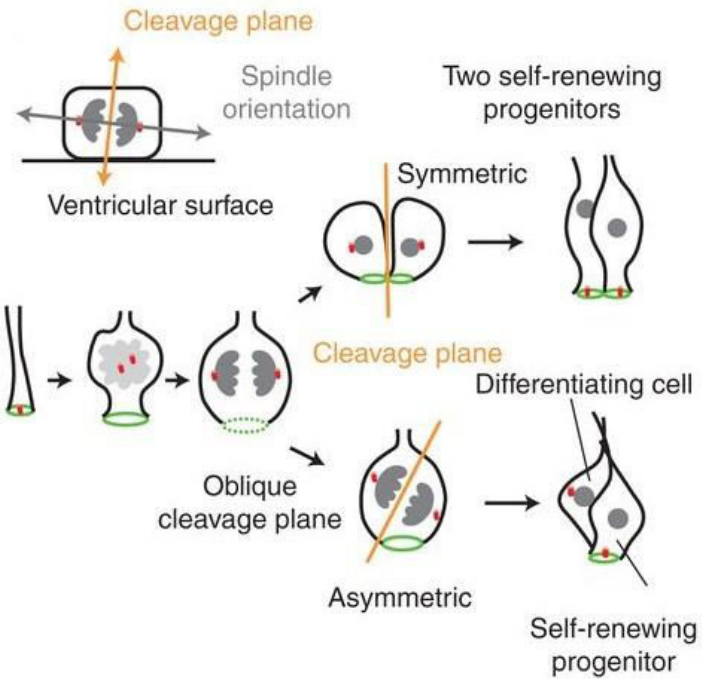


Figure 6 : Modèle de la division symétrique/asymétrique selon le plan de clivage du fuseau mitotique.

Les divisions avec un plan de clivage vertical par rapport à la surface du ventricule engendrent une division symétrique et donnent naissance à deux progéniteurs par répartition égale du domaine apical (vert). A l'inverse, un plan de clivage légèrement oblique par rapport à la surface ventriculaire engendre une division asymétrique avec production d'un progéniteur héritant du domaine apical et une cellule différenciée. (D'après Matsuzaki & Shitamukai 2015)

L'orientation du fuseau mitotique durant les divisions symétriques des cellules gliales radiaires est finement régulée par des mécanismes impliquant les centrosomes, le positionnement des microtubules astraux et l'interaction avec des protéines au niveau du cortex cellulaire (Matsuzaki and Shitamukai, 2015) (Figure 7). Le fuseau mitotique est ancré au niveau du cortex cellulaire par les microtubules astraux et via la dynéine et le complexe LGN/Gαi/NuMa (*Leucine-glycine-asparagine repeat protein/GDP-bound inhibitory α-subunits of heterotrimeric G proteins/Nuclear mitotic apparatus protein*). La localisation du complexe LGN/Gαi/NuMa au niveau de la membrane latérale des progéniteurs apicaux est essentielle pour le maintien des divisions symétriques durant la neurogenèse précoce chez les vertébrés (Konno et al., 2008; Morin et al., 2007; Peyre et al., 2011). Une étude a également montré que la perte de fonction de la Huntingtine mène à une dérégulation de l'orientation du fuseau par perturbation du positionnement du complexe dynéine/dynactine et de NuMa, ce qui favorise la différenciation neuronale des progéniteurs (Godin et al., 2010). De plus, la protéine Lis1, qui est connue pour être mutée dans chez des patients présentant des lissencéphalies (cerveau lisse), interagit avec la dynéine et Ndel1 pour permettre l'ancrage des microtubules astraux au cortex cellulaire (Yingling et al., 2008). Des perturbations du complexe Lis1/Ndel1 altèrent

l'expansion du pool de cellules gliales radiaires et neuroépithéliales en induisant des plans de clivage mitotiques aléatoires (Pawlisz et al., 2008). Il est aussi intéressant de noter que la majorité des gènes associés à des microcéphalies (cerveau de taille réduite chez l'Homme), tels que *ASPM*, *MCPH1* et *CENPJ*, codent pour des protéines centrosomales dont le rôle principal est de réguler l'orientation du fuseau mitotique (Gilmore and Walsh, 2013).

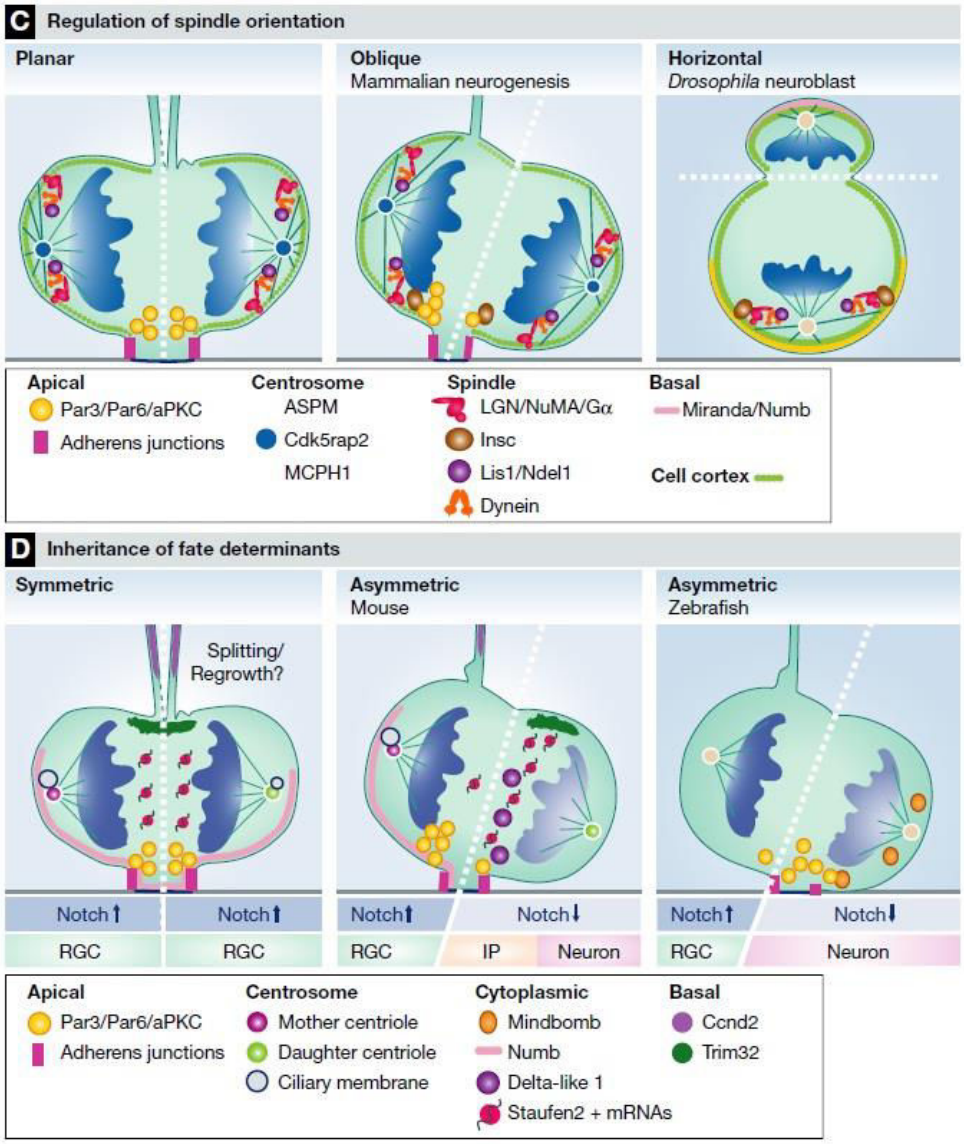


Figure 7 : Les différents modes de division des progéniteurs neuronaux sont déterminés par l'orientation du fuseau mitotique et l'héritage des déterminants moléculaires du destin cellulaire.

Pour plus de détails, voir le texte principal. (D'après Paridaen & Huttner 2014))

b- Le domaine apical

L'orientation du plan de clivage de la mitose va définir la distribution des composants apicaux qui vont déterminer le destin cellulaire dans les cellules filles. Plusieurs études ont suggéré une connexion entre

le destin cellulaire et le clivage du domaine apical, lequel contient entre autre le complexe Par3/Par6/aPKC, les jonctions adhérentes, le cil primaire et l'appareil de Golgi (Figure 7).

b-1 Le complexe Par3/Par6/aPKC

Le domaine apical contient un complexe de protéines de polarité que sont Par3, Par6 et aPKC (Costa et al., 2008). Par3 est connu pour se lier à la protéine Numb, qui est un inhibiteur de la signalisation Notch, ce qui conduit à la phosphorylation de Numb par aPKC (Bultje et al., 2009). Les protéines Par3 se répartissent de manière asymétrique entre les deux cellules filles et le niveau de Par3 hérité va influencer le destin cellulaire, la cellule fille recevant la plus grande quantité de Par3 est capable de mieux séquestrer la protéine Numb au niveau du domaine apical afin d'inhiber son activité négative sur la signalisation Notch favorisant ainsi la maintenance de l'identité de progéniteur. A l'inverse, la cellule fille qui hérite de moins de protéine Par3 a tendance à se différencier (Bultje et al., 2009). Des mutations dans Aspp2, un régulateur de la localisation apicale de Par3, mène à des défauts des divisions asymétriques (Sottocornola et al., 2010). De manière surprenante, l'inactivation d'une des isoformes d'aPKC (aPKCλ) mène à une perte des jonctions adhérentes au niveau des cellules neuroépithéliales mais n'affecte pas la neurogenèse (Imai et al., 2006). De plus, de manière intéressante, le destin cellulaire relatif à la répartition de Par3 semble varier selon les espèces puisque une étude effectuée chez le poisson-zèbre a montré que la cellule fille qui hérite du domaine apical et donc de Par3 hérite également de l'inhibiteur de Notch Mindbomb et ainsi se différencie (Alexandre et al., 2010). L'autre cellule fille réexprime rapidement Par3 et rétablit un contact apical, ce qui maintient son identité de cellule gliale radiaire. Ces différences restent pour le moment encore à élucider.

b-2 Les jonctions adhérentes

Les complexes de jonctions adhérentes ont des fonctions cruciales dans l'établissement et le maintien de la polarité cellulaire, il n'est donc pas surprenant que les composants des jonctions adhérentes, telles que les cadhérines et les caténines, soient impliqués dans le maintien de la polarité des cellules gliales radiaires mais aussi dans leur identité. Il est intéressant de noter que les composants des jonctions adhérentes ont des rôles structurels mais également des fonctions dans la signalisation. Du point de vu structurel, les jonctions permettent l'adhésion entre les cellules gliales radiaires voisines et assurent donc la cohésion du tissu (Marthiens et al., 2010). Les cadhérines sont des protéines transmembranaires qui forment des homo-oligomères avec les cadhérines des cellules voisines par l'intermédiaire de leur domaine extra-cellulaire. Avec leur domaine intra-cellulaire, les cadhérines interagissent avec la β-Caténine et l'α-Caténine, cette dernière interagissant à son tour avec le cytosquelette d'actine (Miyamoto et al., 2015b). Ces jonctions extra-cellulaires permettent donc de

réguler le remodelage du réseau d'actine qui est connu pour, entre autre, guider le positionnement du fuseau mitotique et permettre son assemblage (Kunda and Baum, 2009). Il n'est donc pas surprenant que les N-Cadhérines (cadhérine classique principalement exprimée dans le système nerveux) soient décrites pour jouer un rôle dans la régulation de la prolifération des progéniteurs neuronaux. Un haut niveau de cadhérines au niveau du domaine apical des cellules gliales radiaires semble important pour produire des divisions symétriques prolifératives et maintenir l'identité de progéniteurs apicaux (Rousso et al., 2012). Les progéniteurs intermédiaires et les jeunes neurones dérivés des progéniteurs apicaux perdent leur identité de progéniteurs apicaux tandis que l'expression de la N-Cadhérine diminue. De plus, la perte de fonction de la N-Cadhérine entraine une différenciation précoce des progéniteurs apicaux (Zhang et al., 2010, 2013a) (Figure 8). Ces jonctions ont également un rôle important dans la signalisation cellulaire via la voie Wnt/β-Caténine, ce qui sera discuté ultérieurement.

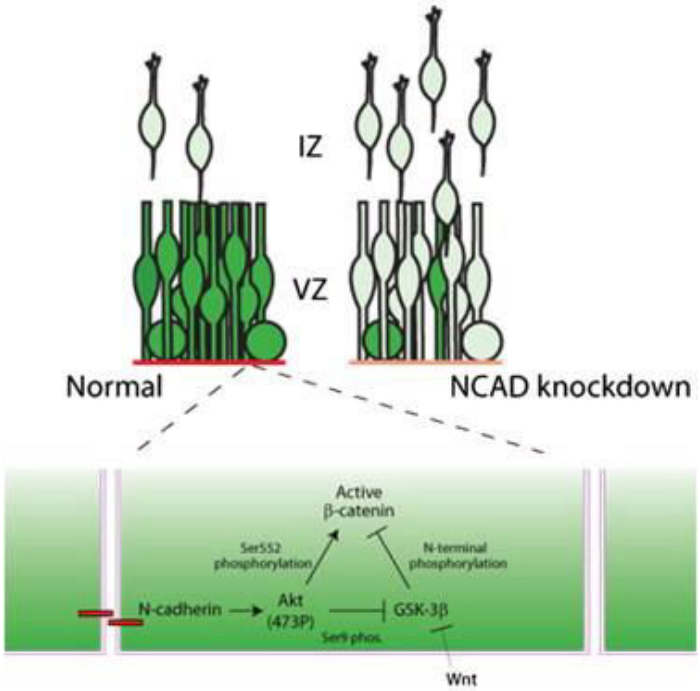


Figure 8 : Modèle de la régulation de la prolifération des progéniteurs neuronaux par interaction entre cellules via la N-Cadhérine.

Au niveau de la zone ventriculaire (VZ), l'activation de la N-Cadhérine (rouge) à la surface des progéniteurs entraine la phosphorylation d'Akt qui va en retour activer indirectement la β-Caténine par phosphorylation de GSK-3β ou directement par phosphorylation de la B-Caténine. Les progéniteurs de la VZ présentent une forte activité dépendante de la β-Caténine (vert) et sont liés par les jonctions adhérentes de N-Cadhérine (rouge). Lorsque l'expression de la N-Cadhérine est diminuée (NCAD knockdown), la signalisation dépendante de la β-Caténine est aussi diminuée, ce qui mène à une augmentation de la différenciation neuronale et à la migration des neurones. (D'après Zhang et al. 2010)

Une autre classe de protéines, les petite GTPases RhoA et Cdc42, a également attiré l'attention de par le fait que ces protéines soient associées aux jonctions adhérentes et permettent leur maintien et leur formation et ainsi régulent les mitoses apicales via la régulation du cytosquelette d'actine. RhoA joue un rôle critique dans la maintenance des complexes de jonctions adhérentes puisque sa délétion entraine la désorganisation de la VZ avec la perte de l'expression de la caténine au niveau de la surface apicale et une augmentation de la prolifération des progéniteurs neuronaux (Cappello et al., 2012; Katayama et al., 2011). Cependant, cet effet semble dépendant des régions puisque la délétion de Rho dans le neuroéphitélium de la moelle épinière entraine une diminution de la prolifération et une sortie du cycle cellulaire précoce (Herzog et al., 2011). La délétion de Cdc42 mène à une augmentation des

mitoses dans des positions basales (Cappello et al., 2006). Les progéniteurs déficients pour Cdc42 présentent une perte progressive des jonctions adhérentes par délocalisation du complexe de polarité Par3/aPKC, ce qui mène à une altération de la migration du noyau vers la surface apicale lors de la migration nucléaire intercinétique et à l'acquisition de l'identité de progéniteurs basaux. Cdc42 joue donc un rôle dans la régulation de la position des mitoses et par conséquent dans le destin des progéniteurs.

b-3 Cil primaire et centrosomes

Le cil primaire est un organite sensoriel qui dépasse de la membrane apical des cellules NE et GRa pour, entre autre, entrer dans le liquide cérébro-spinal dans lequel il va servir d'antenne pour capter des signaux tels que Wnt, Shh ou IGF (Lehtinen and Walsh, 2011; Louvi and Grove, 2011). La membrane, ainsi que la base du cil primaire, le centrosome, sont deux composants du cil primaire qui semblent jouer un rôle particulièrement important dans la détermination cellulaire.

Durant l'interphase, le centrosome contient un centriole fille et un centriole mère qui est le plus ancien centriole de la cellule et rentre en jeu dans la nucléation du cil primaire en formant le corps basal (Louvi and Grove, 2011). Il a été montré que le centriole mère est préférentiellement hérité par la cellule fille qui maintient l'identité de cellule progénitrice apicale suggérant que la transmission asymétrique des centrioles durant la mitose joue un rôle dans le destin cellulaire (Paridaen et al., 2013). Dans les cellules progénitrices apicales en mitose, le centriole mère est capable de retenir la membrane du cil primaire, laquelle va donc être héritée de manière asymétrique dans l'une des cellules filles qui va par conséquent reformer son cil primaire avant l'autre cellule fille (Paridaen et al., 2013) (Figure 9). La formation plus précoce du cil primaire a pour effet de mettre en place plus rapidement toutes les voies de signalisation régulées au niveau du cil primaire et il est donc proposer que cet effet favorise le maintien de l'état progéniteur de cette cellule. La cellule fille qui hérite du centriole fille non associé à la membrane du cil primaire et qui va suivre préférentiellement un programme de différenciation va former un nouveau cil primaire au niveau de sa membrane basolatérale, au lieu de la membrane apicale, avant de se détacher de la paroi du ventricule (Wilsch-Brauninger et al., 2012). Cette asymétrie temporelle et spatiale dans la ciliogenèse est donc proposée pour expliquer des destins cellulaires différents pour les deux cellules filles. Mais ce système semble difficilement compatible avec les divisions symétriques nécessaires à l'étape précoce du développement permettant l'accroissement du nombre de progéniteurs. Paridaen et *coll*. ont proposé que pour avoir une division symétrique proliferatrice des progéniteurs apicaux, la cellule fille héritant du centriole fille, donc sans les restes de membrane du cil primaire, récupère l'appareil de Golgi qui va permettre de former plus rapidement un cil primaire par l'utilisation de la membrane de l'appareil de Golgi. Ils proposent également que

puisque le trafic apical de la membrane dérivée de l'appareil de Golgi est diminué lorsque la neurogenèse débute, les cellules progénitrices apicales perdent leur capacité à capturer la membrane dérivée de l'appareil de Golgi à mesure que la neurogènese progresse (Aaku-Saraste et al., 1997; Paridaen et al., 2013).

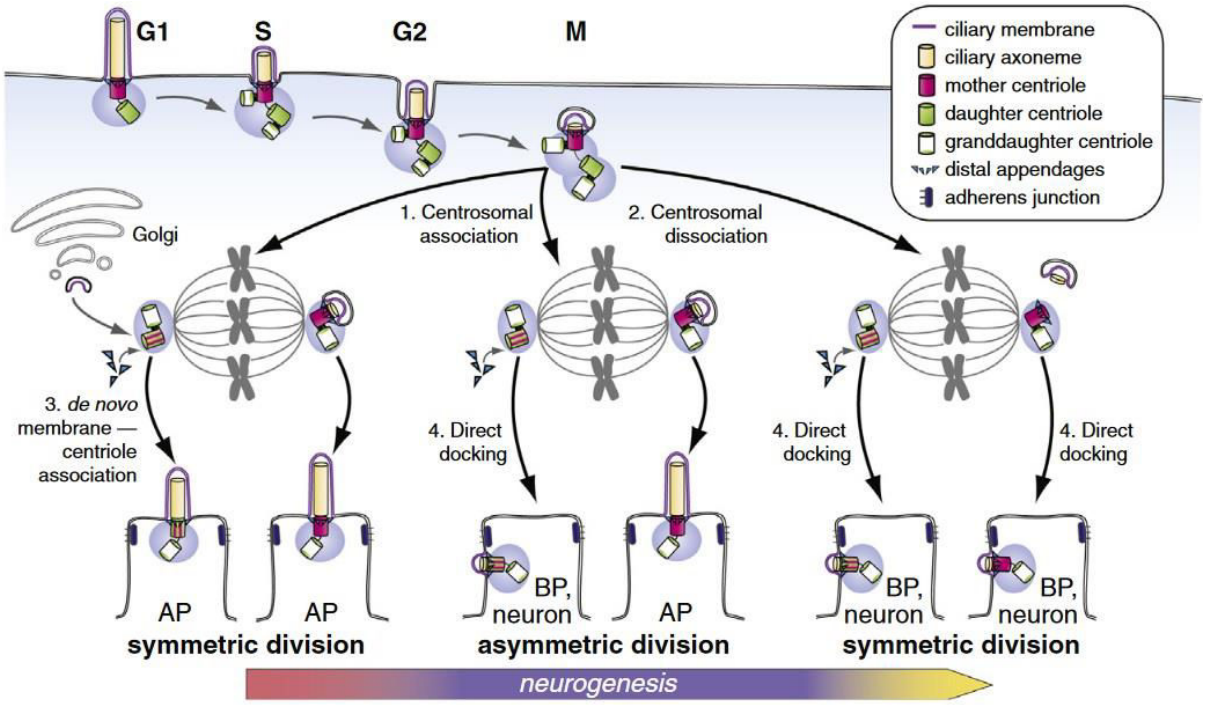


Figure 9 : L'héritage asymétrique de la membrane du cil primaire souligne la ciliogenèse asynchrone dans les cellules filles et dirige la destinée cellulaire.

Ce modèle représente les deux modes d'héritage de la membrane du cil primaire et des centrioles durant la neurogenèse. Dans un premier cas, au moment de l'entrée en mitose la membrane du cil primaire se rétracte et reste associée au centriole mère au niveau du fuseau mitotique durant la mitose (1). Durant la corticogenèse précoce, ce mode d'héritage est associé à des divisions symétriques prolifératives avec une reformation du cil primaire au même moment au niveau du domaine apical de chaque progéniteurs apicaux générés (AP), avec l'une des deux cellules filles reformant le cil via les restes de membrane du cil primaire tandis que la deuxième cellule fille reforme le cil via la capture de la membrane plasmique dérivée de l'appareil de Golgi directement durant la mitose (gauche). Il est ensuite connu que lorsque la neurogenèse débute le trafic de membrane dérivé de l'appareil de Golgi est diminué (Aaku-Saraste et al. 1997). Ainsi, à mesure que la neurogenèse progresse, la cellule fille qui va hériter des restes de la membrane du cil primaire va reformer plus rapidement le cil primaire au niveau du domaine apical et rester ainsi un progéniteur apical tandis que l'autre cellule fille va reformer un cil primaire plus tardivement par attachement des centrioles au niveau de la membrane latérale puis formation d'un nouveau cil primaire à partir de cette membrane et se différencier en progéniteur basal (BP) ou neurone (milieu). Durant la neurogenèse plus tardive, un deuxième mode d'héritage apparait progressivement avec une dissociation de la membrane du cil avec le centrosome (2). Ce mode d'héritage serait donc à l'origine des divisions symétriques neurogéniques par formation *de novo* d'un cil primaire dans les deux cellules filles au niveau de la membrane latérale et donc différenciation des deux cellules (droite). (D'après Paridaen et al. 2013).

Il est également intéressant de noter que la position du cil primaire peut influencer la détermination du destin cellulaire. Le facteur de transcription Pax6 est connu pour réguler directement des composants du cil primaire et du centrosome. Dans le cortex de souris en développement Sey/Sey

(mutations dans Pax6), de nombreux centrosomes sont retrouvés dans une position abventriculaire et sont en parallèle associés avec une augmentation des mitoses au niveau basal et sous-apical (Asami et al., 2011; Tamai et al., 2007). Ces données sont cohérentes avec le fait que les cellules qui débutent leur détachement de la paroi ventriculaire pour devenir des progéniteurs basaux ou des neurones possèdent un cil primaire au niveau basolatéral, ce qui semble donc indiquer un lien entre la localisation du centrosome et celle du cil primaire dans le destin cellulaire.
L'importance du cil primaire dans le développement du cerveau est renforcée par la mise en évidence de mutations dans des protéines formant le cil primaire chez des patients présentant des défauts majeurs au niveau du système nerveux central. Ces maladies sont généralement nommées ciliopathies et incluent entre autre le syndrome de Joubert (Lancaster and Gleeson, 2009). Le syndrome de Joubert est caractérisé par une malformation du tronc cérébral et une agénésie ou une hypoplasie du vermis cérébelleux (Lancaster et al., 2011). L'un des gènes impliqué dans le syndrome de Joubert est le gène *ARL13B*, qui code pour une petite GTPase spécifiquement localisée au niveau de la membrane du cil primaire. La délétion d'Arl13b dans le cerveau de souris en développement mène à une inversion de la polarité apico-basale des cellules gliales radiaires associée à des effets dramatiques sur la formation du cortex (Higginbotham et al., 2013).

L'importance du centrosome durant la neurogenèse a été soulignée par l'identification de nombreuses mutations dans des gènes codant pour des protéines centrosomales, telles qu'*ASPM*, *CDK5RAP2*, *WDR62*, *MCPH1*, *CEP152* et *STIL*, chez des patients présentant des microcéphalies (Alcantara and O'Driscoll, 2014). Comme noté précédemment, ces protéines ont été initialement décrites pour leurs rôles dans la régulation de la balance entre divisions symétriques/asymétriques via le contrôle de l'orientation du fuseau mitotique (Fish et al., 2006; Gruber et al., 2011). Des défauts dans l'orientation causant la différenciation prématurée des progéniteurs étaient proposés comme lien fonctionnel entre les différents gènes responsables de microcéphalies mais ce modèle est de plus en plus remis en cause (Thornton and Woods, 2009). Une étude récente d'un modèle souris déficient pour Wdr62 a montré que l'orientation du fuseau mitotique n'est pas altérée mais que la progression dans le cycle cellulaire est dérégulée, ce qui mène à la mort cellulaire des progéniteurs et pourrait expliquer l'apparition de la microcéphalie (Chen et al., 2014). L'implication de la mort cellulaire des progéniteurs neuronaux a été de plus soulignée par des études de modèles de souris permettant d'analyser les conséquences de la déplétion ou de l'amplification des centrosomes durant la neurogenèse. La déplétion des centrosomes mène au détachement des cellules gliales radiaires de la surface de la VZ, ces cellules vont ensuite prolonger le temps passé en mitose résultant en l'expression de p53 et la mort cellulaire (Insolera et al., 2014a). De la même manière, l'amplification des centrosomes engendre des divisions multipolaires produisant des cellules aneuploïdes qui entrent en apoptose dépendante de p53, ce qui

cause une microcéphalie (Marthiens et al., 2013). De plus, de manière intéressante, une étude récente du modèle de souris mutant pour *Tubb5* (codant pour une isoforme de la β-tubuline), causant des microcéphalies chez l'homme, a montré que l'orientation du fuseau mitotique n'est pas non plus altérée mais à l'inverse la progression dans le cycle cellulaire est dérégulée, ce qui induit l'apoptose dépendante de p53, appauvrissant ainsi le pool de progéniteurs (Breuss et al., 2012, 2016).

Par ailleurs, une étude récente a mis en évidence un nouveau rôle pour la protéine CPAP (codée par le gène *CENPJ*) dans le désassemblage du cil primaire via le recrutement d'un complexe de désassemblage à la base du cil (Gabriel et al. 2016) (Figure 10). L'utilisation d'un mutant de CPAP responsable du syndrome de Seckel associé à une microcéphalie a montré des défauts de désassemblage du cil provoquant un retard dans la rentrée dans le cycle cellulaire et donc une différenciation prématurée des progéniteurs neuronaux. Ces données suggèrent donc une implication du cil primaire dans la neurogenèse et par conséquent dans le contrôle de la taille du cerveau.

L'ensemble de ces études suggère donc que le centrosome joue un rôle crucial dans le développement cortical via la régulation de nombreux processus tels que la progression dans le cycle cellulaire, le positionnement et la stabilité du fuseau mitotique et la ploïdie des progéniteurs neuronaux.

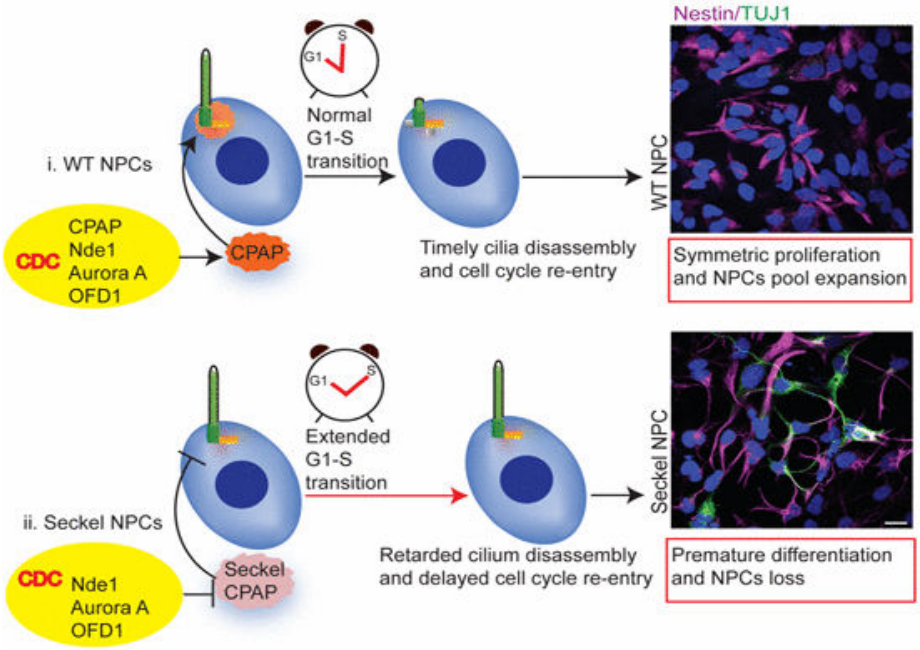


Figure 10 : CPAP régule le désassemblage du cil primaire afin de maintenir le pool de progéniteurs neuronaux.

(i) Dans les progéniteurs neuronaux sauvages (WT NPCs), la protéine CPAP se localise au niveau de la base du cil primaire et favorise le recrutement du complexe de désassemblage du cil primaire (CDC), incluant les protéines Nde1, Aurora A et OFD1, ce qui permet le désassemblage du cil et la transition appropriée G1-S. Ce processus permet aux progéniteurs neuronaux (Nestin, magenta) de subir des divisions symétriques proliférates, ce qui conduit à leur expansion.
(ii) Dans les progéniteurs neuronaux présentant une mutation dans CPAP responsable du syndrome de Seckel (caractérisé entre autre par une microcéphalie) chez l'homme, CPAP ne se localise plus au niveau de la base du cil primaire, ce qui associé à un recrutement inefficace de CDC, un cil primaire anormalement long, un retard dans le désassemblage du cil et à un prolongement de la transition G1-S (flèche rouge). L'altération de ce processus entraine une différenciation prématurée des progéniteurs neuronaux en neurones (Tuj1, vert) et suggère donc une implication du cil primaire dans la physiopathologie des microcéphalies. (D'après Gabriel et al. 2016)

b-4 La relocalisation de l'appareil de Golgi

L'appareil de Golgi est décrit pour avoir une fonction cruciale dans la mise en place et le maintien de la polarité des cellules épithéliales. L'appareil de Golgi est associé avec le centrosome et cette association est connue pour être nécessaire à différents processus cellulaires tels que la progression dans le cycle cellulaire, la migration, et la ciliogenèse (Sütterlin and Colanzi, 2010). Une étude récente a mis en évidence que dans les cellules gliales radiaires apicales l'appareil de Golgi n'est pas associé avec le centrosome mais est confiné au niveau du processus apical et dans le cytoplasme apical par rapport au noyau. L'appareil de Golgi se réorganise de manière à se synchroniser avec les mouvements du noyau durant la migration nucléaire intercinétique (Taverna et al., 2016) (Figure 11). Les auteurs montrent également que l'appareil de Golgi a une forte implication dans la délivrance des composants de membranes nouvellement synthétisés destinés à la membrane apicale et baso-latérale mais un rôle très mineur dans la délivrance de ces composants vers la membrane basale et baso-latérale. Suite à la délamination des progéniteurs qui deviennent ainsi des progéniteurs basaux, l'appareil de Golgi retrouve à nouveau sa localisation péricentrosomale habituelle. Ces données mettent en évidence le rôle important de l'appareil de Golgi dans le maintien de l'identité des progéniteurs et leur organisation subcellulaire durant le développement cortical.

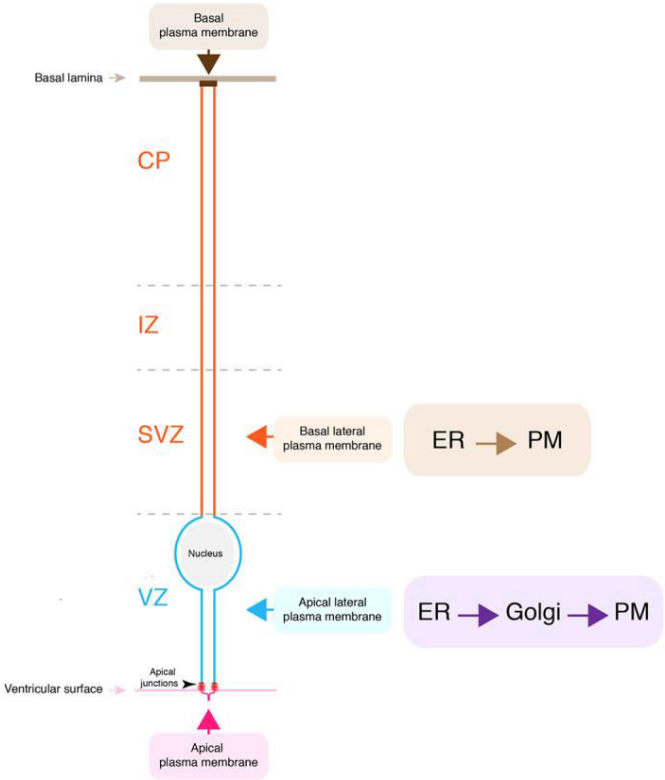


Figure 11 : Les voies de synthèses et de trafic canoniques et non conventionnelles des membranes plasmiques vers les différents domaines des cellules gliales radiaires.

Les constituants de la membrane apicale (magenta) et de la membrane apicale latérale (bleu) sont principalement approvisionnés via le trafic canonique (violet) passant par l'appareil de Golgi. A l''inverse, les constituants de la membrane latérale basale (orange) et du domaine basal (marron) transiteraient par l'intermédiaire d'un trafic non conventionnel impliquant le réticulum endoplasmique (ER) mais pas l'appareil de Golgi. PM : membrane plasmique ; VZ : zone ventriculaire ; SVZ : zone sous-ventriculaire ; IZ : zone intermédiaire ; CP : plaque corticale. (D'après Taverna et al. 2016)

c. Le prolongement basal

Le prolongement basal présent dans les cellules gliales radiaires apicales et basales et qui entre en contact avec la lame basale de la surface piale a d'abord été seulement considéré comme un échafaudage pour la migration des neurones mais par la suite il a aussi été identifié comme un compartiment jouant un rôle dans la signalisation et la détermination du destin cellulaire. Durant la neurogenèse la répartition du prolongement basal pendant la mitose est principalement asymétrique et donc hérité par l'une des deux cellules filles (Miyata et al., 2001). La cellule fille qui hérite du prolongement basal maintiendra principalement son habilité à s'auto-renouveler tandis que l'autre cellule sera destinée à se différencier (Shitamukai et al., 2011). En effet, il a par exemple été montré que la cycline D2 (une protéine régulatrice permettant la progression en phase G1) s'accumule au niveau du pied basal des GR grâce à une séquence régulatrice présente dans son ARNm et est donc hérité de manière asymétrique, ce qui a pour conséquence de maintenir la cellule fille héritant du prolongement basal à l'état de progéniteur (Tsunekawa et al., 2012, 2014). Il a également été montré qu'en absence de laminine alpha2 et alpha4, les GR ne peuvent plus s'attacher correctement au niveau de la lame basale ce qui a pour conséquence une réduction de la prolifération des progéniteurs et finalement de la taille du cerveau de souris (Radakovits et al., 2009). Un autre régulateur essentiel permettant la régulation des signaux provenant de la matrice extra-cellulaire présente dans la lame basale est le récepteur couplé à la protéine G, GPR56. GPR56 est connu pour promouvoir la prolifération des progéniteurs neuronaux du fait de sa présence enrichie au niveau du prolongement basal, ce qui permet sa stabilisation en se liant par exemple avec le collagène III (Jeong et al., 2013; Singer et al., 2013). Il est intéressant de noter que des mutations dans GPR56 ont été reportées comme étant responsables de malformations du développement cortical et en particulier dans des cas de polymicrogyrie (excès de la gyration à la surface du cerveau) qui résultent d'une anomalie de l'attachement basal des fibres des cellules gliales radiaires et une perte de l'intégrité de la membrane piale (Bahi-Buisson et al., 2010; Li et al., 2008; Parrini et al., 2009; Piao et al., 2004).

1.3.2 La cinétique du cycle cellulaire

a. La migration nucléaire intercinétique

La migration nucléaire intercinétique (MNI) est un mécanisme distinctif des cellules neuroépithéliales et des cellules gliales radiaires et décrit le fait que le noyau des cellules se déplace en coordination avec le cycle cellulaire. Comme vu précédemment, la mitose a lieu au niveau le plus apical de la ZV, puis le noyau migre de la région apicale vers la région basale durant la phase G1 pour atteindre le niveau le plus basal pendant la phase S et enfin le noyau migre vers la région la plus apicale pendant la phase G2 afin d'entrer de nouveau en mitose (Taverna and Huttner, 2010) (Figure 12).

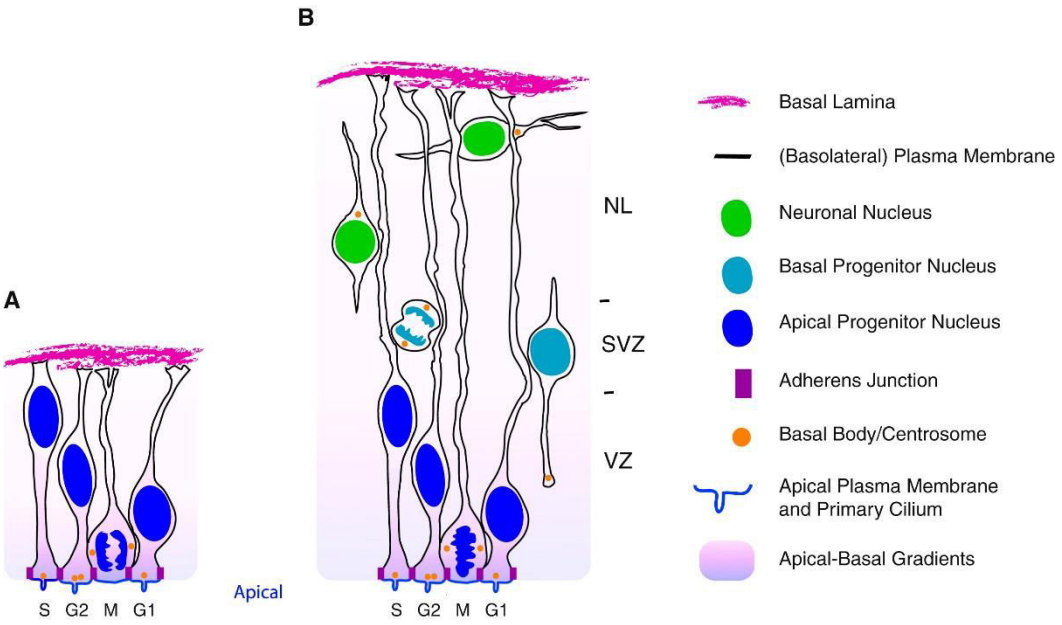


Figure 12 : La migration nucléaire intercinétique des progéniteurs neuronaux.

Pour plus de détails, voir le texte principal. (D'après Taverna & Huttner 2010)

La machinerie moléculaire de la MNI repose principalement sur la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine, des microtubules et du centrosome. Les protéines associées aux microtubules telles que Lis1 ou le moteur moléculaire dynéine jouent un rôle crucial lors de la migration nucléaire apicale durant la phase G2, le noyau étant transporté comme un cargo le long des microtubules (Gambello et al., 2003; Tsai et al., 2005, 2010). Des mutations dans ces gènes ont été logiquement associées à des malformations du développement cortical chez l'Homme telles que les lissencéphalies qui se caractérisent par un cerveau lisse (absence ou très forte réduction de la gyration) (Bahi-Buisson and Guerrini, 2013; Moon and Wynshaw-Boris, 2013; Poirier et al., 2013; Reiner and Sapir, 2013). Le mécanisme moléculaire qui entre en jeu dans le cas de la migration nucléaire basale lors de la phase G1 reste encore assez peu compris. D'un côté des études montrent l'implication d'une kinésine non conventionnelle, la kinésine-3, dans le transport du noyau tandis que d'autres études mettent davantage en avant le rôle du cytosquelette d'actomyosine (Schenk et al., 2009; Tsai et al., 2010). Un autre modèle a également été proposé pour expliquer le mécanisme de migration basale qui reposerait sur un déplacement passif du noyau vers la région apicale causé par le replacement actif vers la région apicale des noyaux des cellules en phase G2 avoisinantes (Kosodo et al., 2011).

Il a été proposé que la MNI ait pour fonction d'optimiser au maximum la place occupée par les progéniteurs au niveau de la VZ en répartissant l'ensemble des noyaux (et donc la partie la plus imposante par rapport aux prolongements basaux et apicaux) sur une plus grande surface afin d'assurer la bonne expansion des progéniteurs (Frade, 2002; Miyata, 2008). De plus, la MNI peut influencer indirectement le destin cellulaire des progéniteurs en contrôlant l'exposition des corps

cellulaires contenant le noyau à des signaux environnementaux différents qui peuvent être neurogéniques ou prolifératifs selon l'axe apico-basal. En particulier, il existe un gradient de Notch dans la ZV avec un enrichissement au niveau la partie la plus apicale. Les corps cellulaires présents au niveau apical sont donc plus exposés au signal prolifératif Notch tandis que les corps cellulaires les plus basaux sont moins exposés et vont donc préférentiellement se différencier (Murciano et al. 2002; Del Bene et al. 2008; Latasa et al. 2009).

A l'inverse des cellules neuroépithéliales et des cellules gliales radiaires apicales, les progéniteurs intermédiaires basaux et apicaux et les cellules gliales radiaires basales ne réalisent pas la MNI. Cependant, certaines études ont montré que ces cellules pouvaient subir une migration du noyau le long des prolongements basaux en direction de la plaque corticale juste avant d'entrer en mitose, ce processus a été nommée *Mitotic somal translocation* (MST) (Hansen et al., 2010; LaMonica et al., 2013). Même si les mécanismes mis en place lors de la MST restent très largement inconnus, une étude récente a montré que la MST requiert l'activation de ROCK, un effecteur de Rho, et de la myosine II mais de manière surprenante ne met pas en jeu les microtubules et le déplacement du centrosome dans le processus antérieur, ce qui semble fortement distinguer la MST de la MNI (Ostrem et al., 2014).

b. La longueur du cycle cellulaire

L'un des déterminants clé de la neurogenèse est la longueur du cycle cellulaire. Des analyses de la longueur du cycle cellulaire selon les types de progéniteurs ont révélé dans un premier temps que les GRa arrivés vers le milieu de la neurogenèse ont un cycle cellulaire plus long que les GRa en début de neurogenèse, ce qui se reflète par un allongement des phases G1 et S (Arai et al., 2011; Calegari et al., 2005). Il a également été montré que les PIa et les PIb neurogéniques passent plus de temps dans le cycle cellulaire, en particulier dans la phase G1, que les GRa. Enfin, les GRa et les PIb neurogéniques restent moins longtemps dans le cycle cellulaire que les GRa et PIb proliératives, ce qui est une conséquence du raccourcissement de la phase S. L'observation du rallongement de la phase S a suggéré que les progéniteurs les plus précoces requièrent un meilleur système de fidélité et de réparation de l'ADN lors de la réplication puisque des erreurs seraient transmises à un plus grand nombre de descendants que des erreurs commises dans des progéniteurs plus tardifs et déjà engagés dans la voie de la différenciation (Arai et al., 2011).

De manière parallèle et cohérente, il a été montré que lorsque la phase G1 est prolongée de manière forcée chez la souris par inhibition pharmacologique de Cdk2/Cycline E ou par l'ARN interférence de Cdk4/Cycline D1, cela entraine une neurogenèse précoce des progéniteurs au détriment de leur prolifération (Calegari and Huttner, 2003; Lange et al., 2009). A l'inverse, le raccourcissement forcé de

la phase G1 par surexpression de la Cycline D1, la Cycline E1 ou le couple Cdk4/Cycline D1 favorise la prolifération des progéniteurs et retarde la neurogenèse (Lange et al., 2009; Pilaz et al., 2009).
La longueur des différentes phases du cycle cellulaire semble donc liée à la balance entre prolifération et différenciation des progéniteurs neuronaux, avec un allongement de la phase G1 associé à une transition vers un état plus différencié et la maintenance d'une phase S plus longue associée avec l'expansion des progéniteurs.

1.3.3 Signalisations cellulaires impliquées dans la neurogenèse

Comme mentionné précédemment, une grande variété de voies de signalisation, telles que Notch, Wnt, Shh et mTOR ont un effet sur la prolifération des progéniteurs et sont donc impliquées dans la neurogenèse (Figure 13).

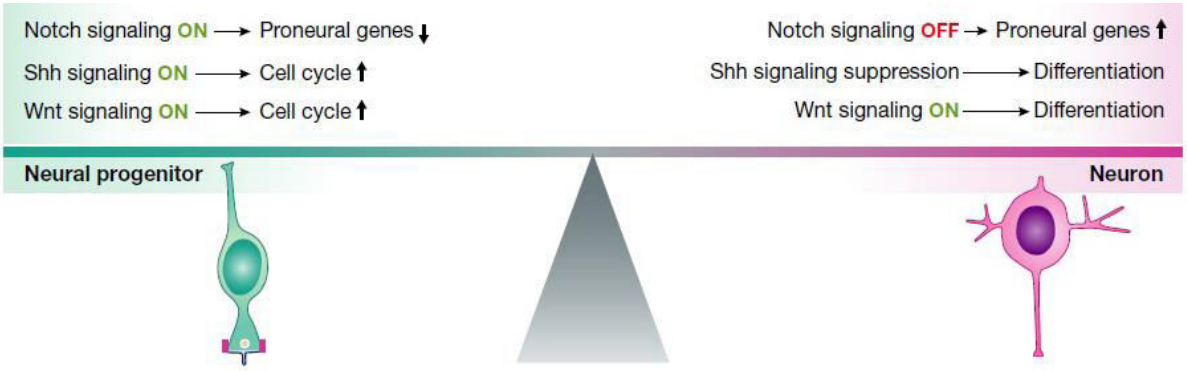


Figure 13 : Schéma récapitulant l'influence des voies de signalisation sur la balance entre prolifération et différenciation des progéniteurs neuronaux. (D'après Paridaen & Huttner 2014)

a. La voie de signalisation Notch

La voie de signalisation Notch joue un rôle essentiel dans le développement du système nerveux et en particulier durant la neurogenèse embryonnaire via le processus d'inhibition latérale (Pierfelice et al., 2011). La signalisation Notch est déclenchée par l'interaction intercellulaire entre les ligands de Notch (*Delta like* (DLL) ou Jagged) et le récepteur de Notch, qui est exprimé à la surface des cellules gliales radiaires. Cette interaction induit le clivage du récepteur et la libération du domaine intracellulaire de Notch (*Notch intracellular domain*, NICD) dans le cytoplasme des cellules gliales radiaires. NICD active ensuite l'expression des gènes de la famille HES, qui codent pour des répresseurs transcriptionnels de gènes pro-neurogéniques tels que les neurogénines et Asc1 (Dhanesh et al., 2016). Cette libération de NICD dans le cytoplasme des cellules gliales radiaires permet de maintenir leur potentiel prolifératif et éviter leur différenciation en neurones ou en progéniteurs intermédiaires. Les paires de cellules filles dérivées de divisions asymétriques de cellules gliales radiaires présentent des asymétries au niveau

des composants et de l'activité de la signalisation Notch. Par exemple, durant la division asymétrique des cellules gliales radiaires, la cellule exprimant un plus grand nombre de récepteur Notch maintient son état de cellule gliale radiaire tandis que la cellule fille exprimant moins de récepteur Notch mais plus de DLL va exprimer les gènes pro-neurogéniques et ainsi initier son détachement de la surface du ventricule et sa différenciation neuronale (Dong et al., 2012; Ochiai et al., 2009).

b. La voie de signalisation Wnt/ß-Caténine

La voie de signalisation Wnt/ß-Caténine est cruciale pour de nombreux processus cellulaires et physiologiques régulant la prolifération, la différenciation, la migration durant le développement embryonnaire (Bengoa-Vergniory and Kypta, 2015). La ß-Caténine est l'acteur central dans la voie de signalisation Wnt canonique. Après la liaison de Wnt à ses récepteurs de surface Frizzled et Lrp5/6, la ß-Caténine est stabilisée au niveau du cytoplasme (par inhibition de sa dégradation par le complexe GSK3/APC/CDK1) et se transloque dans le noyau où elle peut activer le complexe de transcription Tcf/Lef1 pour réguler l'activité des gènes cibles de la voie Wnt (Li et al., 2012b).

La voie Wnt semble jouer un rôle double et opposé durant la neurogenèse. Durant la neurogenèse précoce (environ E10), la signalisation Wnt/ß-Caténine favorise les divisions symétriques des cellules gliales radiaires et retarde la formation des progéniteurs intermédiaires (Chenn and Walsh, 2002; Wrobel et al., 2007). Cependant, durant la neurogenèse un peu plus tardive (environ E13), l'activité Wnt favorise la formation des progéniteurs intermédiaires et la différenciation neuronale via l'augmentation de l'expression de N-Myc et de la Neurogénine-1 (Hirabayashi et al., 2004; Kuwahara et al., 2010; Munji et al., 2011). Il est intéressant de noter que la délétion de GSK-3β vers E10 résulte en une prolifération massive des progéniteurs apicaux associée à une très forte réduction de la production de progéniteurs intermédiaires et de neurones post-mitotiques (Kim et al., 2009). La délétion de GSK-3β mène donc à un phénotype similaire cohérent avec le rôle connu de GSK-3β dans la dégradation de la β-Caténine. Il est aussi décrit que l'interaction de l'Axine avec la GSK-3β dans le cytoplasme est critique pour l'amplification du pool de progéniteurs intermédiaires tandis que l'interaction entre l'Axine et la β-Caténine dans le noyau favorise la différenciation neuronale (Fang et al., 2013) (Figure 14).

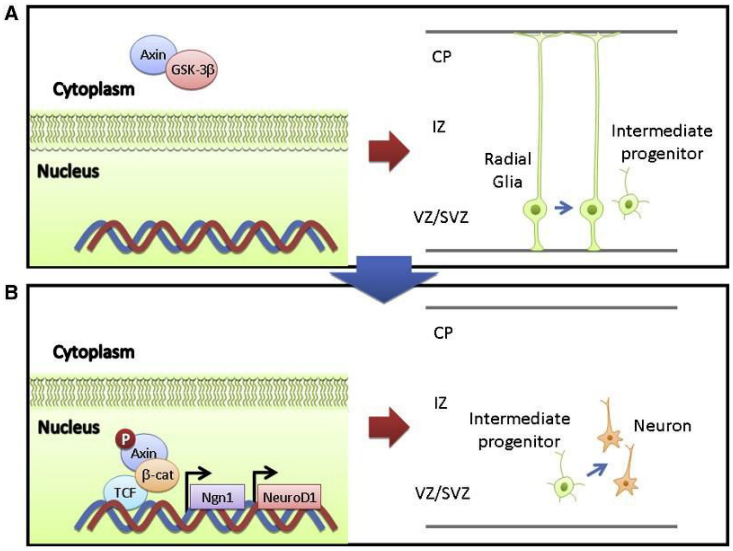


Figure 14 : La localisation subcellulaire de l'Axine dirige l'amplification et la différenciation des progéniteurs intermédiaires via différents réseaux de signalisation.

(A) L'amplification du pool de progéniteurs intermédiaires est régulée par l'interaction de l'Axine et de GSK-3β dans le cytoplasme des cellules gliales radiaires.
(B) A mesure que le développement progresse, l'Axine devient enrichie dans le noyau, via la phosphorylation par Cdk5, dans les progéniteurs neuronaux et en particulier dans les progéniteurs intermédiaires et interagit avec la β-Caténine pour permettre la transcription de gènes pro-neurogéniques. (D'après Fang et al. 2013)

Les résultats contradictoires montrant une implication de la voie Wnt/ß-Caténine dans la prolifération et dans la différenciation peut s'expliquer par le fait que les modèles de souris KO pour ß-Caténine présentent des défauts dans l'adhésion intercellulaire et dans l'intégrité des tissus via le rôle de la ß-Caténine dans la mise en place des jonctions adhérentes. Dans une étude récente, les auteurs ont réalisé la construction d'un mutant de la ß-Caténine avec une activité d'adhésion cellule-cellule normale mais avec une activité transcriptionnelle défective (Draganova et al., 2015). La délétion de l'activité de signalisation Wnt mène à une déplétion du pool de progéniteurs apicaux concomitant à une augmentation du nombre de progéniteurs intermédiaires basaux. Les auteurs montrent que la dérégulation de la signalisation Wnt/ß-Caténine perturbe le contrôle temporel du début de la neurogenèse (neurogenèse plus précoce), ce qui mène à une réduction de la production de neurones des couches superficielles et profondes (Draganova et al., 2015).

c. La voie de signalisation Shh

Sonic Hedgehog (Shh) correspond à une voie de signalisation conservée et essentielle pour la mise en place de la polarité dorso-ventrale du système nerveux des vertébrés. La transduction du signal Shh débute lorsque la protéine Shh extracellulaire se lie à la protéine transmembranaire Patched (Ptch), inhibant ainsi son effet répressif sur Smoothened (Smo), ce qui mène à son accumulation dans le cil primaire. Smo est un élément de signalisation positif déclenchant une cascade d'événements intracellulaires qui mènent à l'accumulation du facteur de transcription Gli sous sa forme active, GliA, plutôt que sa forme répressive, GliR.

En plus de son rôle dans la mise en place de la polarité dorso-ventrale, la signalisation Shh joue un rôle crucial dans la régulation de la cinétique du cycle cellulaire des cellules gliales radiaires et également

dans la production des progéniteurs intermédiaires (Komada et al., 2008; Wang et al., 2011a). Durant la neurogenèse, le niveau d'activation de la signalisation Shh diminue tandis que l'activité du répresseur GliR augmente, ce qui est nécessaire pour la production des progéniteurs intermédiaires et la différenciation neuronale (Shikata et al., 2011) (Figure 15). Il est intéressant de noter que durant le développement du cortex, la signalisation Shh favorise les divisions prolifératives symétriques des cellules gliales radiaires via la transcription de gènes cibles de Notch tels que *Hes1* et *Blbp*, montrant ainsi des couplages et des communications croisées entre les différentes voies de signalisation dans la régulation de la prolifération des progéniteurs neuronaux (Dave et al., 2011). Une étude a également révélé le rôle critique joué par Sufu, un régulateur négatif des protéines Gli, dans la spécification des neurones pyramidaux (Yabut et al., 2015). La délétion de Sufu à une étape précoce du développement mène à une dérégulation de la quantité de protéine Gli, qui est associée à une maintenance des progéniteurs neuronaux et à une spécification des neurones pyramidaux erronée (Yabut et al., 2015).

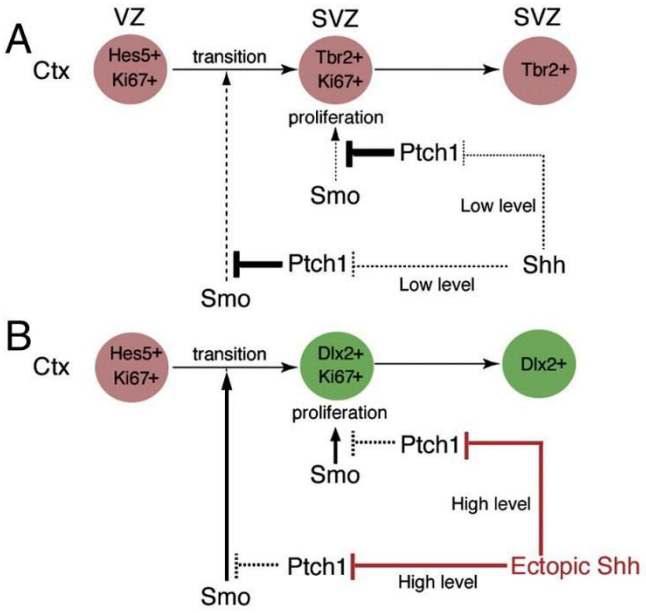


Figure 15 : Schéma de l'implication de la voie Shh dans la neurogenèse.

(A) Dans le cortex (Ctx) en développement, la signalisation Shh favorise la transition des progéniteurs de la zone ventriculaire (VZ ; Hes5+ et Ki67+, rouge) en progéniteurs intermédiaires de la zone sous-ventriculaire (SVZ ; Tbr2+ et Ki67+, rouge) et est impliquée dans l'activation de la prolifération des progéniteurs intermédiaires. Ces effets se font via la régulation négative de Ptch1.
(B) Les progéniteurs corticaux de la zone ventriculaire au stade E13.5-15.5 sont toujours capables de répondre à un fort niveau de signalisation Shh ectopique, ce qui entraine un changement d'identité et l'adoption d'une identité de progéniteurs ventraux (Dlx2+, vert). (D'après Shikata et al. 2011)

Plus récemment, il a été montré que la signalisation Shh augmente la génération et l'auto-renouvellement des cellules gliales radiaires basales et la prolifération des progéniteurs intermédiaires et cet effet est accompagné de la formation de gyri à la surface du cerveau de souris en développement qui est normalement lisse (Wang et al., 2016a). Ces résultats montrent donc le rôle crucial joué par la signalisation Shh dans les étapes précoces du développement du cerveau.

d. La voie de signalisation mTOR

La protéine mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) est une sérine/thréonine kinase qui se retrouve dans deux complexes distincts, mTORC1 et mTORC2, lesquels sont différentiellement régulés par un grand nombre de nutriments, tels que le glucose et les acides aminés, des facteurs de croissance, des hormones ou des neurotransmetteurs. La voie de signalisation mTOR régule de nombreuses fonctions cellulaires basiques telles que la synthèse de protéines, le métabolisme, la taille des cellules, la biosynthèse de lipides et la biogenèse des mitochondries (Bockaert and Marin, 2015) (Figure 16). Il n'est donc pas surprenant que la voie mTOR soit impliquée dans l'ensemble des processus du développement cortical, de la régulation de la neurogenèse à la plasticité synaptique (Lipton and Sahin, 2014).

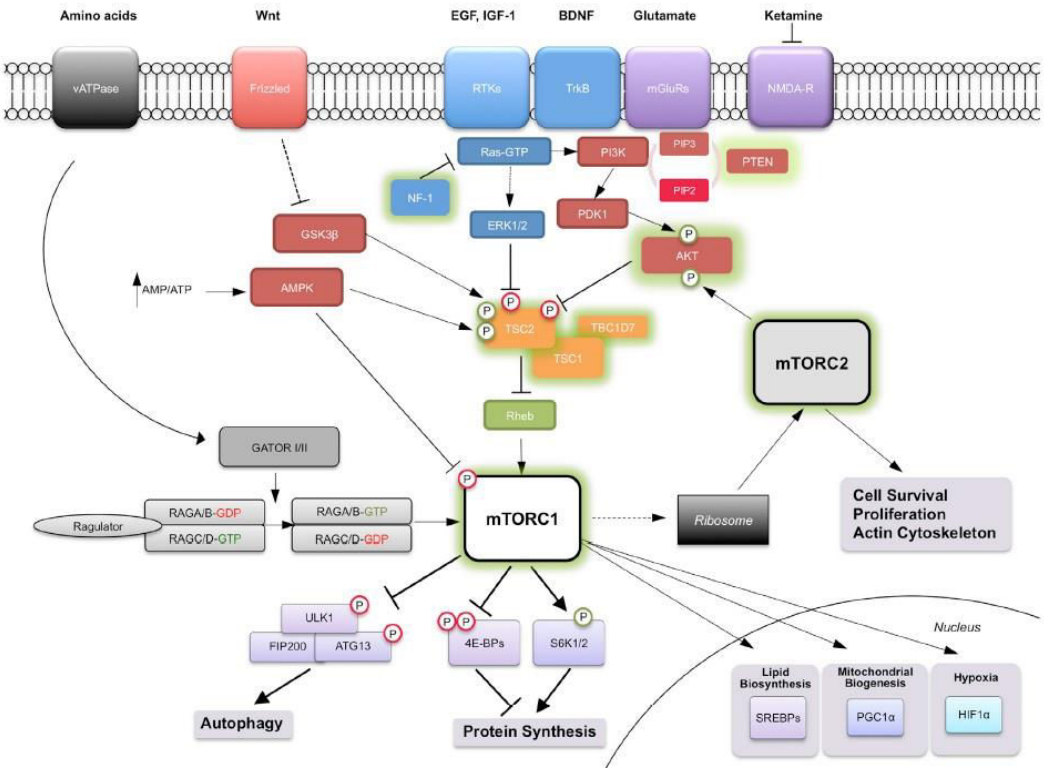


Figure 16 : La voie de signalisation mTOR

(D'après Lipton et Sahin, 2014)

Des analyses d'expression ont suggéré que la signalisation mTORC1 est active dans les zones proliférative du système nerveux central en développement puisque les formes phosphorylées de mTOR, S6k1, Rps6 et 4E-BP1 sont fortement exprimées au niveau de la zone ventriculaire à E13.5 (Ka et al. 2014). La première preuve de l'importance de la signalisation mTORC1 dans le cerveau en développement fut la découverte d'embryons incapables de former le télencéphale et dont ce phénotype a été attribué à une mutation dans mTOR (Hentges et al., 2001).

Les souris KO pour mTOR meurent vers le jour 6 du développement embryonnaire suite à une très forte réduction de la prolifération et ne peuvent donc pas être utilisées pour étudier le rôle de la voie mTOR dans le développement cortical *in vivo* (Gangloff et al., 2004; Murakami et al., 2004). En 2013, Ka et *coll* ont donc utilisé un modèle souris KO conditionnel pour mTOR afin de supprimer l'expression de mTOR uniquement dans les cellules gliales radiaires (Ka et al., 2014). Ils ont observé que ces souris présentent un cerveau de taille réduite avec une diminution du nombre de progéniteurs en prolifération et du nombre de neurones produits conséquent à une perturbation de la progression dans le cycle cellulaire des progéniteurs neuronaux. Dans une étude récente, l'effet de l'expression d'un mutant actif de mTORC1 durant des stades du développement différents a été analysé (Kassai et al., 2014). L'activation de mTORC1 spécifiquement dans le télencéphale dorsal au cours du développement précoce (E10) entraine une réduction importante de la taille du cerveau qui serait la conséquence d'une augmentation de l'apoptose des progéniteurs neuronaux. L'activation plus tardive spécifiquement dans les neurones post-mitotiques résulte en un arrêt de la migration dans les couches profondes et une augmentation de la taille du corps cellulaire des neurones en migration, indiquant un rôle crucial de mTORC1 dans de nombreux processus cruciaux de la corticogenèse.

1.3.4 Régulations transcriptionnelles

Un très grand nombre de facteurs de transcription ont été impliqués dans la prolifération des progéniteurs neuronaux (Figure 17). Des défauts dans la division des progéniteurs et dans la croissance du cerveau ont par exemple été retrouvés chez des souris mutantes pour les facteurs de transcription à homéodomaine Pax6, Lhx2 et Arx, le récepteur nucléaire Tlx et le facteur de transcription à domaine *Winged*-Hélice Foxg1 (Arai et al., 2005; Friocourt et al., 2008; Hanashima et al., 2004; Porter et al., 1997; Roy et al., 2004). Durant le développement, le système nerveux central est soumis à des gradients de morphogène tels que Fgf, Bmp, Shh et Wnt ce qui entraine des régionalisations des expressions des facteurs de transcription et par conséquent une organisation et une morphogenèse hautement structurées et spécialisées (Martynoga et al., 2012).

Pax6 est l'un des facteurs les plus étudiés et apparait comme un régulateur clé dans la neurogenèse embryonnaire (Ypsilanti and Rubenstein, 2016). Pax6 favorise la prolifération des cellules gliales radiaires en jouant par exemple sur l'orientation du fuseau mitotique (Asami et al., 2011). Mais il peut aussi favoriser la neurogenèse par l'induction de gènes pro-neurogéniques tels que les Neurogénines (Sansom et al., 2009). Ces effets opposés semblent être régulés par des épissages alternatifs de Pax6 et son interaction avec d'autres facteurs de transcription tels que Sox2 et Hes1 (Osumi et al., 2008; Sansom et al., 2009; Walcher et al., 2013).

Plusieurs facteurs de transcription, incluant Ngn2, Insm1 et Ap2γ, sont impliqués dans l'étape cruciale de la génération de progéniteurs basaux à partir des cellules gliales radiaires. Ces trois facteurs de transcription partagent la capacité d'induire l'expression de Tbr2, qui est un facteur de transcription requit pour la génération des progéniteurs basaux (Martynoga et al., 2012).

La différenciation neuronale est induite via l'expression de gènes pro-neurogéniques spécifiques de certaines régions tels que les facteurs de transcription SoxC, Sox4 et Sox11, les neurogénines Ngn1/2 et Ascl1 (Kamachi and Kondoh, 2013; Martynoga et al., 2012). En particulier, le facteur de transcription Ascl1 est connu pour réguler les étapes précoces et tardives du développement, incluant la division des cellules gliales radiaires et la migration radiaire des neurones post-mitotiques (Pacary et al., 2011, 2013). Ascl1 remplit ses fonctions par la régulation transcriptionnelle directe d'un grand nombre de gènes cibles. Ces effecteurs incluent des protéines contrôlant différents aspects de la neurogenèse tels que la progression dans le cycle cellulaire via la régulation de la petite RhoGTPase Rnd3 ou la réorganisation du cytosquelette nécessaire à la migration neuronale par régulation notamment de la protéine associée au centrosome et responsable de microcéphalies, CENPJ (Bond et al., 2005; Garcez et al., 2015; Pacary et al., 2011, 2013).

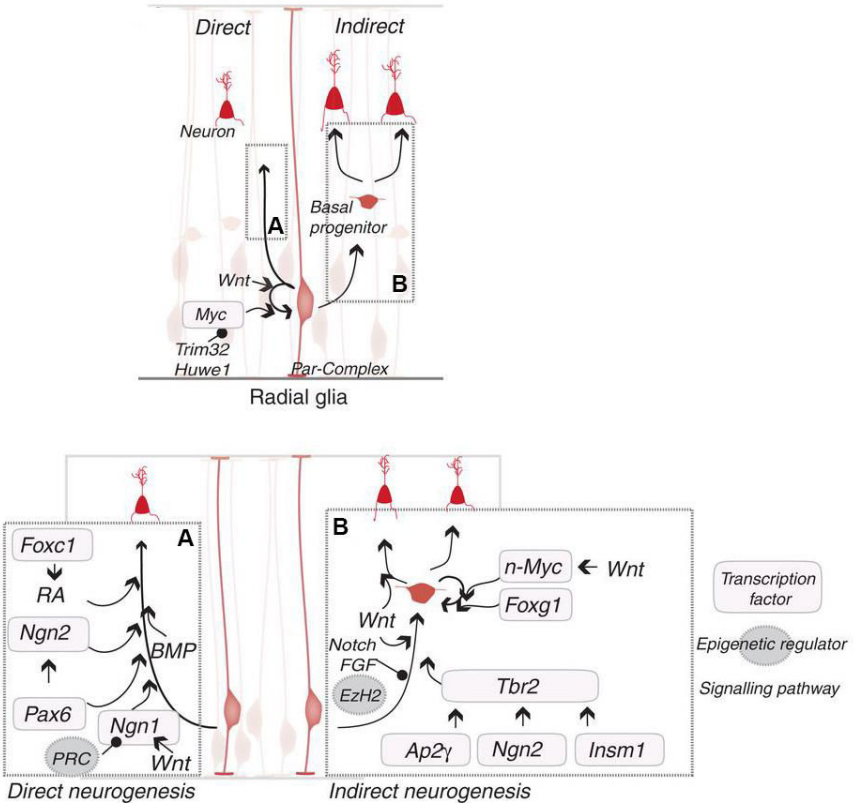


Figure 17 : Régulations transcriptionnelles de la balance entre neurogenèse directe et indirecte.

Pour plus de détails, voir le texte principal. (D'après Martynoga et al. 2012)

1.3.5 Mécanismes épigénétiques

Au cours des dernières années de nombreuses études ont souligné l'importance des modifications épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN et la modification des histones dans le contrôle de l'expression des gènes régulant la neurogenèse et la transition entre la production de neurones et de cellules gliales (Yao and Jin, 2014; Yao et al., 2016). Les progéniteurs les plus précoces expriment plus fortement les régulateurs des modifications épigénétiques comme par exemples les protéines HMG qui régulent l'état de la chromatine ou les méthyltransférases telles que Ezh2 qui ont un rôle dans la modification des histones (Kishi et al., 2012; Pereira et al., 2010). De plus, la chromatine des progéniteurs les plus précoces est dans un état plus condensé que les progéniteurs tardifs (Kishi et al., 2012). La condensation globale de la chromatine et les modifications épigénétiques de certains gènes semblent être impliquées dans la transition entre neurogenèse et gliogenèse comme par exemple la méthylation de l'ADN du gène codant la GFAP (filament intermédiaire présent dans les cellules gliales du système nerveux et en particulier dans les astrocytes) qui empêche une gliogenèse précoce au détriment de la neurogenèse (Fan et al., 2005). L'activation de la voie Notch dans des stades plus tardifs induit la déméthylation du promoteur de la GFAP par l'intermédiaire de l'induction de Nfia qui va dissocier les ADN méthyltransférases (Namihira et al., 2009). A l'inverse, durant les étapes précoces de la neurogenèse, l'expression des gènes induisant la production de neurones tel que Ngn1 est réprimé par les protéines Polycomb (Hirabayashi et al., 2009).

L'activité de facteurs de transcription est aussi régulée par l'intermédiaire de mécanismes épigénétiques. Par exemple, Pax6 interagit avec BAF155 et BAF170, qui sont des composants du complexe de remodelage des nucléosomes, SWI/SNF (Tuoc et al., 2013) (Figure 18). Durant la neurogenèse précoce, BAF170 entre en compétition avec BAF155 et modifie ainsi la structure de l'euchromatine ce qui entraine le recrutement du complexe répresseur Pax6/REST qui réprime l'expression des gènes cibles de Pax6 tels que Tbr2 et Cux2 qui sont des gènes nécessaires pour la génération des progéniteurs basaux et des neurones (Tuoc et al., 2013). Plus récemment, il a été montré par la même équipe que le complexe BAF155/BAF170 est indispensable dans le développement du cortex pendant les étapes de prolifération, différenciation et survie cellulaire des progéniteurs neuronaux (Narayanan et al., 2015). Ce complexe interagit avec les déméthylases H3K27 et potentialise leurs effets et contrôle ainsi le programme transcriptionnel global et l'état de la chromatine des cellules durant le développement. Un autre exemple correspond à l'interaction entre la protéine de remodelage de la chromatine Snf2l et le gène Foxg1, un régulateur clé de la neurogenèse. Il a été montré que Snf2l se lie au locus de Foxg1 à la mi-neurogenèse et inhibe ainsi son expression, ce qui a pour conséquence de lever l'effet d'inhibiteur de Foxg1 exercé sur p21, qui est un régulateur positif de la sortie du cycle cellulaire, promouvant ainsi la différenciation neuronale des

progéniteurs (Yip et al., 2012). Ces deux exemples montrent donc que la régulation de la chromatine pendant la neurogenèse contrôle la taille et l'épaisseur du cortex cérébral.

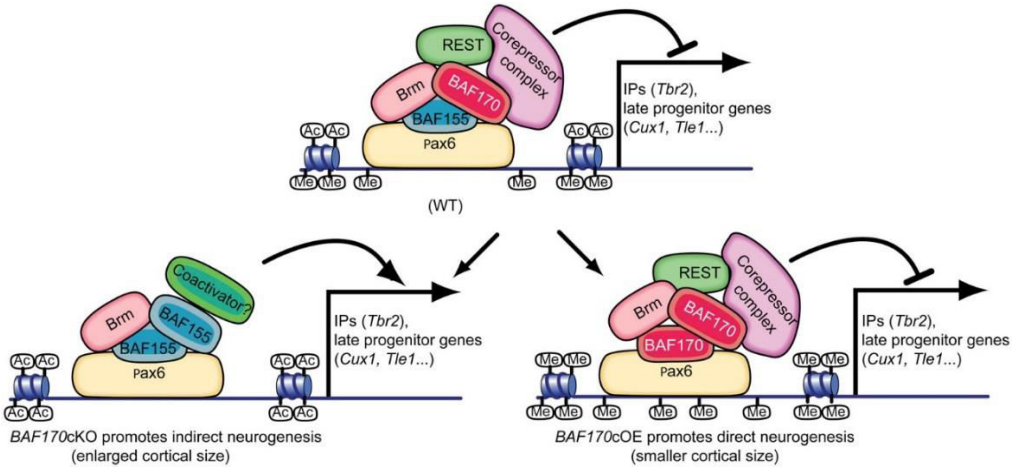


Figure 18 : Modèle du contrôle de la prolifération des progéniteurs neuronaux par la régulation de la structure de la chromatine par BAF170.

Durant la neurogenèse précoce (jusqu'à E14.5), dans des conditions sauvages (WT), Pax6 interagit avec BAF155 et BAF170 (sous-unités du complexe SWI/SNF), ce dernier recrute le complexe REST-corépresseur au niveau du promoteur des gènes cibles de Pax6 impliqués dans la spécification en progéniteurs intermédiaires. Le KO pour BAF170 entraine un remplacement de BAF170 par BAF155, la perte du recrutement du complexe REST-corépresseur et l'induction d'une structure de la chromatine qui lève la répression exercée sur les gènes cibles de Pax6 impliqués dans la neurogenèse. A l'inverse, la surexpression de BAF170 entraine une compétition avec BAF155, ce qui a un effet sur l'état de la chromatine et permet la répression des gènes cibles de Pax6 et promeut la neurogenèse directe. (D'après Tuoc et al. 2013)

1.3.6 L'environnement des progéniteurs

En plus des signaux extra-cellulaires mentionnés précédemment, de nombreux signaux provenant de l'environnement des progéniteurs peuvent influencer le comportement de ces cellules (Figure 19).

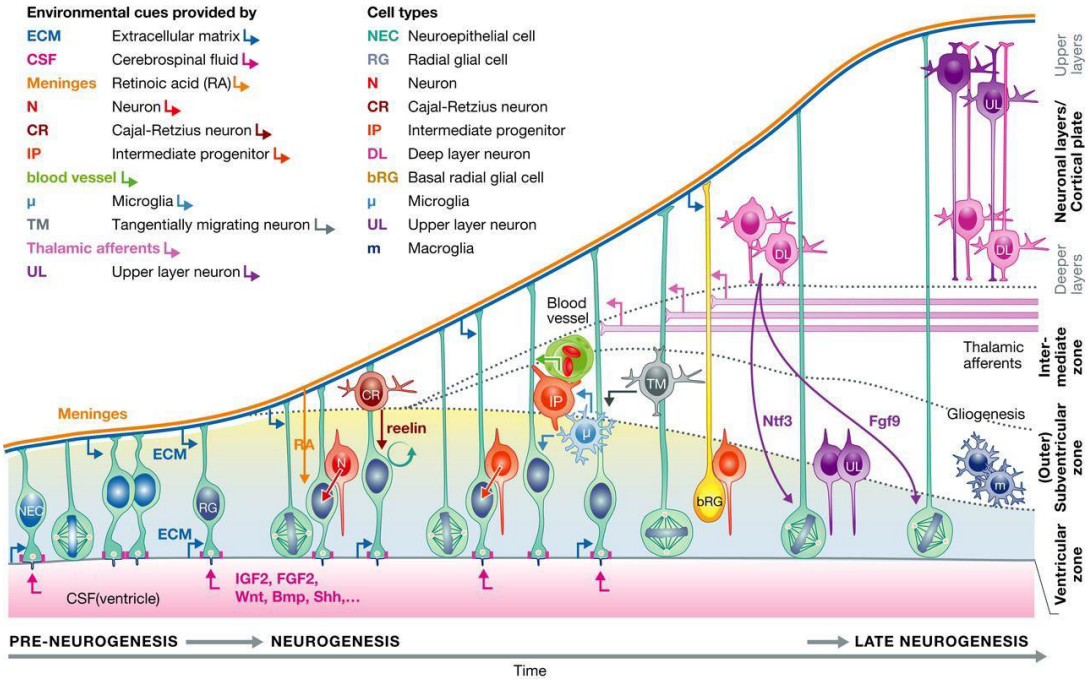


Figure 19 : Signaux environnementaux régulant la prolifération et la différenciation des progéniteurs neuronaux.

Pour plus de détails, voir le texte principal. (D'après Paridaen & Huttner 2014)

Nous avons pu voir précédemment que la majorité des signaux reçus par les cellules gliales radiaires proviennent de leur domaine apical bordant le ventricule et de leur prolongement basal. Cependant les progéniteurs basaux ne possèdent pas ces deux domaines. Des études ont permis de montrer que la répartition dans l'espace des progéniteurs basaux suivait la distribution des vaisseaux sanguins et semblerait ainsi réguler leur prolifération en agissant comme une source de nutriments et de molécules de signalisation (Javaherian and Kriegstein, 2009; Stubbs et al., 2009). De plus, il a aussi été montré que les prolongements des cellules gliales radiaires ont un rôle dans la stabilisation des vaisseaux sanguins nouvellement formés, via l'inhibition de la voie Wnt, soulignant le lien étroit entre cellules gliales radiaires et le réseau vasculaire du cortex (Ma et al., 2013).

Les cellules de la microglie, qui sont décrites comme les cellules immunitaires du cerveau, sont de plus en plus impliquées dans la neurogenèse et en particulier du fait de leur présence dans les zones proliferatives durant le développement du cerveau (Antony et al., 2011). En particulier, une étude montre que les cellules de la microglie présentes dans la ZV et la ZSV sont capables de restreindre la population de progéniteurs neuronaux en phagocytant des progéniteurs n'ayant pas enclenché de processus de mort cellulaire régulant ainsi leur nombre (Cunningham et al., 2013).

Des travaux ont également mis en évidence que les progéniteurs répondent également à des stress mécaniques au niveau de la VZ. En effet, lorsque les cellules gliales radiaires sont privées de leur prolongement basal elles ne peuvent plus subir de migration nucléaire intercinétique vers la région basale induisant un encombrement au niveau le plus apical de la VZ où se concentrent les mitoses et

provoquant le départ précoce des cellules gliales radiaires vers la région basale (Okamoto et al., 2013) (Figure 20). Ces observations vont dans le sens des propositions de Smart et *coll* qui suggéraient que les divisions au niveau basal surviennent lorsque la surface ventriculaire apicale est encombrée par les mitoses apicales (Smart, 1976).

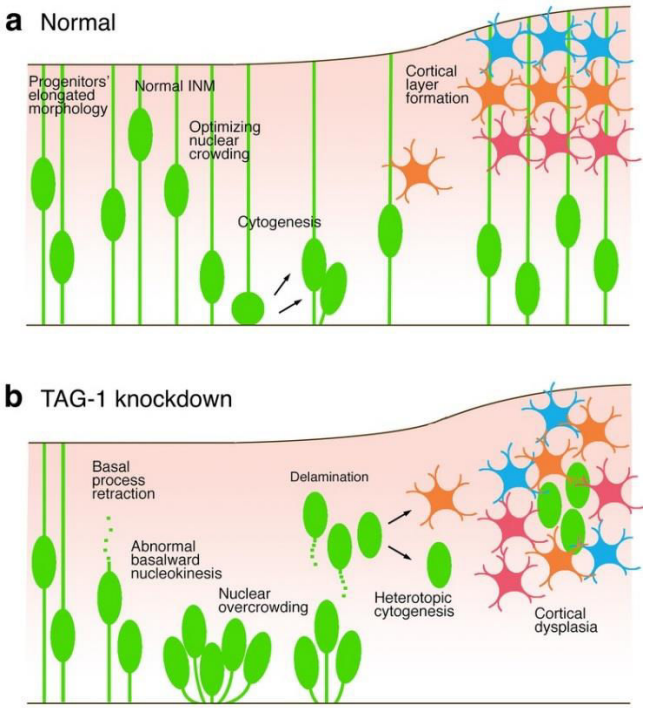


Figure 20 : La migration nucléaire intercinétique est nécessaire pour optimiser l'espace occupé par les corps cellulaires des progéniteurs de la zone ventriculaire.

L'ablation du processus basal des progéniteurs apicaux par suppression de la protéine de surface TAG-1 (TAG-1 knockdown) résulte en une congestion périventriculaire des corps cellulaires des progéniteurs par défaut dans le mouvement nucléaire basal. Ce défaut est suivi d'un détachement précoce de la surface apicale des cellules encombrées menant à des anomalies de la formation du cortex. (D'après Okamoto et al. 2013)

Les neurones post-mitotiques déjà produits peuvent également envoyer des informations en retour aux progéniteurs. En particulier, les cellules de Cajal-Retzius sont connues pour sécréter la glycoprotéine Reelin, qui en plus de son rôle crucial durant la migration neuronale, permet l'activation de la voie Notch dans les cellules gliales radiaires apicales promouvant ainsi les divisions symétriques prolifératives et retardant la neurogenèse (Lakomá et al., 2011). Un autre exemple de régulation à longue distance par des neurones post-mitotiques correspond à une population de neurones glutamatergiques transitoires migrant tangentiellement du télencéphale ventral vers la plaque corticale lors des étapes précoces du développement et disparaissant ensuite (Teissier et al., 2010). En effet, la suppression de ces neurones durant le développement entraine une diminution de la production de neurones corticaux destinés aux couches superficielles du cortex démontrant ainsi leur participation dans le maintien de l'état prolifératif des progéniteurs (Teissier et al., 2012).

Enfin, les méninges qui sont une source d'acide rétinoïque ont également été impliquées dans la régulation de la neurogenèse. L'acide rétinoïque jouant un rôle crucial dans le contrôle de la sortie du cycle cellulaire, les souris n'étant pas capables de former les méninges présentent une très forte réduction de la production de neurones (Siegenthaler et al., 2009).

1.3.6 Le rôle de l'ubiquitination

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle des protéines au même titre que la phosphorylation, l'acylation ou l'alkylation. Cette modification implique la conjugaison d'une ou plusieurs ubiquitines au niveau de résidus lysines du substrat protéique et ce processus est catalysé par l'action séquentielle de 3 classes d'enzymes (E1, E2 et E3) (Figure 21). La spécificité de l'ubiquitination est principalement déterminée par l'E3 ubiquitine ligase qui transfère l'ubiquitine sur le substrat. Il existe de très nombreux gènes codant pour les E3 ubiquitine ligases du fait de leur reconnaissance spécifique du substrat. Elles sont réparties en deux grandes familles, les RING (*Really interesting new gene*) E3 ligases et les HECT (*Homologous to the E6-AP carboxyl terminus*) E3 ligases.

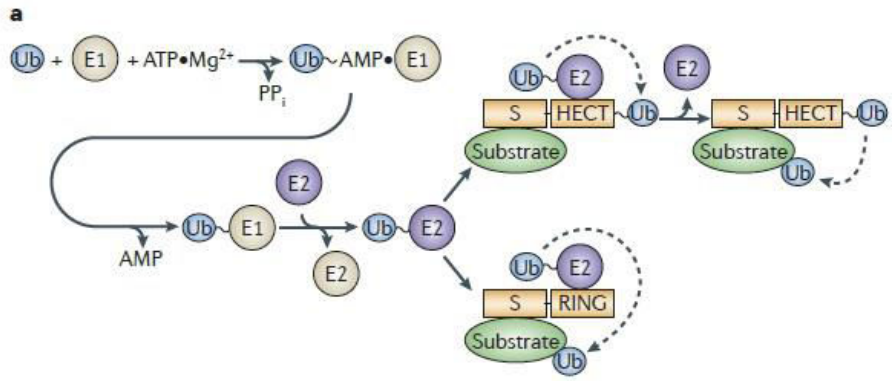


Figure 21 : Le processus d'ubiquitination des protéines.

L'ubiquitination correspond à une réaction séquentielle régulée par 3 classes d'enzymes (E1, E2, E3). L'enzyme activatrice E1 catalyse la formation d'une liaison thioester avec l'ubiquitine de manière ATP dépendante. L'ubiquitine peut ensuite être transférée vers l'enzyme de conjugaison E2, qui sera ensuite reconnue par l'enzyme de ligation E3, dont il existe deux types majeurs que sont les HECT-ligases et les RING-ligases. Les RING-ligases dirigent le transfert direct de l'ubiquitine de E2 vers le substrat tandis que les HECT-ligases reçoivent l'ubiquitine activée de l'enzyme E2, se lient avec via une liaison thioester au niveau du domaine HECT et la transfère vers le substrat qui est en parallèle reconnu spécifiquement la E3-ligase. (D'après Kawabe & Brose 2011)

Le système ubiquitine/protéasome a été impliqué pour la première fois comme un élément clé dans le développement du cerveau par la découverte de l'expression spécifique de l'ubiquitine hydrolase C-terminale PGP 9.5 dans les neurones des embryons de rat (Kent and Clarke, 1991; Wilkinson et al., 1989). Depuis, de nombreuses études ont confirmé le rôle crucial joué par le système ubiquitine/protéasome dans le développement du cerveau (Kawabe and Brose, 2011). Nous allons focaliser sur le rôle joué par les RING E3 ligases *Mind bomb homologue 1* (MIB1), Cdh1-APC et TRIM11 et l'HECT E3 ligase HUWE1 durant la neurogenèse. Mais il est intéressant de noter qu'il a également été montré que lorsque le gène *Ubb* codant pour l'ubiquitine est inactivé, le nombre de cellules souches neuronales diminue tandis que le nombre de cellules gliales augmente, ce qui est justifié par une gliogenèse précoce des cellules souches neuronales (Ryu et al., 2014) (Figure 22). Ces données

montrent donc que le niveau cellulaire d'ubiquitine est un déterminant important dans le contrôle du destin cellulaire et du timing de la différenciation des progéniteurs en neurones et en cellules gliales.

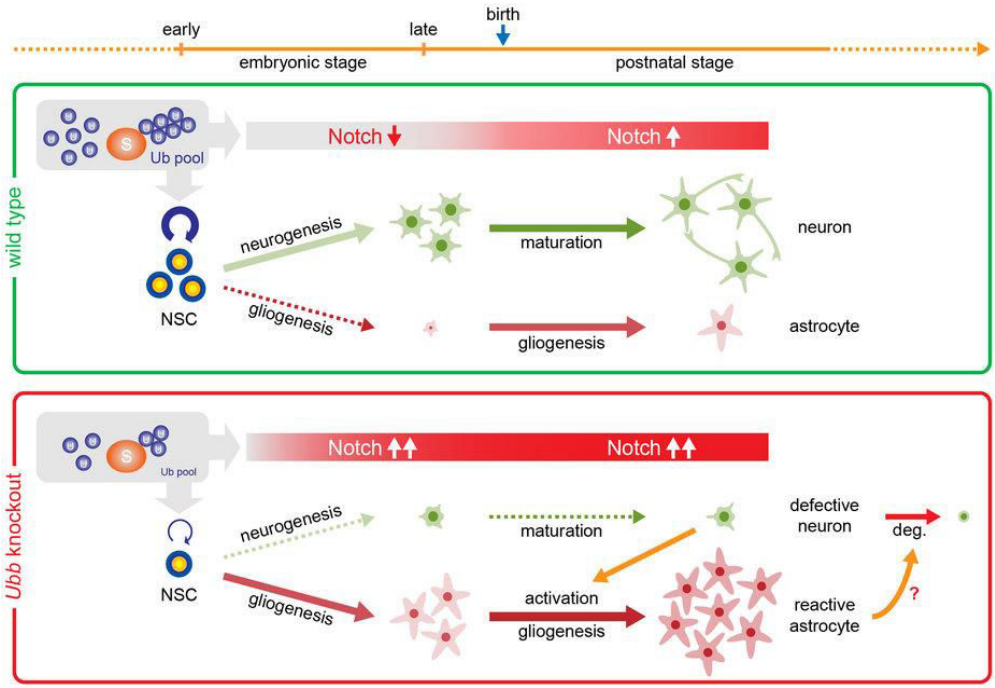


Figure 22 : Modèle proposé pour la régulation de la neurogenèse dépendant du niveau d'ubiquitine via la régulation de la signalisation Notch.

Dans des conditions sauvage (*wild type*), la signalisation Notch est diminuée au niveau embryonnaire afin de promouvoir la neurogenèse tandis que sa signalisation est augmentée en post-natal pour favoriser la gliogenèse et la maturation des neurones. La dérégulation du gène *Ubb* codant pour l'ubiquitine (*Ubb* knockout) réduit le niveau cellulaire en ubiquitine, ce qui résulte en une activation prolongée de la signalisation Notch (augmentation de la stabilité du domaine intracellulaire du récepteur de Notch, NICD) et donc une diminution de l'auto-renouvellement des progéniteurs neuronaux (NSC). L'activation de Notch durant le développement embryonnaire pourrait conduire à une différenciation prématurée des progéniteurs neuronaux en cellules gliales. Les neurones ainsi générés seraient défectueux et engendreraient l'activation des astrocytes qui seraient responsables en retour de la mort cellulaire des neurones défectueux. (D'après Ryu et al. 2014)

a. Contrôle de la signalisation Notch par les E3 ligases MIB1 et HUWE1

La voie de signalisation Notch, dont l'activation inhibe la différenciation neuronale, est connue comme une cible majeure de la régulation par le système ubiquitine/protéasome et en particulier par l'action de la RING E3 ligase MIB1 et la HECT E3 ligase HUWE1 (Figure 23).

La protéine murine MIB1 est fortement exprimée dans les neurones et dans les progéniteurs intermédiaires indiquant que ces cellules envoient un signal Notch aux cellules gliales radiaires durant le développement. En effet, dans les souris *knock-out* (KO) conditionnelles pour MIB1 les cellules gliales radiaires se différencient prématurément en progéniteurs intermédiaires et neurones (Yoon et al., 2008). La protéine murine MIB1 est fortement exprimée dans les neurones et dans les progéniteurs intermédiaires mais absente dans les cellules gliales radiaires (Yoon et al., 2008). Dans les souris *knock-*

out (KO) conditionnelles pour MIB1, il y a une forte réduction du nombre de cellules gliales radiaires, révélant que les jeunes neurones et les progéniteurs intermédiaires sont essentiels pour présenter le ligand Notch aux cellules gliales radiaires afin de maintenir la capacité proliférative des cellules gliales radiaires (Yoon et al., 2008). L'inactivation de MIB1 a montré que l'expression de nombreux gènes cibles de Notch tels que Hes5 et Hey1/2 était réduite et que cette réduction est due à une accumulation des ligands de Notch, Dll et Jagged, au niveau de la membrane indiquant que MIB1 est nécessaire à l'ubiquitination et l'internalisation de Dll1 afin de faciliter l'activation de la voie Notch (Itoh et al., 2003; Koo et al., 2005). Il est aussi intéressant de noter que MIB1 est régulée elle-même par des protéines jouant un rôle dans la balance entre division symétrique et asymétrique. En effet la kinase PAR1, qui est nécessaire pour la polarité neuronale, phosphoryle MIB1 et déclenche ainsi sa dégradation par le système ubiquitine/protéasome et réduit ainsi la voie de la signalisation Notch pour induire la neurogenèse (Ossipova et al., 2009).

A l'inverse de MIB1, la E3 ubiquitine ligase HUWE1 de la famille HECT joue un rôle dans la régulation négative de la voie Notch en impliquant le facteur de transcription N-Myc, un proto-oncogène qui est exprimé dans le cerveau en développement. La perte de fonction de N-Myc entraine la réduction de l'expression de la cycline D2 et une réduction de la taille du cerveau due à une altération de la capacité proliférative des progéniteurs et à une différenciation neuronale précoce (Knoepfler et al., 2002). La protéine E3 ligase HUWE1 est capable de lier et d'ubiquitiner N-Myc afin d'entrainer sa dégradation par le protéasome (Zhao et al., 2008). Ce processus est nécessaire pour la sortie du cycle cellulaire et la différenciation des progéniteurs neuronaux. Par la suite, il a été montré que HUWE1 régule négativement l'expression du ligand de Notch DLL3 par l'intermédiaire de N-Myc puisque DLL3 est un gène cible du facteur de transcripition N-Myc dans le cerveau, ce qui a pour conséquence de promouvoir la différenciation neuronale (Zhao et al., 2009).

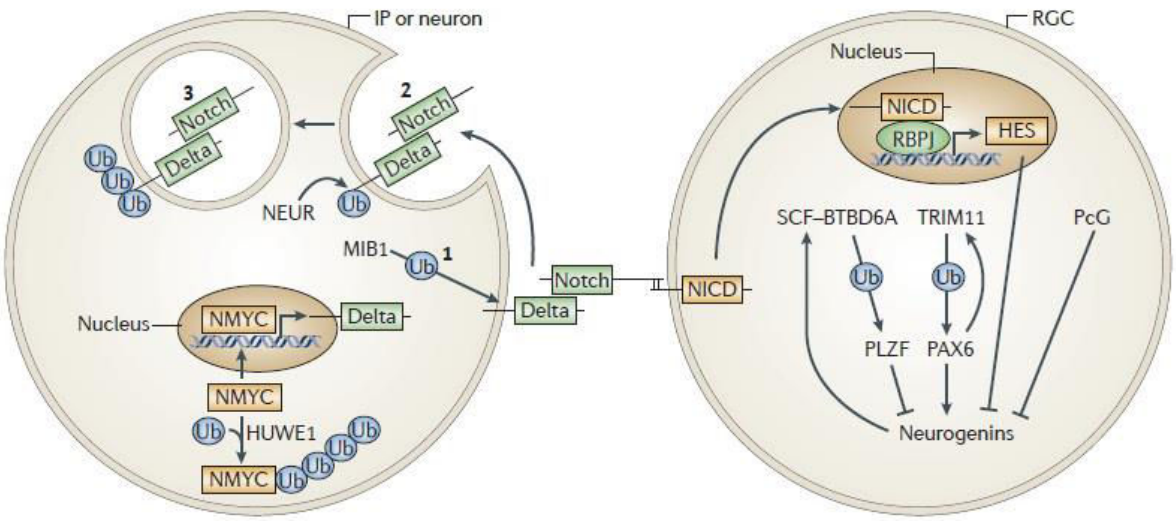


Figure 23 : Régulation de la neurogenèse par l'ubiquitination

Pour plus de détails, voir le texte principal. (D'après Kawabe & Brose 2011)

b. Cdh1/APC et la régulation du cycle cellulaire

Le complexe de promotion de l'anaphase (APC : *Anaphase promoting complexe*) est un membre majeur des E3 ubiquitine ligases et appartient à la famille des RING E3 ligases. Cdh1 est une sous-unité régulatrice clé de ce complexe et l'association de Cdh1 avec APC stimule son activité et permet la reconnaissance spécifique des substrats (Chang et al., 2015; Visintin et al., 1997).

La fonction de Cdh1/APC dans la neurogenèse du cortex cérébral a été principalement caractérisée par l'étude des souris KO conditionnelles pour Cdh1 dans les progéniteurs neuronaux (Delgado-Esteban et al., 2013; Eguren et al., 2013). L'inactivation conditionnelle dans les progéniteurs altère la neurogenèse suite à un retard dans la sortie de la mitose et une accélération de l'entrée en phase S, ce qui entraine un stress au niveau de la réplication de l'ADN et l'induction via p53 de la mort cellulaire par apoptose (Delgado-Esteban et al., 2013). L'ensemble de ces altérations mène donc à une réduction du nombre de neurones corticaux et par conséquent une réduction de la taille du cerveau. L'entrée prématurée en phase S induisant la mort cellulaire est décrite pour être le résultat de la diminution de l'abondance de substrats de Cdh1-APC tels que Aurora A, Aurora B et la cycline B1, ce qui réduit le temps passé par les cellules en phase G1 (Eguren et al., 2013).

c. TRIM11 et la régulation de gènes pro-neurogéniques

TRIM11 est une RING E3 ubiquitine ligase qui peut interagir avec le facteur de transcription Pax6 ce qui mène à sa dégradation par le système ubiquitine/protéasome durant le développement cortical (Tuoc and Stoykova, 2008) (Figure 23). La diminution de l'expression de TRIM11 par RNAi entraine

l'augmentation de l'expression de Pax6 et donc des altérations au niveau de la prolifération des progéniteurs et de l'apoptose. Il est également intéressant de noter que le gène de la souris codant pour *Trim11* contient des sites de liaisons pour Pax6 et que la transcription de TRIM11 est augmentée par la surexpression de Pax6 dans des cellules en culture (Tuoc and Stoykova, 2008). Ce résultat indique donc qu'il existe une boucle d'autorégulation entre Pax6 et Trim11 qui équilibre l'expression des deux protéines. TRIM11 est donc un régulateur clé de la neurogenèse via son effet positif indirect sur la signalisation Notch, puisque un niveau d'expression réduit de Pax6 va mener à une réduction de l'expression de la Neurogénine-2, qui est également régulée négativement par Notch afin d'inhiber la neurogenèse.

1.4 Génération de la diversité neuronale

Le processus impliqué dans la différenciation et la spécification des différents sous-types de neurones durant le développement du cortex est l'objet de nombreuses études depuis longtemps. Sachant que chaque couche du cortex en développement est occupée par des neurones qui sont nés plus ou moins au même moment, l'hypothèse d'une régulation temporelle des progéniteurs selon laquelle les sous-types de neurones sont spécifiés en fonction de leur date de naissance a été largement acceptée. Cette hypothèse est renforcée par le fait que des transplantations de cellules dans le cerveau du furet ont suggéré que le destin des neurones pour les couches profondes ou superficielles est déterminé en partie au niveau des progéniteurs (McConnell and Kaznowski, 1991). De plus, des modèles de culture cellulaire ont permis de tester les capacités de différenciation des progéniteurs corticaux *in vitro* et ont aussi fourni des informations concernant la mise en place du sous-type neuronal. *In vitro*, les cellules corticales suivent la même tendance observée *in vivo*, les neurones destinés aux couches profondes sont générés après moins de divisions que les neurones destinés aux couches superficielles et les progéniteurs isolés à partir d'étapes plus tardives du développement possèdent une habilité réduite pour produire des sous-types de neurones générés précocement durant le développement (Shen et al., 2006). De plus, des travaux réalisés dans des cellules souches embryonnaires et des progéniteurs corticaux dérivés de cellules souches pluripotentes induites récapitulent la génération séquentielle des principaux sous-types de chaque couche (Eiraku et al., 2008; Gaspard et al., 2008; Shi et al., 2012). Ces études ont montré que l'ordre de génération temporelle des différents sous-types de neurones de projection est contrôlé par des signaux temporels fournit au sein des cellules.

Durant la formation du cortex en six couches (couches I à VI), les neurones pyramidaux sont produits selon un ordre *inside-out* hautement régulé, c'est à dire que les neurones pyramidaux destinés aux couches profondes sont produit avant les neurones destinés aux couches superficielles.

De nombreuses études indiquent qu'il existe un programme transcriptionnel qui contribue à l'hétérogénéité des cellules gliales radiaires afin d'influencer la destinée de leurs descendances. Par exemple, les facteurs de transcription Neurogenines 1 et 2 contrôlent la spécification des cellules gliales radiaires en neurones des couches profondes durant la neurogenèse précoce alors que les facteurs de transcription Pax6 et Tlx sont nécessaires pour la spécification en neurones des couches superficielles (Schuurmans et al., 2004). Le facteur de transcription Fezf2 est requis au niveau des cellules gliales radiaires pour se spécifier en neurones cortico-fugaux à projection sous-corticales qui vont peupler les couches V et VI (Chen et al., 2008a; Molyneaux et al., 2005).

En 2012, Franco *et coll* ont mis en évidence une sous-population de cellules gliales radiaires exprimant Cux2. Cette sous-population serait spécifiée pour générer uniquement des neurones des couches superficielles de manière indépendante de l'environnement et de leur date de naissance. Ces données indiquaient donc que la spécification du destin moléculaire assure la date de naissance appropriée plutôt que l'inverse (Franco et al., 2012) (Figure 24). Une étude plus récente de la même équipe confirme ces résultats en montrant que la grande majorité des neurones issus des cellules gliales radiaires exprimant Cux2 expriment le facteur de transcription des couches superficielles Satb2+ (Gil-Sanz et al., 2015). Cependant, ces données sont sujettes à controverse puisque une autre équipe a publié en 2013 et en 2015 deux études montrant que les cellules gliales radiaires exprimant Cux2 sont capables de générer des neurones des couches profondes et superficielles ainsi que des cellules de la glie (Eckler et al., 2015; Guo et al., 2013). Ils montrent également qu'il existe une population de cellules gliales radiaires qui expriment Fezf2 durant l'ensemble de la neurogenèse et qui est capable de produire l'ensemble des neurones pyramidaux et des cellules de la glie, remettant ainsi en cause l'existence, et l'identité moléculaire, des cellules gliales radiaires dont le destin est limité à une couche en particulier (Eckler et al., 2015; Guo et al., 2013).

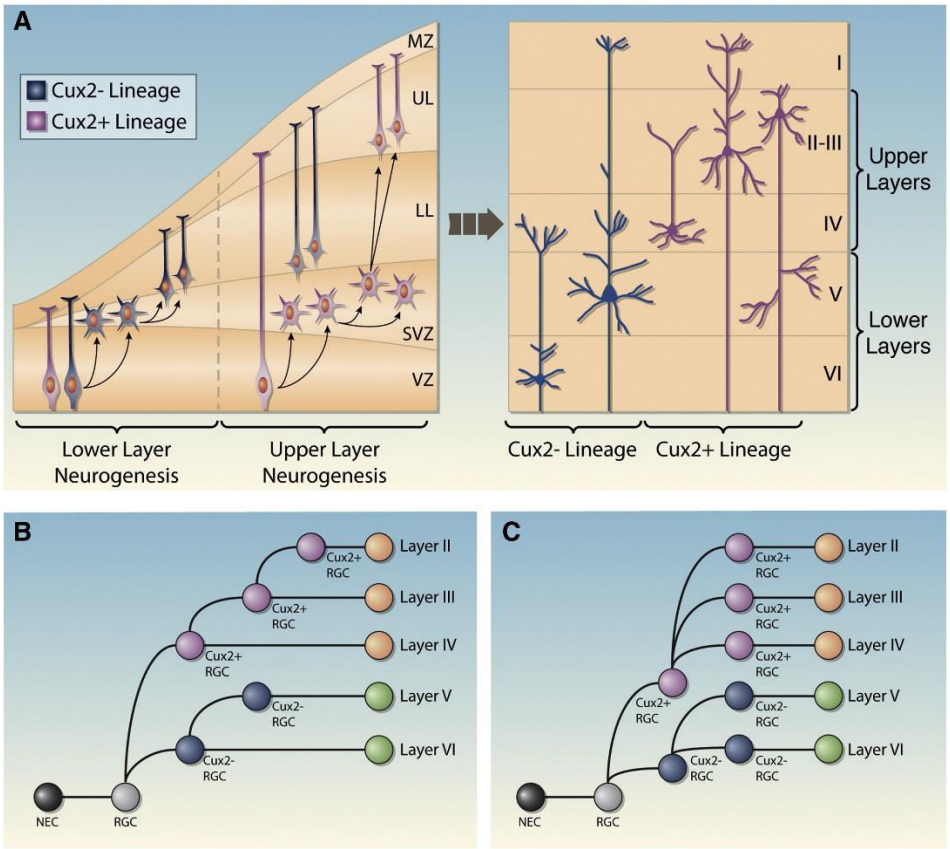


Figure 24 : Modèle de la génération des neurones pyramidaux destinés aux couches superficielles et profondes par les différents lignages de cellules gliales radiaires.

(A) Les neurones pyramidaux des couches profondes V-VI (lower layers, LL) sont produits à partir des lignées de cellules gliales radiaires (RGC) n'exprimant pas Cux2 (Cux2- *lineage*) qui sont neurogéniques durant le développement précoce. Les neurones pyramidaux destinés aux couches superficielles IV-II (Upper Layers, UL) sont générés par les cellules gliales radiaires Cux2+ qui sont présentes en même temps que les Cux2- durant le développement précoce mais ne subissent que des divisions proliératives et ne deviennent neurogéniques que durant le développement tardif.
(B et C) Modèles de lignage des différents sous-types de neurones pyramidaux avec dans les deux modèles les cellules gliales radiaires se spécifient en cellules Cux2+ ou Cux2-. (B) Les cellules Cux2+ et Cux2- sont ensuite progressivement limitées dans le temps pour générer séquentiellement les différents sous-types de neurones en fonction de leur date de production (B) ou bien les cellules Cux2+ et Cux2- entreprennent des spécifications supplémentaires pour générer des lignages spécifiques de progéniteurs pour la production de chaque sous-types de neurones pyramidaux (C). (D'après Franco & Müller 2013)

D'autre part, les progéniteurs intermédiaires basaux ont été proposés pour générer des sous-types de neurones corticaux spécifiques de par leurs propriétés distinctes des cellules gliales radiaires et en particulier un profil moléculaire unique tel que l'expression spécifique du facteur de transcription Tbr2 (Englund, 2005). A l'origine, il était proposé que ces cellules produisaient principalement des neurones des couches superficielles mais des études plus récentes indiquent que les progéniteurs intermédiaires peuvent produire des neurones de l'ensemble des couches (Kowalczyk et al., 2009; Mihalas et al., 2016; Tarabykin et al., 2001; Vasistha et al., 2015). En particulier, Mihalas et *coll* ont montré dans une étude récente que les progéniteurs intermédiaires étaient capables de produire l'ensemble des neurones pyramidaux et qu'une sous-population de progéniteurs intermédiaires précoces peut générer des neurones qui seront destinés à des couches superficielles par la suite (Mihalas et al., 2016) (Figure 25).

Deux possibilités peuvent expliquer ce résultat, soit le destin pour les couches superficielles est déjà spécifié au niveau d'une sous-population de cellules gliales radiaires précoces (comme la sous-population Cux2+ décrite par Franco *et coll,* 2012) puis ce destin est hérité par certains progéniteurs intermédiaires précoces, soit si les progéniteurs intermédiaires sont considérés comme étant capables de produire l'ensemble des identités neuronales alors le destin neuronal serait déterminé par le timing des mitoses. De manière intéressante, cette étude montre également que Tbr2 est principalement nécessaire pour la différenciation des progéniteurs intermédiaires en neurones ainsi que la détermination de leur identité mais pas à leur formation, ce qui est en contradiction avec une étude précédente (Sessa et al., 2010).

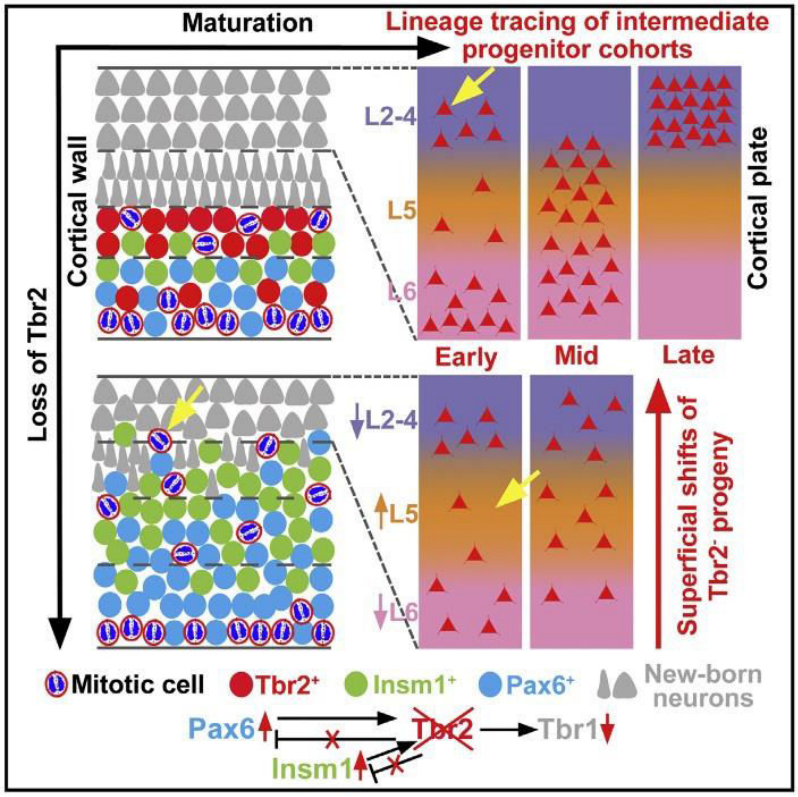


Figure 25 : Les progéniteurs intermédiaires précoces peuvent produire des neurones des couches superficielles et profondes.

L'utilisation d'un modèle de souris permettant le traçage des progéniteurs intermédiaires Tbr2+ a permis de montrer que les progéniteurs intermédiaires destinés à produire des neurones des couches superficielles apparaissent durant le développement précoce (environ E11.5) et qu'à mesure que la neurogenèse progresse, la destinée des neurones produits par les progéniteurs intermédiaires est progressivement limitée aux couches superficielles (partie supérieure). Suite à l'inactivation de Tbr2, un nombre réduit de neurones est produit suite à un défaut de transition des progéniteurs intermédiaires en neurones (milieu). Ce défaut, dans des stades précoces, a pour conséquence la production prématurée de neurones destinés à des couches superficielles durant le développement et conduit finalement à des altérations dans l'organisation laminaire du cortex. Dans la partie inférieure de la figure, un schéma récapitulant les dérégulations des interactions de Tbr2 avec différents facteurs de transcription est représenté. (D'après Mihalas et al. 2016)

Il est également intéressant de noter que la voie de signalisation Shh a également été impliquée dans les mécanismes de spécification des progéniteurs corticaux. En effet, les auteurs ont montré que la délétion de la protéine Sufu (un antagoniste de la voie Shh qui régule la transition du facteur de transcription Gli vers son répresseur) dans les progéniteurs au stade précoce E10.5 entraine un défaut de la spécification en sous-types de neurones pyramidaux qui sont produits au stade précoce mais également au stade tardif de la neurogenèse alors que la délétion de Sufu à E13.5 n'entraine aucun défaut (Yabut et al., 2015) (Figure 26). Cette étude est donc particulièrement intéressante car elle met l'accent sur les événements régulateurs fondamentaux intervenant à des stades précoces de la neurogenèse pour maintenir le programme de spécification pour l'ensemble des sous-types de neurones y compris les sous-types de neurones produits à des stades plus tardifs du développement cortical.

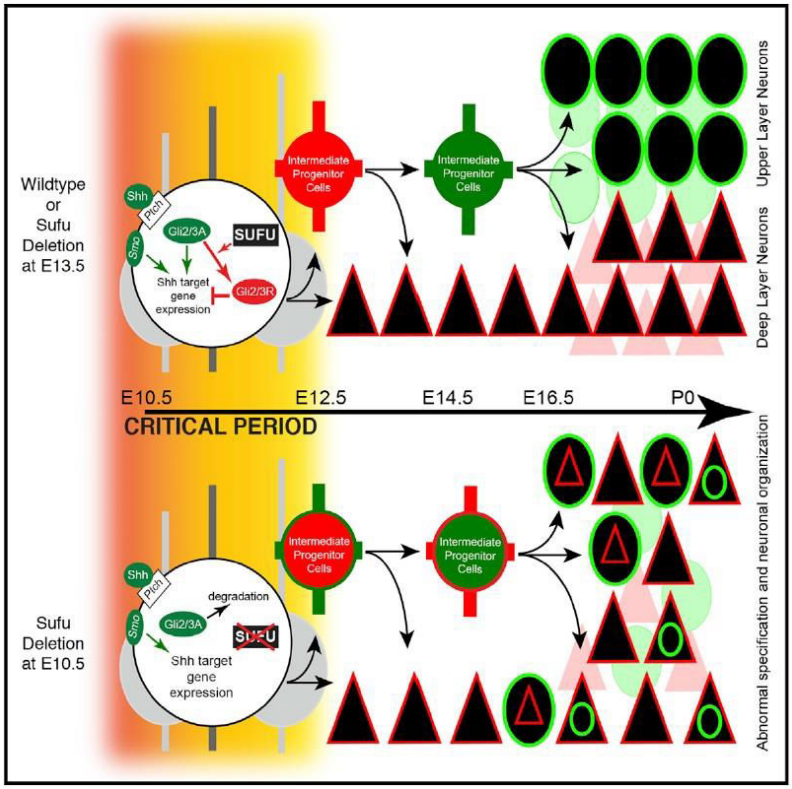


Figure 26 : Modèle du rôle critique joué par Sufu dans la spécification des neurones pyramidaux.

La délétion de Sufu dans les progéniteurs neuronaux à E10.5 entraine une dérégulation des activités des protéines Gli2 et Gli3 et ainsi une augmentation de la signalisation Shh (partie basse). Cette activation ectopique de la signalisation Shh mène à une spécification inappropriée des progéniteurs, une réduction du nombre de progéniteurs intermédiaires et finalement des défauts d'organisation des neurones dans le cortex. De manière surprenante, ces défauts ne sont pas détectés lorsque la délétion de Sufu est réalisée à un stade plus tardif correspondant à une période de production de neurones destinés aux couches supérieures (partie haute). Ces observations semblent donc indiquer que des évènements de régulation surviennent durant des stades précoces du développement cortical assurant le maintien de l'identité des progéniteurs afin de générer des lignages de neurones pyramidaux distincts, incluant la spécification des neurones pyramidaux produits à des stades tardifs du développement cortical. (D'après Yabut et al. 2015)

Des études montrent également qu'outre des mécanismes intrinsèques aux cellules, la régulation de la spécification du sous-type neuronal peut se faire par l'intermédiaire de signaux environnementaux. En particulier, une étude récente a montré que la diminution de l'expression de la Protocadhérine 20 (de la famille des cadhérines permettant l'adhésion cellule-cellule dépendante du calcium), qui est exprimée dans les neurones de la couche IV, induit la localisation de ces cellules dans les couches II-III (Oishi et al., 2016) (Figure 27). De plus, ces neurones mal positionnés acquièrent les caractéristiques des neurones des couches II-III et perdent celles de la couche IV. Ces résultats indiqueraient donc que l'identité des neurones n'est pas déterminée uniquement au niveau des progéniteurs et à leur date de naissance mais également par leur environnement après leur positionnement dans la plaque corticale.

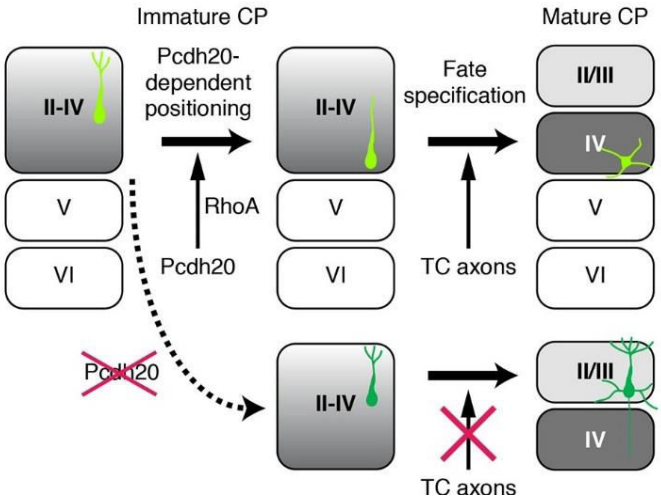


Figure 27 : Modèle de l'acquisition de l'identité neuronale de la couche IV via le positionnement correct dans le cortex.

Dans ce modèle les neurones destinés aux couches superficielles (II-IV) n'acquièrent pas leur identité finale avant de venir résider juste en dessous de la zone marginale (gauche). Après la fin du processus de migration radiaire, le futur neurone de la couche IV vient se positionner dans la partie basse des couches II-IV de manière dépendante de Pcdh20 et RhoA (milieu haut). Ce positionnement permettrait la spécification en neurone de couche IV via l'établissement de contacts avec les axones cortico-thalamiques (TC *axons*). En l'absence de Pcdh20, les neurones résident dans la partie haute des couches II-IV et ne sont donc pas capables de recevoir les signaux provenant des axones cortico-thalamiques. Ce modèle suggère que l'identité de neurones de couche IV n'est pas complètement déterminée au moment de leur production mais est assurée par des signaux environnementaux induits par leur positionnement correct. (D'après Oishi et al. 2016)

2. La migration neuronale radiaire

2.1 Généralités

Les neurones pyramidaux nouvellement générés au niveau des zones germinales (zone ventriculaire et sous-ventriculaire) atteignent leur destination finale au sein du cortex en développement via le processus de migration radiaire (Ayala et al., 2007b). Les neurones qui arrivent en premier forment une préplaque transitoire et sont suivis par d'autres neurones qui vont former la plaque corticale. Les neurones formant la plaque corticale séparent la préplaque en une zone marginale superficielle et en une sous-plaque qui est située en-dessous de la couche VI nouvellement formée. Des vagues successives de neurones en migration vont occuper progressivement les couches corticales les plus superficielles selon une organisation dénommée « *inside-out* », ce qui signifie que les neurones appartenant aux couches les plus profondes sont générés et arrivent à destination en premier puis sont suivis par les neurones qui vont résider dans les couches superficielles (Figure 28).

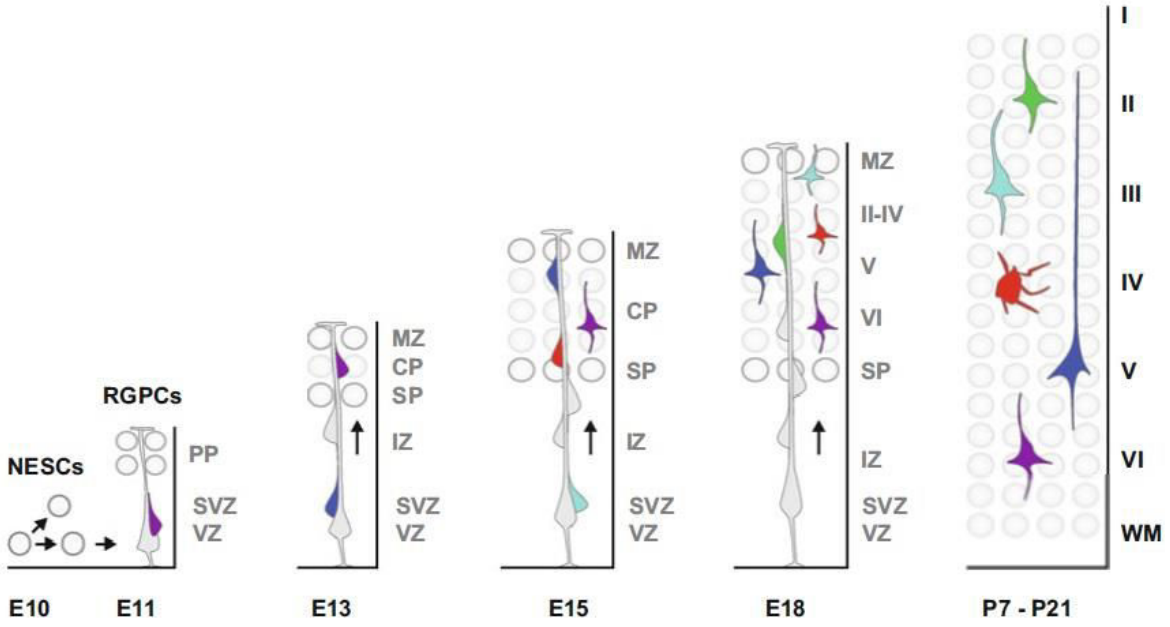


Figure 28 : Mise en place de la plaque corticale selon une organisation *inside-out.*

Les premières divisions asymétriques des cellules souches neuroépithéliales (NESC) produisent les cellules qui vont occuper la préplaque. Les cellules gliales radiaires (RGPC) vont ensuite produire les neurones les plus précoces (violet) qui vont former la plaque corticale (CP) en séparant la préplaque (PP) en une zone marginale (MZ) et une sous-plaque (SP) et correspondront au stade postnatal aux neurones de la couche profonde VI. Les neurones de la vague suivante (bleu foncé) migrent à travers la zone intermédiaire (IZ) et les neurones produits précédemment avant d'atteindre leur position dans la plaque corticale (formant la future couche V). Le même processus a lieu pour les vagues suivantes de neurones pour former les couches de neurones IV (rouge), III (bleu ciel) et II (vert). (D'après Hippenmeyer 2014)

Aux stades précoces de la corticogenèse, la distance de migration des neurones est courte mais à mesure que le développement progresse, les neurones nouvellement générés doivent migrer sur des distances de plus en plus longues, de ce fait deux modes de migration radiaire sont distingués selon le stade de développement : la translocation somatique et la locomotion (Ayala et al., 2007b) (Figure 29). Les neurones produits les plus précocement formant la préplaque utilisent la translocation somatique tandis que la majorité des neurones formant la plaque corticale migrent selon un processus de locomotion. Les neurones employant la translocation somatique possèdent un long processus antérieur qui s'attache au niveau de la surface piale et ce processus antérieur devient progressivement de plus en plus court à mesure que le corps cellulaire est tiré vers la membrane piale (Miyata et al., 2001; Nadarajah et al., 2001). Ces neurones se déplacent de manière continue sans aucune pause significative (Nadarajah et al., 2001). Il est important de noter que ce mode de migration ne dépend pas d'un support de migration mais seulement de l'attachement du processus antérieur à la membrane piale. A l'inverse, les neurones produits plus tardivement et formant la plaque corticale se déplacent par un processus de locomotion le long des fibres des cellules gliales radiaires.

Les paragraphes suivants focalisent sur le mode de migration neuronale principal, s'effectuant par locomotion, en détaillant les processus cellulaires impliqués et les mécanismes moléculaires sous-tendant ces processus.

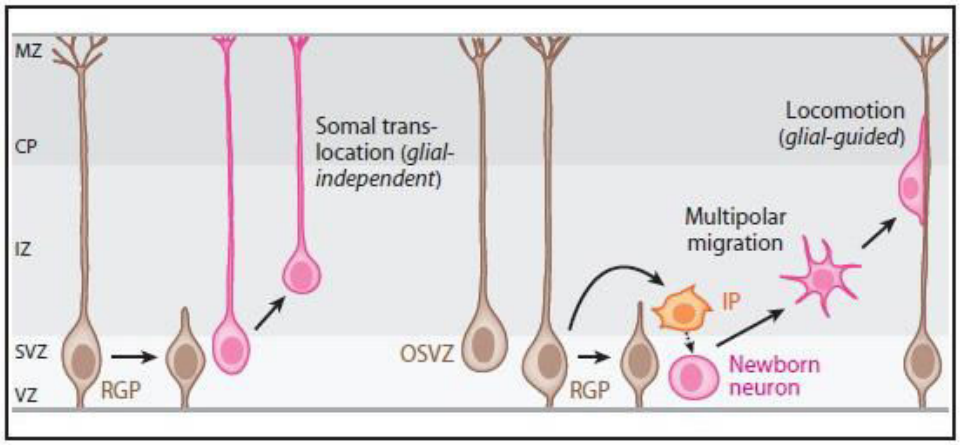


Figure 29 : Les différents modes de migration des neurones pyramidaux dans le cortex cérébral en développement.

Voir texte principal. (D'après Evsyukova et al. 2013)

2.2 Les étapes séquentielles de la migration neuronale

Durant les stades du développement correspondant à la formation de la plaque corticale, les neurones générés dans la zone germinale ventriculaire subissent une série d'étapes de migration séquentielles afin d'atteindre leur destination finale dans la plaque corticale (Figure 30).

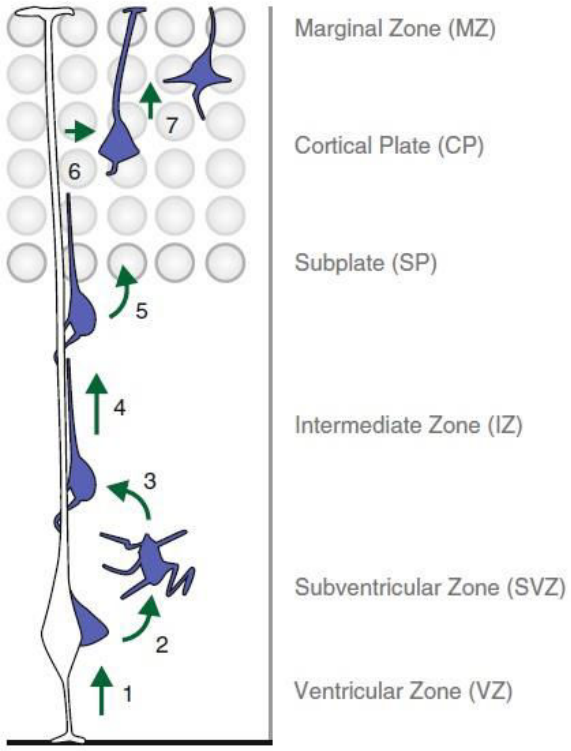


Figure 30 : Etapes séquentielles de la migration neuronale radiaire.

Voir texte le principal. (D'après Hippenmeyer 2014)

Premièrement, les cellules destinées à être des neurones se détachent du neuroépithélium de la surface du ventricule (1) et se déplacent de manière radiaire vers la zone sous-ventriculaire (1) (Itoh et al., 2013). Au sein de la zone sous-ventriculaire, les neurones restent stationnaires durant environ 24h et la plupart adoptent une morphologie multipolaire avec une phase dynamique d'extension et de rétractation des prolongements dans toutes les directions (2) (Noctor et al., 2004; Tabata and Nakajima, 2003). Durant cette phase, les déplacements des neurones multipolaires ne semblent pas nécessiter les fibres des cellules gliales radiaires et se déplacent lentement avec, pour certains de ces neurones, un mouvement de retour vers la zone ventriculaire avant finalement d'adopter leur morphologie bipolaire nécessaire à la migration par locomotion le long des fibres de la glie radiaire vers la membrane piale (3). Les neurones migrent ensuite par locomotion à travers la zone intermédiaire (4), atteignent la sous-plaque, entrent au niveau de la couche de la plaque corticale cible et continuent de se déplacer vers la zone marginale (5). Une fois arrivés au niveau de la partie la plus supérieure de la plaque corticale, juste en dessous de la zone marginale, les neurones se détachent des fibres de la glie radiaire tandis que l'extrémité du processus antérieur reste attachée à la zone marginale (6), ce qui permet aux neurones d'effectuer une translocation terminale somatique pour conclure le processus de migration radiaire et l'installation au niveau de la position appropriée (7). Cette étape de translocation somatique terminale est critique lors de la migration radiaire afin de permettre aux neurones de passer au-delà des neurones précédents et de mettre en place une plaque

corticale avec une organisation *inside-out*. Des études récentes ont montré que la partie la plus supérieure de la plaque corticale possède des caractéristiques histologiques différentes des parties plus inférieures et cette zone a été nommée la zone corticale primitive (PCZ : *primitive cortical zone*) (Sekine et al., 2011). Cette étude montre également que les neurones migrant par locomotion s'arrêtent de manière transitoire juste en dessous de cette zone avant de subir la translocation somatique terminale et atteindre cette zone.

2.3 Les processus cellulaires impliqués dans la locomotion

Bien que les neurones migrent dans le cortex selon des modes et des voies différentes, il existe un modèle de base général du mouvement neuronal nécessitant une régulation très fine de trois étapes successives et répétées (Figure 31). Premièrement, la cellule procède à une extension de son processus antérieur, lequel inclut à son extrémité le cône de croissance qui subit de rapides extensions et rétractations à mesure qu'il explore l'environnement et qu'il reçoit des signaux extracellulaires, ce qui lui permet d'orienter la migration (a). Ensuite cette extension est suivie du mouvement du centrosome vers l'avant du processus antérieur (b). Enfin, le corps cellulaire comprenant le noyau se déplace vers l'avant, ce processus est appelé nucléokinèse, et le processus postérieur se rétracte généralement en même temps (c) (Schaar and McConnell, 2005; Tsai and Gleeson, 2005).

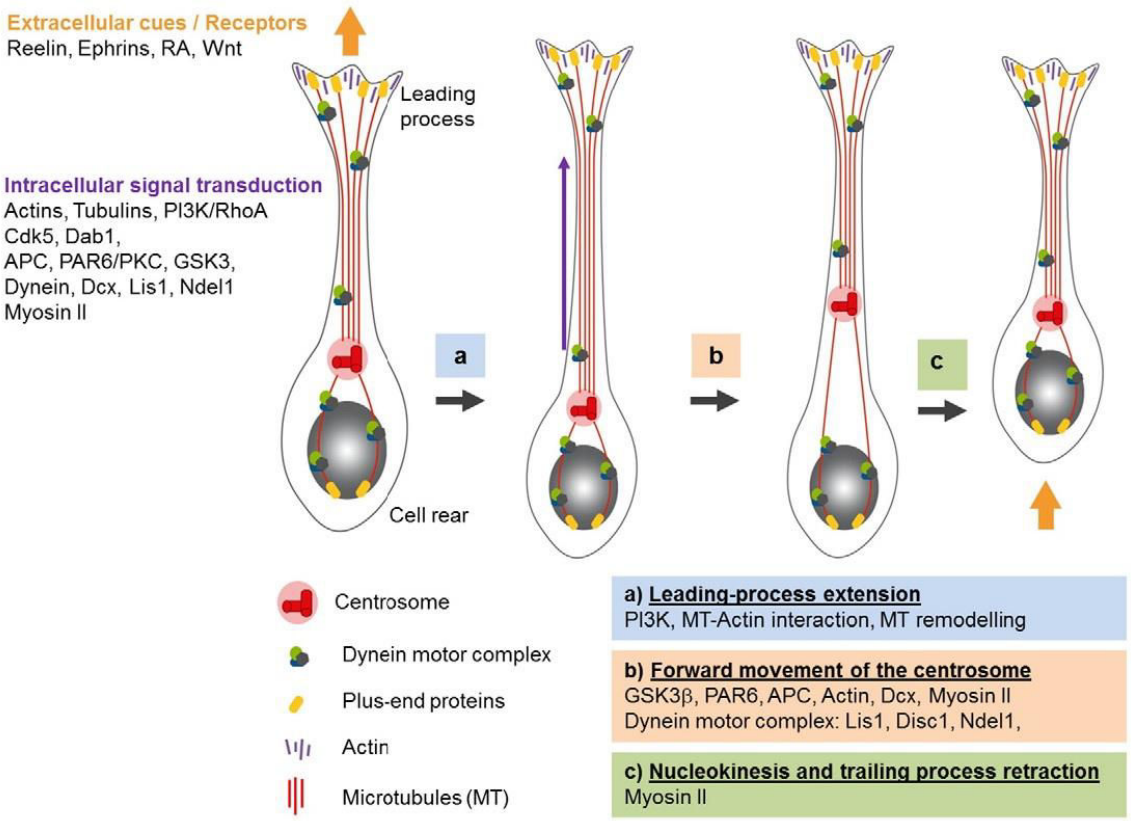


Figure 31 : Les étapes cellulaires principales de la locomotion neuronale et des exemples de molécules impliquées dans chaque étape.

Pour plus de détails, voir texte principal. (D'après Jiang & Nardelli 2015)

2.4 Mécanismes moléculaires de régulation de la migration neuronale

La régulation de l'orientation de la migration neuronale se fait par l'intermédiaire d'un réseau coordonné de voies de signalisation provenant de différentes régions des neurones, comme le corps cellulaire, le cône de croissance et le cil primaire, afin de contrôler le réarrangement du cytosquelette d'actine et des microtubules. Nous allons donc dans la section suivante nous intéresser premièrement aux composants du cytosquelette permettant la mobilité cellulaire puis aux mécanismes de signalisation permettant la régulation du comportement du cytosquelette.

2.4.1 Le réseau de microtubules et ses protéines associées

Les microtubules permettent d'assurer la dynamique des prolongements des neurones et jouent un rôle crucial dans le couplage entre le noyau et le centrosome durant la nucléokinèse. Il apparait donc qu'une fine régulation de la dynamique des microtubules est nécessaire pour la migration neuronale.

a. Le complexe Lis1/Ndel1/Dynéine

La protéine *Platelet Activating Factor Acetylhydrolase, non-catalytic isoform b1* (PAFAH1B1) est également nommée *Lissencephaly-1* (LIS1) du fait de son implication dans un spectre de maladies neurodéveloppementales humaines caractérisées par des anomalies sévères du cortex et de la migration neuronale (Hattori et al., 1994; Reiner et al., 1993). LIS1 est une protéine associée au centrosome et aux microtubules et permet de maintenir la stabilité des microtubules par réduction de la fréquence des évènements de catastrophes (phase de dépolymérisation des microtubules) (Sapir et al., 1997). LIS1 est un membre de la famille hautement conservée des gènes impliqués dans la régulation de la migration nucléaire chez *Aspergillus nidulans*, ce processus rappelant la nucléokinèse dans les neurones en migration (Morris, 2000). Chez les eucaryotes supérieurs, LIS1 interagit avec la dynéine cytoplasmique qui est impliquée dans le transport subcellulaire et le mouvement cellulaire (Kardon and Vale, 2009). LIS1 interagit également avec NDEL1 (un autre membre de la famille des gènes de régulation de la migration nucléaire chez *Aspergillus nidulans*) et forment un complexe avec la dynéine cytoplasmique et son adaptateur, la dynactine, afin de réguler l'activité de la dynéine via la modulation de son activité ATPase (McKenney et al., 2010; Mesngon et al., 2006; Toropova et al., 2014; Yamada et al., 2008). En particulier, NDEL1 facilite l'interaction entre LIS1 et la dynéine et permet le ciblage de la dynéine, via LIS1, au niveau de l'extrémité (+) des microtubules (Li et al., 2005). De plus, Ndel1 joue un rôle dans le positionnement de LIS1 et de la dynéine au niveau du centrosome favorisant ainsi la nucléation et l'accrochage des microtubules au centrosome (Guo et al., 2006). Le rôle du complexe LIS1/NDEL1/dynéine durant le développement cortical a été examiné principalement par des expériences d'électroporation *in utero* d'ARN interférence et des analyses de souris KO (Sasaki et al., 2005; Shu et al., 2004; Tsai et al., 2007). Ces études proposent un modèle dans lequel ce complexe régule la migration neuronale par maintien de l'intégrité du réseau de microtubules à l'origine du couplage entre le centrosome et le noyau durant la nucléokinèse (Figure 32, A). Un modèle plus récent propose que les protéines de la membrane nucléaire Syne-1/2-SUN1/2 auraient une fonction critique dans la nucléokinèse par pontage du noyau aux microtubules via LIS1 et la dynéine cytoplasmique, cette dernière assurant le déplacement du noyau vers le centrosome (Zhang et al., 2009) (Figure 32, B).

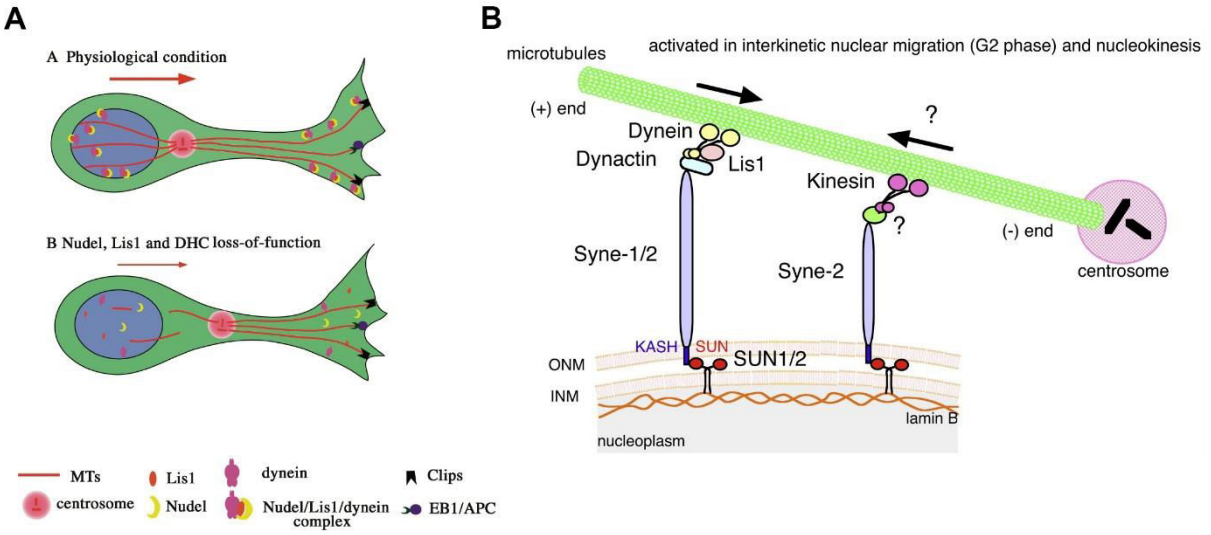


Figure 32 : Modèles de la régulation de la migration neuronale par le complexe Lis1/Ndel1/dynéine.

(A) Dans les conditions physiologiques, NDEL1 (Nudel, jaune) favorise l'interaction entre LIS1 et la dynéine pour la formation du complexe LIS1/NDEL1/dynéine. Ce complexe maintient l'intégrité du réseau de microtubules lors du couplage entre le noyau et le centrosome qui est nécessaire pour assurer la nucléokinèse lors de la migration neuronale. La perte de fonction de NDEL1, LIS1 ou la dynéine entraine le désassemblage du complexe LIS1/NDEL1/dynéine. Le réseau de microtubule à l'origine du couplage entre le noyau et le centrosome est perturbé, ce qui entraine un défaut de la migration neuronale par altération du processus de nucléokinèse. (D'après Shu et al. 2004)
(B) Modèle des complexes protéiques mis en jeu au niveau de la membrane nucléaire permettant le couplage entre le centrosome et le noyau. Les protéines de la membrane nucléaire SUN1/2 et Syne-1/2 interagissent via leurs domaines KASH et SUN pour former un pont entre le noyau et le réseau de microtubules. Durant la nucléokinèse, le complexe LIS1/dynéine/dynactine entre en contact avec Syne-1/2 et la force motrice générée par la dynéine vers l'extrémité (-) des microtubules permet le mouvement du noyau vers le centrosome. ONM : outer nuclear membrane ; INM : inner nuclear membrane. (D'après (Zhang et al., 2009)

D'autre part, une étude de Hippenmeyer et *coll* attire l'attention sur les fonctions cellule autonome et non-autonome des gènes dans la régulation des étapes de la migration neuronale (Hippenmeyer et al., 2010a). Afin d'étudier les fonctions cellule autonome des gènes *Lis1* et *Ndel1 in vivo,* les auteurs utilisent la stratégie MADM (*mosaic analysis with double markers*) chez la souris afin d'obtenir un KO de ces gènes uniquement dans des neurones isolés (Zong et al., 2005). Dans cette stratégie, les cellules mutantes homozygotes expriment un marqueur fluorescent (par exemple la GFP), les cellules sauvages expriment un autre marqueur (RFP) et les hétérozygotes expriment les deux marqueurs (jaune) dans un fond génétique de cellules non marquées. Le résultat le plus surprenant de cette étude correspond à la différence de phénotype de migration neuronale observée entre le modèle MADM et les études précédentes utilisant d'autres techniques de suppression de l'expression de *Ndel1*. En effet, concernant Ndel1, les études précédentes de RNA interférence et des modèles souris KO conditionnelles montrent une très forte accumulation des neurones en migration dans les zones très profondes, entre les zones sous-ventriculaire et intermédiaire basse. Dans le modèle MADM, les neurones KO pour *Ndel1* (dans lequel le fond génétique de la souris est hétérozygote pour *Ndel1*) sont

capables de migrer à travers les zones sous-ventriculaire et intermédiaire mais le phénotype se restreint à une incapacité d'entrer dans la plaque corticale (Shu et al. 2004; Youn et al. 2009; Hippenmeyer et al. 2010) (Figure 33). Cette donnée semble donc indiquer que NDEL1 pourrait avoir une fonction cellule non-autonome pour permettre la migration à travers la zone intermédiaire. Même si plusieurs mécanismes pourraient être envisageables pour expliquer cet effet, cette analyse mosaïque semble principalement révéler une importante contribution de l'interaction entre les neurones afin d'assurer la migration.

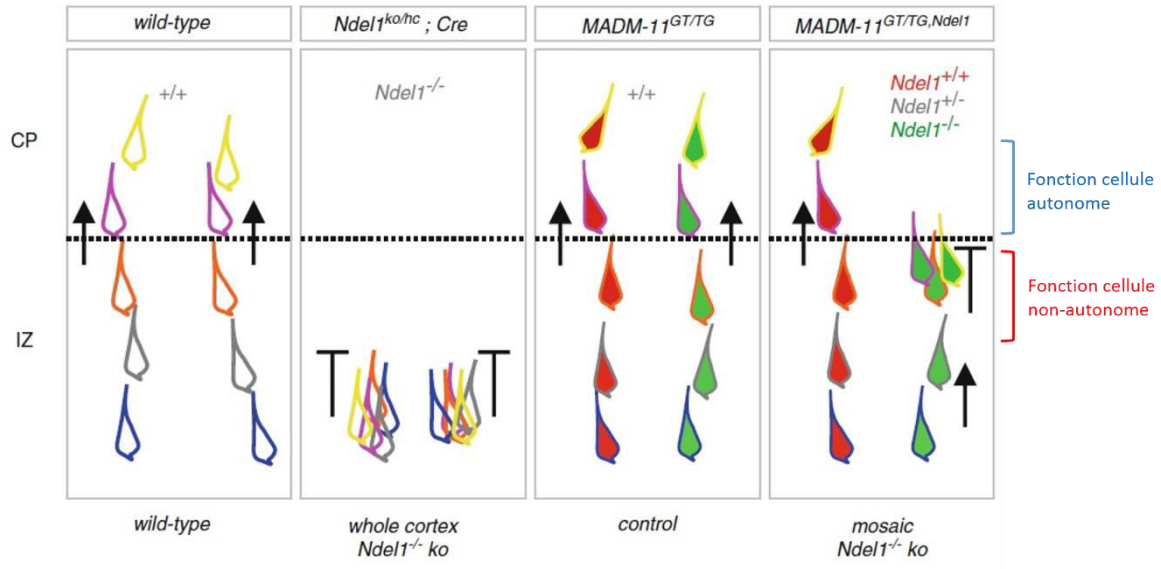


Figure 33 : Fonctions cellule autonome et non-autonome de NDEL1 dans la migration neuronale.

Schéma récapitulatif des différents phénotypes de migration dans la zone intermédiaire (IZ) et la plaque corticale (CP) chez des souris sauvages (wild-type), KO conditionnelles Ndel1 (Ndel1 ko/hc ; Cre), MADM contrôle avec toutes les cellules sauvages pour Ndel1 (MADM-11 GT/TG) et KO mosaïques pour Ndel1 dans un fond génétique hétérozygote pour Ndel1 (MADM-11GT/TG, *Ndel1*). Les contours des neurones de couleurs différentes indiquent les différents sous-types de neurones migrant de manière séquentielle tandis que les corps cellulaires rouges et verts correspondent respectivement aux cellules Ndel1 sauvages et Ndel1 KO. Pour plus de détails voir texte principal. (Adaptée d'après Hippenmeyer 2014)

De manière cohérente avec ces données impliquant le complexe LIS1-NDEL1-Dynéine dans la migration neuronale, nous avons reporté l'identification de plusieurs mutations dans le gène *DYNC1H1* (*cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1*), codant pour la dynéine cytosplasmique, chez des patients présentant un large spectre de malformations du développement cortical (Voir partie Résultats, Poirier et al. 2013). Bien que la dynéine possède une multitude de fonctions cellulaires, les malformations du développement cortical observées sont probablement le résultat d'un défaut de la translocation nucléaire dans les neurones en migration, comme observé après inhibition de l'expression de la dynéine par électroporation *in utero* (Tsai et al., 2007).

b. Doublecortine

Le gène *DCX* (codant pour la Doublecortine) a été initialement identifié comme étant responsable de lissencéphalies liées à l'X chez les hommes et d'hétérotopies sous-corticales (ou *doublecortex*) chez les femmes (Gleeson et al., 1998; Des Portes et al., 1998). DCX est une protéine associée aux microtubules qui est exprimée dans les neurones en migration et les neurones différenciés et entre en jeu dans la stabilisation des microtubules (Francis et al., 1999; Gleeson et al., 1999). Des travaux dans des neurones en culture ont montré que DCX joue un rôle essentiel dans la mise en place des branchements collatéraux, l'arborisation dendritique et l'élongation de l'axone (Deuel et al., 2006; Tint et al., 2009). Ces fonctions sont cohérentes avec la capacité de DCX à se lier aux microtubules au niveau du processus antérieur des neurones en migration, dans les neurites immatures en extension et dans le cône de croissance (Francis et al., 1999; Gleeson et al., 1999; Tint et al., 2009). Le mécanisme moléculaire de la régulation de la dynamique des microtubules par DCX est peu connu et des études cellulaires et *in vitro* semblent contradictoires. En effet, *in vitro*, Bechstedt *et coll* ont montré que DCX reconnait avec une meilleure affinité les extrémités (+) des microtubules courbés plutôt que droits (Bechstedt et al., 2014). A l'inverse, l'étude de Jean *et coll* indique que le niveau de DCX est diminué au niveau des courbures des microtubules présents dans le cône de croissance (Jean et al., 2012). DCX est capable de se lier avec la protéine LIS1 et il est donc suggéré que ces deux protéines fonctionnent dans un même complexe, avec la dynéine, afin de réguler le couplage entre le noyau et le centrosome durant la migration neuronale (Caspi et al., 2000; Tanaka et al., 2004a). Ces études sont cohérentes avec le fait que la diminution de l'expression de DCX durant le développement cortical par électroporation *in utero* entraine un défaut de la migration neuronale qui est associé à des défauts de mouvement du noyau durant la nucléokinèse (Bai et al., 2003; Nishimura et al., 2014).

c. Les kinésines

La superfamille des kinésines contient 45 gènes (aussi connus sous le nom de *KIF*) qui se répartissent en 15 familles (Hirokawa et al., 2009). Leur fonction principale est de transporter de nombreux cargos le long des microtubules, cependant les kinésines jouent également un rôle dans la régulation de la dynamique des microtubules et dans la génération de forces nécessaires à la ségrégation des chromosomes durant la mitose (Hirokawa et al., 2009; Moore and Wordeman, 2004). Plusieurs exemples de kinésines régulant la migration neuronale via la régulation de processus cellulaires variés ont été identifiés.

La kinésine-5 (KIF11) est une microtubule polymérase au niveau de l'extrémité (+) et joue un rôle dans l'interaction et le glissement entre deux microtubules (Chen and Hancock, 2015). L'inhibition de la kinésine-5 dans des cultures de neurones en migration entraine une augmentation de la vitesse de migration associée à une réduction de la taille du processus antérieur tandis que la surexpression

durant le développement cortical mène à une réduction de la vitesse de migration. Les auteurs ont proposé que la kinésine-5 agisse comme un frein via l'interaction entre deux microtubules afin de moduler le mouvement du réseau de microtubules (Falnikar et al., 2011) (Figure 34).

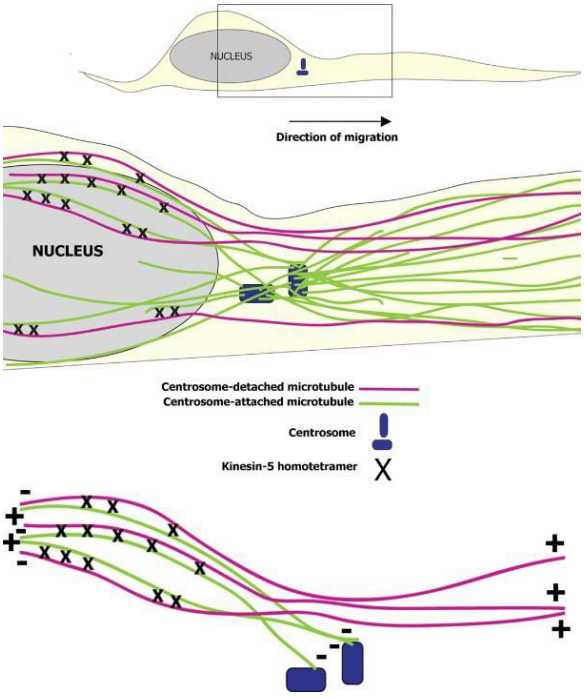


Figure 34 : Modèle de la régulation de la migration neuronale par la kinésine-5.

Dans les neurones en migration, les microtubules attachés (lignes vertes) et non attachés (lignes magenta) au centrosome s'organisent de manière antiparallèle à l'arrière du centrosome. Les homotétramères de kinésine-5 (croix noires) régulent la vitesse de la migration neuronale en générant des forces faibles opposées à la dynéine cytoplasmique au niveau des microtubules antiparallèles. (D'après Falnikar et al. 2011)

KIF1A, de la famille des kinésines-3, est une kinésine principalement connue pour son rôle dans la migration nucléaire intercinétique des progéniteurs exercé avec la dynéine cytoplasmique (Tsai et al., 2010). Cependant, une étude récente démontre que KIF1A est essentielle pour la migration neuronale et la transition multipolaire-bipolaire (Carabalona et al., 2016). En considérant le rôle connu de KIF1A dans le transport vésiculaire, les auteurs ont montré que le défaut de migration observé après inhibition de KIF1A est étroitement lié à un défaut de trafic du BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*) puisque l'administration de BDNF permet de sauver le phénotype (Carabalona et al., 2016; Okada et al., 1995).

Nous avons récemment mis en évidence l'implication de deux kinésines, KIF5C et KIF2A, dans les malformations du développement cortical complexes avec des anomalies de la gyration (polymicrogyrie et pachygyrie respectivement) suggérant un défaut de la migration neuronale (voir partie Résultat Poirier et al. 2013).

KIF5C est un membre de la famille des kinésines-1 qui ont pour fonction principale le transport de nombreux cargos de manière antérograde le long des microtubules. Nous avons montré que la mutation dans KIF5C entraine une perte de la capacité d'hydrolyser l'ATP *in vitro* (le déplacement le

long des microtubules nécessite l'hydrolyse de l'ATP) et une localisation anormale avec une séquestration au niveau du réseau de microtubules. Ces résultats sont cohérents avec des travaux précédents décrivant un mutant KIF5C non motile capable de se lier aux microtubules mais dont l'hydrolyse de l'ATP est inhibée. Nous avons observé que la surexpression *in utero* du mutant KIF5C responsable de malformations du développement cortical entraine un mauvais positionnement des neurones dans le cortex et que le transport de BDNF est fortement perturbé dans des neurones en culture (résultats non publiés). La diminution de l'expression du BDNF lors du développement cortical étant connue pour mener à des défauts de la migration neuronale, KIF5C pourrait donc jouer un rôle crucial lors du processus de migration radiaire via par exemple la régulation du transport du BDNF (Résultats non publiés; Carabalona et al. 2016).

KIF2A fait partie de la famille des kinésines-13 qui sont décrites pour réguler la dynamique des microtubules via leur activité de dépolymérisation aux extrémités des microtubules (Desai et al., 1999; Walczak et al., 2013). En plus d'être très largement décrite pour son rôle durant la mitose, KIF2A est impliquée dans de nombreuses fonctions dans le système nerveux telle que la régulation de la dynamique des branchements collatéraux des axones. Nous avons montré au cours de mes travaux de thèse que l'expression de mutants KIF2A impliqués dans les malformations du développement cortical entraine des dérégulations dans des processus développementaux très variés tels que la prolifération des progéniteurs neuronaux, la migration neuronale et la différenciation axonale (Broix et al. 2016, voir partie Résultats). Les défauts de migration neuronale pourraient être causés par la perturbation de la dynamique des microtubules conséquentes à une localisation anormale de KIF2A qui est séquestré sur le réseau de microtubules dans les cellules en culture et dans les neurones en migration (Poirier et al. 2013 ; Broix et al. 2016, voir partie Résultats). Concernant les défauts de prolifération des progéniteurs, ils pourraient être expliqués par des défauts dans la progression de la mitose ainsi que dans le couplage entre le cil primaire et le cycle cellulaire, ce qui est cohérent avec le rôle récemment décrit de KIF2A dans le désassemblage du cil primaire dans des cellules en culture (Broix et al. 2016, voir partie Résultats; Miyamoto et al. 2015).

d. Les tubulines

Etant donné le rôle crucial joué par le réseau de microtubules et ses protéines régulatrices dans le processus de migration neuronale, il n'est pas surprenant que des mutations dans des gènes codant pour les sous-unités fonctionnelles des microtubules, les tubulines (Figure 35), aient été identifiées comme responsables de malformations du développement cortical associées à des défauts de la migration neuronale.

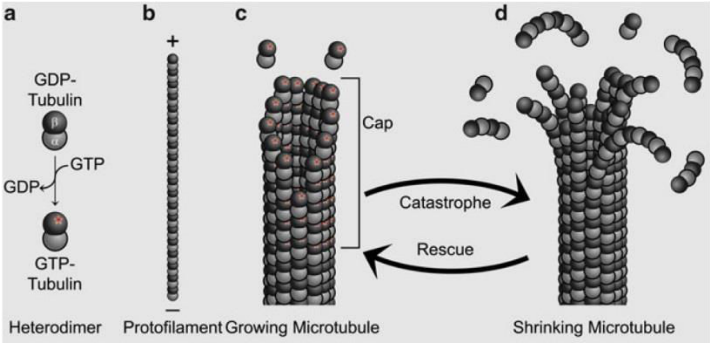


Figure 35 : Structure et assemblage d'un microtubule.

Les hétérodimères d'α et β-tubulines sont les sous-unités structurelles des microtubules. Les hétérodimères peuvent se lier au GDP ou au GTP mais seule la β-tubuline possède une activité d'hydrolyse du GTP en GDP (représentée par une étoile). (b) L'assemblage longitudinal des hétérodimères de tubulines α et β forme les protofilaments. Ces protofilaments sont polarisés avec la β-tubuline qui est orientée vers l'extrémité (+) et l'α-tubuline qui est orientée vers l'extrémité (-). (c) *In vivo,* les microtubules sont formés de 13 protofilaments. Un microtubule en polymérisation incorpore des hétérodimères liés au GTP (étoiles) au niveau de l'extrémité (+) puis le GTP est hydrolysé en GDP. L'extrémité en croissance est donc recouverte d'hétérodimères liés au GTP, ce qui permet de prévenir la dépolymérisation. (d) Les microtubules peuvent entrer dans une phase de dépolymérisation (catastrophe) suite par exemple à l'action de protéines à activité microtubule dépolymérase. Les microtubules en cours de dépolymérisation sont caractérisés par des protofilaments courbés au niveau de l'extrémité (+), ce qui est dû à la présence d'hétérodimères liés aux GDP. Les hétérodimères liés au GDP qui sont libérés sont ensuite recyclés par l'échange de GDP par du GTP et redeviennent ainsi utilisables pour une phase de polymérisation (rescue). (D'après Breuss & Keays 2014)

Le gène *TUBA1A,* qui code pour l'isoforme de tubuline α-1A, a été le premier de la famille des tubulines impliqué dans des maladies neurodéveloppementales suivant l'analyse d'un clone de souris présentant une mutation dans *Tuba1a* induite par mutagenèse ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) (Keays et al., 2007). L'analyse histologique a montré des anormalités dans l'architecture laminaire du cortex et de l'hippocampe qui ont été attribuées à un défaut de la migration neuronale. Ce phénotype a conduit à réaliser des analyses génétiques chez l'homme et a permis d'identifier des mutations responsables d'un large spectre de lissencéphalies (Keays et al., 2007; Kumar et al., 2010; Poirier et al., 2007). Les mécanismes moléculaires altérés par des mutations dans *Tuba1a* sont variés. Certaines mutations entrainent une forte réduction de la formation d'hétéro-dimères d'α et β-tubulines mais n'altèrent pas l'incorporation des hétéro-dimères au niveau des microtubules, suggérant que ces mutations agissent selon un mécanisme d'haplo-insuffisance (Keays et al., 2007). De manière similaire, certaines mutations mènent à une forte réduction de la formation d'hétéro-dimères conséquente à un défaut dans la voie de repliement des tubulines (Tian et al., 2008). D'autres exemples de mutations montrent que le repliement n'est pas affecté mais que l'incorporation au niveau du réseau de microtubules affecte la dynamique des microtubules et leur croissance, indiquant que ces mutations agissent selon un mécanisme dominant négatif (Tian et al., 2010). Ces mutations pourraient plutôt influencer la liaison de protéines associées aux microtubules telles que DCX et les kinésines, qui sont essentielles pour la migration neuronale et le développement du cerveau.

Par la suite, le gène *TUBB2B* (codant pour l'isoforme de tubuline β-2B) a aussi été impliqué dans les malformations du développement cortical, principalement chez des patients présentant des polymicrogyries (Jaglin et al., 2009). Des études biochimiques réalisées avec certaines mutations dans TUBB2B ont montré que de manière similaire aux mutations dans TUBA1A, les mutations TUBB2B induisent un défaut au niveau de la voie de repliement des hétéro-dimères et l'incorporation au niveau des microtubules (Jaglin et al., 2009). Il a été montré que *Tubb2b* est fortement exprimé dans les neurones post mitotiques à des stades clés de la migration neuronale et que le positionnement des neurones dans le cortex est altéré suite à la diminution de l'expression de TUBB2B par électroporation *in utero*, ce qui indique le rôle crucial joué par TUBB2B dans la migration neuronale radiaire (Jaglin et al., 2009).

Plus récemment, des mutations dans le gène *TUBB3* (codant pour l'isoforme de tubuline β-3) ont été identifiées chez des patients avec des malformations du développement cortical associées à des défauts de la migration neuronale (Poirier et al., 2010). En se basant sur la technique d'électroporation *in utero*, nous avons démontré que la diminution de l'expression de TUBB3 mène à un retard de la migration neuronale associé à des défauts dans le processus de polarisation des neurones à l'interface entre la zone sous-ventriculaire et la zone intermédiaire (voir partie Résultats, Saillour et al. 2014). De manière surprenante, alors que la protéine TUBB3 est considérée comme un marqueur des neurones post mitotiques, nous avons également observé une augmentation du nombre de progéniteurs intermédiaires mais une réduction de leur prolifération. Ces résultats indiquent donc que les défauts de migration induits par l'inhibition de l'expression de TUBB3 pourraient entrainer un effet indirect sur la prolifération des progéniteurs intermédiaires. Cet effet pourrait être dû par exemple à l'émission de signaux anti-prolifératifs déclenchés par des contacts entre les cellules bloquées et les progéniteurs intermédiaires.

e. Le centrosome

Comme mentionné précédemment, le centrosome est un élément crucial pour de nombreux processus cellulaires indispensables au développement cortical via par exemple son rôle dans la nucléation des microtubules, la régulation du fuseau mitotique et en formant la base du cil primaire.

Nous avons reporté l'identification de trois mutations dans le gène *TUBG1*, codant pour un composant structurel du centrosome, la γ-tubuline, chez des patients présentant des malformations du développement cortical complexes (voir partie Résultats, Poirier et al. 2013). Des analyses fonctionnelles ont montré que les mutations peuvent induire des dérégulations dans la voie de repliement de TUBG1 par des protéines chaperonnes ou diminuer la fréquence de nucléation des microtubules au niveau du *spindle pole body* (l'équivalent du centrosome chez la levure). Il n'est donc

pas surprenant que l'ARN interférence *in utero* de *Tubg1* résulte en un défaut sévère de la migration radiaire (voir partie Résultats, Poirier et al. 2013).

Comme nous l'avons vu précédemment, une grande variété de gènes codants pour des protéines centrosomales a été impliquée dans des cas de microcéphalies. En conséquence, la majorité des études concernant ces gènes s'est focalisée sur la compréhension des mécanismes altérés lors de la prolifération des progéniteurs neuronaux. Cependant, certaines de ces protéines ont également été impliquées dans le processus de migration neuronale. C'est le cas de CENPJ *(Centromere protein j,* aussi connu sous le nom de CPAP) et de SDCCAG8 (*Serologically defined colon cancer antigen 8). CENPJ est décrite comme une protéine d'échafaudage permettant le recrutement du matériel péricentriolaire contrôlant ainsi la taille du centrosome* (Kirkham et al., 2003; Tang et al., 2009). *Une étude a montré que la diminution de l'expression de CENPJ dans les neurones post-mitotiques augmente la stabilité des microtubules et mène à une réduction de la vitesse de migration, une position anormale du centrosome et une morphologie aberrante des neurones en migration* (Garcez et al., 2015). *De manière similaire, Insolera et coll ont décrit que SDCCAG8 forme un complexe avec PCM1 (Pericentriolar material 1) et régule le recrutement des composants péricentriolaires, incluant la γ-tubuline et la péricentrine, au niveau du centrosome* (Insolera et al., 2014b) *(Figure 36). Une diminution de l'expression de SDCCAG8 perturbe l'organisation des microtubules et altère le couplage entre le centrosome et le noyau et donc la nucléokinèse* (Insolera et al., 2014b).

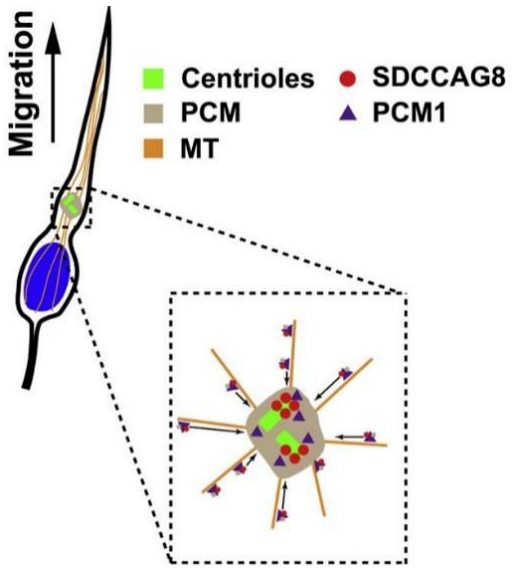


Figure 36 : Modèle illustrant le rôle de SDCCAG8 dans la régulation du recrutement du matériel péricentriolaire dans les neurones en migration.

La protéine SDCCAG8, dont l'expression est spécifiquement augmentée dans les neurones s'engageant dans le processus de migration radiaire, forme un complexe avec PCM1 et régule ainsi le recrutement du matériel péricentriolaire, incluant la γ-tubuline et la péricentrine, au niveau du centrosome afin d'assurer son intégrité. Ce recrutement permet de maintenir l'organisation du réseau de microtubules nécessaire au couplage entre le centrosome et le noyau durant la nucléokinèse. (D'après Insolera et al. 2014)

f. Les modifications post-traductionnelles des tubulines

Les tubulines peuvent être soumises à de nombreuses modifications post-traductionnelles telles que la tyrosination/détyrosination, la phosphorylation ou l'acétylation (Westermann and Weber, 2003). Le rôle précis de ces modifications reste dans l'ensemble encore très peu connu. A l'exception de l'acétylation, ces modifications surviennent au niveau de l'extrémité carboxy-terminale située sur la surface externe des microtubules et pourraient ainsi être impliquées dans la régulation des interactions avec des protéines associées aux microtubules (Nogales et al., 1999).

Dans le contexte du développement cortical et de la migration neuronale, quelques études révèlent le rôle crucial joué par l'acétylation de l'α-tubuline. En effet, le complexe Elongator, qui a une activité acétyltransférase, régule l'acétylation de l'α-tubuline et il est suggéré que cette activité contrôle la migration et la différenciation des neurones corticaux (Creppe et al., 2009). Une autre évidence de l'implication de l'acétylation de l'α-tubuline provient du défaut de migration observé conséquent à la réduction du niveau d'acétylation de l'α-tubuline lorsque l'acétyltransférase MEC-17 est inhibée (Li et al., 2012a). De plus, il est pertinent de mentionner que l'altération de l'acétylation est également à l'origine du défaut de migration neuronale induit par l'ARN interférence *in utero* de *Srpx2* (*Sushi-repeat containing protein,X-linked 2*) (Salmi et al. 2013). En effet, les auteurs montrent que SRPX2 peut influencer l'acétylation de l'α-tubuline et que l'administration de Tubacine, un inhibiteur des déacétylases des tubulines, chez les souris gestantes électroporées *in utero,* permet de prévenir le défaut de migration induit par l'inhibition de l'expression de *Srpx2* (Salmi et al., 2013).

2.4.2 Le cytosquelette d'actine et ses protéines associées

La régulation de la migration repose aussi sur une régulation fine de la dynamique et de la structure des filaments d'actine principalement au niveau de l'extrémité du processus antérieur mais repose également sur l'implication d'un moteur moléculaire associé à l'actine, la myosine II, nécessaire à la nucléokinèse.

a. La Filamine-A

L'un des meilleurs exemples démontrant que la régulation de la dynamique de l'actine est cruciale pour la migration neuronale provient du fait que des mutations dans le gène Filamine-A (*FLNA*) sont la cause majeure des hétérotopies nodulaires périventriculaires (HNP) généralement associées à des épilepsies (Fox et al., 1998; Parrini et al., 2006; Sheen et al., 2001). Les HNP sont caractérisées par la présence ectopique de nodules de neurones le long des ventricules latéraux et sont donc considérées comme des pathologies de la migration neuronale (Ekşioğlu et al. 1996; Barkovich, 2005). FLNA est une phosphoprotéine se liant à l'actine et qui, en coopérant avec les membres du complexe Arp2/3, participe à former des réseaux d'actine orthogonaux via l'interconnexion entre filaments d'actine

(Nakamura et al., 2007; Stossel et al., 2001). FLNA est capable d'interagir avec des protéines transmembranaires et sert d'échafaudage pour de nombreuses protéines de signalisation telles que la famille des Rho GTPases, qui sont également impliquées dans la migration neuronale (Devreotes and Horwitz, 2015; Stossel et al., 2001). La haute fréquence de mutations dans FLNA entrainant des troncations du domaine de liaison à l'actine semble indiquer que l'habilité à se lier et à interconnecter les filaments d'actine est essentielle pour la migration neuronale (Parrini et al., 2006). De manière cohérente, l'expression d'une forme tronquée de FLNA sans le domaine de liaison à l'actine dans le cortex en développement mène à un arrêt de la migration neuronale associée à des défauts dans la mise en place de la polarité neuronale dans les zones sous-ventriculaire et intermédiaire (Nagano et al., 2004). Cependant, deux modèles souris KO pour *FlnA* ont été étudiés et n'ont pas révélé la présence de nodules ectopiques de neurones dans le cortex (Feng et al., 2006; Hart et al., 2006). Au contraire, de manière intéressante, deux études ont montré respectivement que la perte d'expression de la kinase MEKK4 (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4)*, qui phosphoryle FLNA, entraine l'apparition d'hétérotopies nodulaires et dans un deuxième cas que l'ARNi *in utero* de *FlnA* reproduit également le phénotype d'hétérotopie nodulaire chez le rat avec pour origine une perturbation de l'adhérence apicale des cellules gliales radiaires à la bordure des ventricules (Carabalona et al., 2012; Sarkisian et al., 2006).

b. La famille Ena/VASP

Une seconde famille de protéines régulant l'actine correspond aux protéines Ena/VASP (*Enabled*/*Vasodilatator-stimulated phosphoprotein*). Les protéines Ena/VASP régulent la migration cellulaire en facilitant la polymérisation de l'actine au niveau de la membrane par un effet antagoniste sur la formation d'une coiffe à l'extrémité de l'actine et en agissant comme des actines polymérases (Barzik et al., 2005; Breitsprecher et al., 2011; Hansen and Mullins, 2010). Il n'est donc pas surprenant que plusieurs études aient démontré l'implication de ces protéines dans la migration radiaire et le positionnement des neurones dans le cortex (Goh et al., 2002; Kwiatkowski et al., 2007). En particulier, les protéines Ena/VASP semblent réguler la transition multipolaire/bipolaire des neurones en migration (Yoshinaga et al., 2012).

c. La protéine motrice Myosine II

La protéine motrice myosine II est capable de générer des forces vers les extrémités (+) des filaments d'actine, ce qui résulte en une constriction locale du cytosquelette d'actine qui est nécessaire à la migration des cellules (Vicente-Manzanares et al., 2009). L'analyse de souris modèles présentant des mutations à l'état homozygote dans le domaine moteur de la myosine II ont permis de démontrer que

la myosine II est cruciale pour la migration d'une grande diversité de sous-types neuronaux durant le développement du cerveau de souris (Ma et al., 2004). De plus, la délétion de la myosine II chez la souris engendre de sévères anomalies du développement du cerveau incluant des défauts de migration (Tullio et al., 2001). Il a été montré que la contraction de l'actine médiée par la myosine II au niveau de l'extrémité postérieure des neurones joue un rôle crucial pour le mouvement vers l'avant du noyau lors de la nucléokinèse (Schaar and McConnell, 2005) (Figure 37). La myosine II a également été observée au niveau de l'extrémité du processus antérieur où elle permet le contrôle coordonné du mouvement du centrosome et du corps cellulaire des neurones granulaires du cervelet (Solecki et al., 2009).

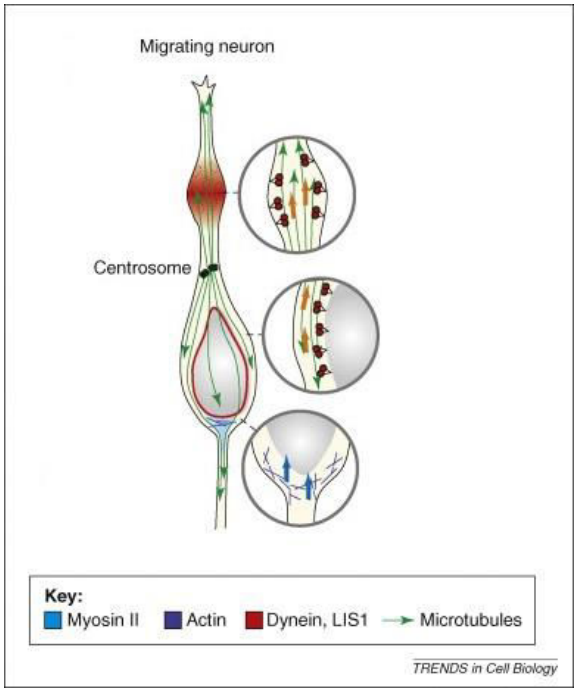


Figure 37 : Rôles de la myosine II et de la dynéine cytoplasmique durant la migration neuronale.

Dans les neurones en migration, la myosine II est située en arrière du noyau au niveau des filaments d'actine et exerce une force contractile (flèches bleues) permettant la nucleokinèse (agrandissement du bas). La dynéine cytoplasmique produit des forces (flèches orange) au niveau du renflement du processus antérieur permettant le mouvement vers l'avant des microtubules et du centrosome (agrandissement du haut). La dynéine est également présente au niveau des microtubules proches de la membrane nucléaire et coopère avec la myosine II pour permettre le mouvement du noyau vers le centrosome (agrandissement du milieu). (Adaptée d'après Vallee et al. 2009)

2.4.3 Le lien entre les réseaux d'actine et de microtubules

Bien que la majorité des études se focalisent sur les fonctions séparées des microtubules et de l'actine, ces deux éléments du cytosquelette fonctionnent étroitement durant la migration neuronale.

Plusieurs études démontrent par exemple que LIS1 est aussi impliqué dans la régulation du cytosquelette d'actine. L'haplo-insuffisance de LIS1 entraine une réduction de l'actine filamenteuse au niveau de l'extrémité du processus antérieur des neurones en migration (Kholmanskikh et al., 2003, 2006). Il a aussi été montré que LIS1 peut se lier à DAB1 (*Disabled homolog 1*) qui est une protéine de la voie de signalisation Reelin (voir la section sur la voie de signalisation Reelin). LIS1 et DAB1 sont

phosphorylées de manière dépendante de l'activation de la voie Reelin et peuvent ainsi interagir ensemble pour contrôler la polymérisation de l'actine dans le cône de croissance des neurones en migration (Assadi et al., 2003).

La protéine DCX est également étroitement liée au réseau d'actine. En effet, il a été suggéré que DCX peut se lier aux microtubules et à l'actine et permet l'association des deux éléments du cytosquelette *in vitro,* la distribution entre ces deux éléments est régulée par la Neurobine-II (Tsukada et al., 2005). Sachant que des phosphorylations de DCX par la kinase JNK entraine une relocalisation de DCX au niveau de l'extrémité du cône de croissance où se situe l'actine filamenteuse, cela laisse suggérer un rôle important de DCX dans la régulation de la dynamique des deux réseaux de microtubules et d'actine dans le cône de croissance et donc dans la migration neuronale (Gdalyahu et al., 2004).

2.4.4 CDK5, une kinase clé pour la régulation de la migration neuronale

CDK5 (*Cyclin dependant kinase 5*) est une sérine/thréonine kinase non conventionnelle puisqu'elle est principalement exprimée dans les neurones post mitotiques plutôt que dans les progéniteurs neuronaux (Tsai et al., 1993). Les souris KO constitutives et conditionnelles pour Cdk5 présentent une sévère perturbation dans la structure en couches du cortex avec un inversement des couches II-VI suggérant un rôle crucial de CDK5 dans la mise en place de l'organisation « *inside-out* » du cortex (Ohshima et al., 1996, 2007). CDK5 régule, en plus de la prolifération, de multiples étapes de la migration radiaire incluant la transition multipolaire-bipolaire dans la zone intermédiaire, la formation du processus antérieur et la nucléokinèse (Kawauchi et al., 2006; Nishimura et al., 2014; Ohshima et al., 2007).

L'inhibition de l'activité de CDK5 mène à une stabilisation anormale des microtubules ce qui résulte en une dérégulation de la dynamique des microtubules dans les neurones en migration (Kawauchi et al., 2006). Cdk5 phosphoryle de nombreuses protéines associées aux microtubules telles que DCX et NDEL1 (Niethammer et al., 2000; Tanaka et al., 2004b). La phosphorylation de DCX par CDK5 réduit l'affinité de DCX pour les microtubules ce qui résulte en une localisation périnucléaire de DCX (Tanaka et al., 2004b). La phosphorylation de NDEL1 par CDK5 permet la liaison de NDEL1 à la dynéine cytoplasmique et permet ainsi de réguler la nucléokinèse (Toyo-Oka et al., 2005).

Un autre substrat de CDK5 particulièrement intéressant est p27kip1 qui est une protéine régulatrice du cytosquelette d'actine et des microtubules dans les neurones en migration (Godin et al., 2012; Kawauchi et al., 2006). Une étude récente a montré que la phosphorylation de DCX et p27kip21 par CDK5 régule la nucléokinèse lors du processus de migration neuronale (Nishimura et al., 2014) (Figure 38).

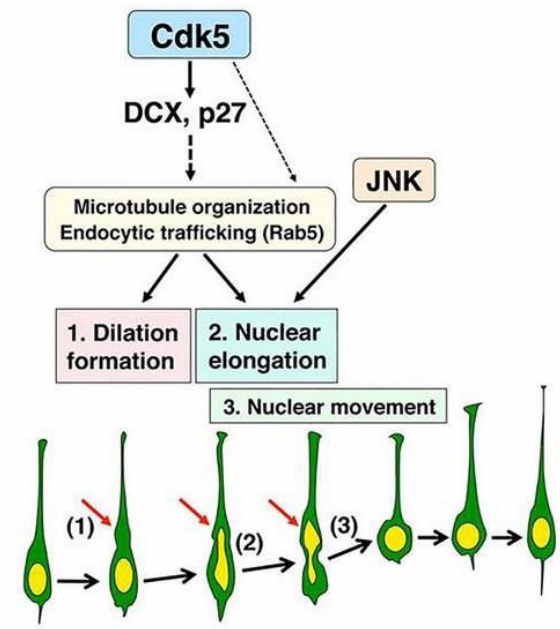


Figure 38 : CDK5 régule la formation du renflement cytosplasmique du processus antérieur et l'élongation du noyau dans les neurones en migration.

Les neurones en migration subissent plusieurs changements morphologiques répétitifs afin d'assurer leur locomotion. Ils forment d'abord un renflement au niveau de la base du processus antérieur (1) puis le noyau s'allonge au niveau de ce renflement (2) pour finalement se déplacer entièrement vers le renflement (3). CDK5, via la phosphorylation de ces substrats DCX et p27, régule la formation du renflement et l'élongation du noyau tandis que JNK ne régule que le processus d'élongation nucléaire. La régulation de ces deux processus semble se faire via le rôle de CDK5 dans l'organisation des microtubules et le trafic endocytaire dépendant de Rab5. (D'après Nishimura et al. 2014)

2.4.5 Les signaux extracellulaires impliqués dans la migration neuronale

a. Les signaux de guidage longue distance

Un grand nombre de molécules sécrétées et leurs récepteurs participent à la régulation de l'orientation de la migration neuronale radiaire.

Les semaphorines apportent un bon exemple pour comprendre comment la sécrétion de molécules peut réguler le processus de migration neuronale. En particulier, la classe 3 des sémaphorines est connue à l'origine pour produire un effet répulsif lors du guidage de l'axone en se fixant à ses récepteurs, les neuropilines et les plexines, ce qui a pour conséquence un réarrangement du cytosquelette d'actine via les Rho GTPases (Schmidt et al., 2010). Cependant, lors de la migration radiaire, les semaphorines semblent produire un signal attractif pour les neurones en migration. En effet, la semaphorine-3A est exprimée selon un gradient descendant dans la plaque cortical (plus forte expression au niveau des couches superficielles) et sert de signal attractif pour les neurones en migration destinés aux couches II-III exprimant la neuropiline-1 (Chen et al., 2008b). Plus récemment, il a été montré que la Synapsine III est essentielle pour l'orientation correcte de la migration neuronale radiaire et que son activation via la phosphorylation par CDK5 se fait en aval de l'activation du récepteur neuropiline-1 par la sémaphorine 3A (Perlini et al., 2015).

Les protéines Slit et leurs récepteurs associés de la famille des Robo (*Roundabout*) correspondent à une autre classe de molécule chimio-répulsives principalement connues pour être sécrétées au niveau des éminences ganglionnaires afin de réguler la migration des interneurones (Andrews et al., 2007). Cependant, deux études ont également impliqué Robo1 dans le positionnement des neurones destinés aux couches II-III et Robo4 dans la régulation de l'orientation de la migration radiaire via, en partie, la

suppression de l'activité répulsive de Slit (Gonda et al., 2013; Zheng et al., 2012). La signalisation Slit/Robo régule principalement la dynamique du cytosquelette d'actine. En effet, la liaison de Slit avec son récepteur Robo recrute la protéine srGAP qui va inactiver la Rho GTPase Cdc42 et ainsi inhiber la polymérisation de l'actine dépendant de Arp2/3 (Wong et al., 2001).

b. La signalisation Reelin, un modèle de convergence de voies de signalisation

La voie de signalisation Reelin joue un rôle fondamental dans la migration neuronale et la mise en place de la lamination corticale. Historiquement, Falconer a décrit une lignée de souris mutantes du nom de *Reeler* qui présentaient une ataxie avec une démarche tournoyante et des tremblements plus ou moins importants en fonction du niveau d'activité de la souris (Falconer, 1951). La souris mutante *Reeler* présente au niveau du cortex une désorganisation des couches corticales avec des neurones pyramidaux positionnés de manière aberrante. En effet, la première vague de neurones est incapable d'induire la séparation de la préplaque puis les neurones produits ultérieurement ne sont plus capables de passer au travers les neurones précédents, ce qui induit une inversion de la lamination avec des neurones de la couche VI au niveau de la superficie et les neurones de la couche II dans la région la plus profonde du cortex (Tissir and Goffinet, 2003) (Figure 39).

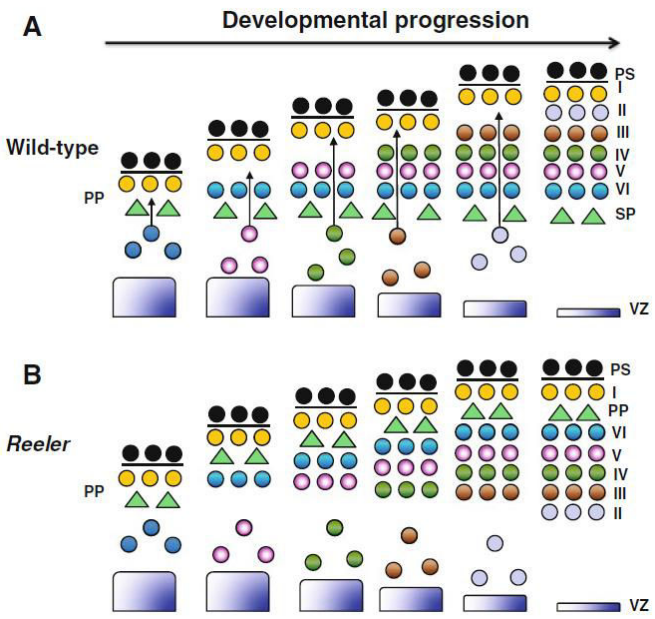


Figure 39 : Migration des neurones pyramidaux et organisation laminaire du cortex de souris sauvage ou *Reeler*.

Voir texte principal. (D'après Gao & Godbout 2013)

Par la suite, le gène responsable du phénotype chez la souris *Reeler* a été cloné et a été nommé *RELN* (D'Arcangelo et al., 1995). *RELN* code pour une protéine nommée Reelin qui est une glycoprotéine de haut poids moléculaire sécrétée par les cellules de Cajal-Retzius au niveau de la zone marginale du

cortex en développement. Il est également intéressant de noter que des mutations dans le gène *RELN* sont associées à des lissencéphalies et des hypoplasies cérébelleuses chez l'humain (Hong et al., 2000). Par la suite, des explorations fonctionnelles combinées à des études de mutations ciblées et spontanées dans plusieurs gènes exprimés dans les neurones en migration, incluant *Dab1* (*Disabled-1*), *VLDLR* (*Very low-density lipoprotein receptor*) et *ApoER2* (*Apolipoprotein E receptor 2*) ont généré le même phénotype que chez la souris mutante *Reeler* (D'Arcangelo et al., 1995; Howell et al., 1997; Sheldon et al., 1997; Trommsdorff et al., 1999). Des études complémentaires ont permis de démontrer que l'ensemble des protéines exprimées par ces gènes font partie de la même voie de signalisation et joue un rôle crucial dans la migration neuronale radiaire (D'Arcangelo et al., 1995; Hiesberger et al., 1999). En effet, la Reelin se lie aux récepteurs VLDLR et ApoER2 et induit la phosphorylation de l'adaptateur intracellulaire Dab1 par des kinases de la famille Src. L'activation de Dab1 est cruciale pour la signalisation Reelin via le recrutement de nombreuses protéines à domaine SH2 (*Src homology 2*) telles que PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*) et Crk (Bock and May, 2016). La diversité des cascades de signalisation activitée en aval de la voie Reelin/Dab1 est à l'origine de la multitude de processus régulés par cette voie durant la migration radiaire (Figure 40). Nous allons maintenant nous focaliser sur l'influence de l'activation de Dab1 par la Reelin sur les voies Dab1-Crk-Rap1, Dab1-PI3K et sur la régulation de la voie Reelin par la dégradation de Dab1.

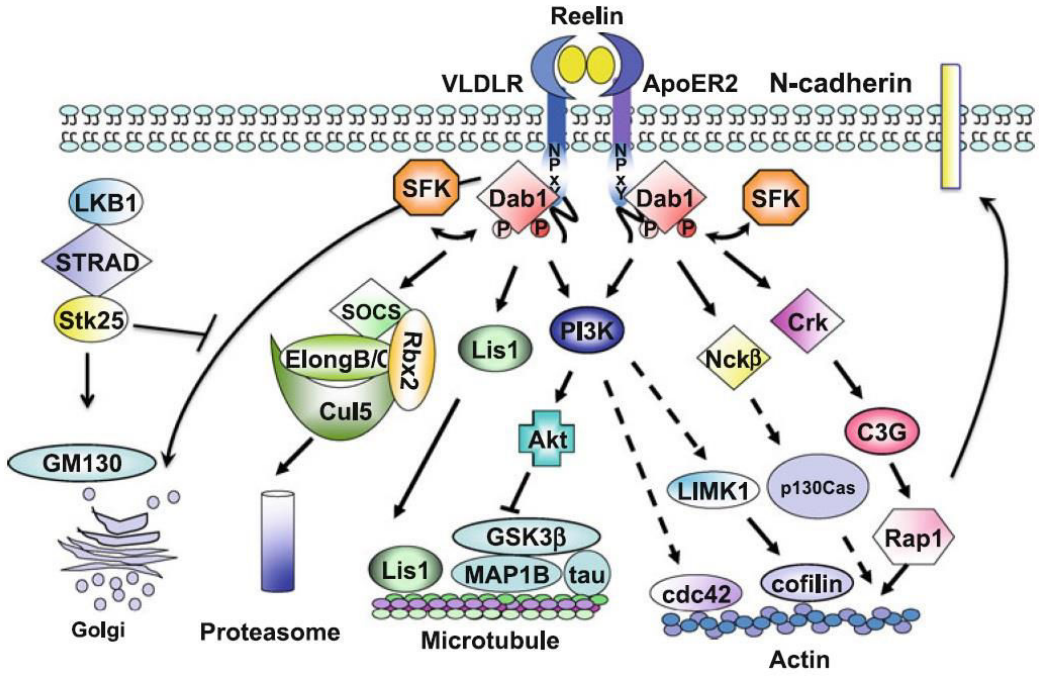


Figure 40 : La voie de signalisation Reelin-Dab1.

(D'après Gao & Godbout 2013)

b-1 La voie Dab1-Crk-Rap1

La phosphorylation de Dab1 après fixation de la Reelin sur ses récepteurs promeut l'interaction de Dab1 avec l'adaptateur Crk, ce qui induit ensuite la phosphorylation de C3G (un facteur d'échange nucléotidique pour Rap1) entrainant l'activation de la petite GTPase Rap1 (Ballif et al., 2004). Rap1 joue un rôle important dans la régulation du cytosquelette d'actine, dans le trafic membranaire et dans l'adhésion cellulaire (Gloerich and Bos, 2011).

Dans un premier cas, cette voie Dab1-Crk-Rap1 est cruciale pour la migration radiaire des neurones multipolaires précédant la migration bipolaire (Jossin and Cooper, 2011). Dans les neurones multipolaires, Rap1 est activé via Dab1-Crk ce qui entraine une augmentation de la protéine d'adhésion cellulaire N-Cadhérine au niveau de la membrane. Cette relocalisation de la N-Cadhérine à la membrane permettrait aux neurones multipolaires de recevoir des signaux environnementaux afin d'orienter leur migration de manière radiaire vers la zone intermédiaire (Jossin and Cooper, 2011).

Cette voie de signalisation est également décrite dans le processus final de la migration neuronale, la translocation somatique terminale (Franco et al., 2011; Sekine et al., 2012). Une première étude montre que l'inactivation de *Rap1* par électroporation *in utero* perturbe la translocation somatique des neurones précoces indépendante de la glie radiaire et la translocation somatique terminale des neurones tardifs (Franco et al., 2011). La fonction de Rap1 dans ce processus semble dépendante de la N-Cadhérine étant donné que sa surexpression permet de sauver le phénotype induit par l'inactivation de Rap1. Cependant, la surexpression de la cadhérine ne sauve pas le phénotype provoqué par l'absence de Dab1, ce qui souligne la nature pléiotropique de la signalisation Reelin-Dab1 qui peut affecter différentes étapes du développement avec des niveaux d'actions cellulaires et moléculaires variées (Franco et al., 2011). Une deuxième étude sur l'implication de Reelin-Rap1 dans la translocation somatique terminale renforce cet aspect pléiotropique et complexe puisqu'elle indique à l'inverse que la surexpression de la cadhérine ne permet pas un sauvetage complet du défaut induit par l'inactivation de Rap1 (Sekine et al., 2012). Les auteurs suggèrent que l'activation de la voie Dab1-Crk-Rap1 par la Reelin promeut l'adhésion à la matrice extracellulaire localisée dans la zone marginale via l'activation de l'intégrine α5β1 (récepteur de la fibronectine) (Figure 41). Cette adhésion est ensuite nécessaire à la translocation somatique terminale et finalement à la mise en place correcte des couches corticales. De manière intéressante, cette étude suggère également un rôle de Akt dans la translocation somatique terminale puisque la co-expression de l'intégrine α5 et Akt sauve le défaut de translocation terminale causé par la double inhibition de ApoER2/VLDLR alors que l'expression seule de l'intégrine α5 ou Akt ne sauve pas le phénotype (Sekine et al. 2012). Cependant, il est important de noter que la délétion spécifique dans les neurones en migration de l'intégrine β1 ne semble pas être essentielle pour la formation du cortex, ce qui semble être en opposition avec l'étude citée précédemment (Belvindrah et al., 2007).

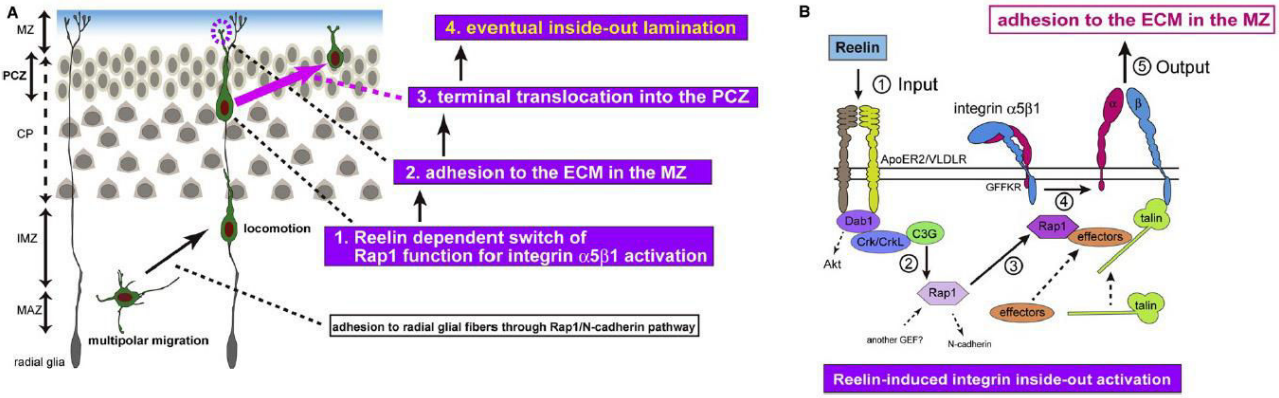


Figure 41 : Modèle du contrôle de la translocation somatique terminale et de la mise en place de la lamination corticale par la signalisation Reelin.

(A) Schéma des différentes phases de la migration radiaire. Les neurones multipolaires subissent un changement de morphologie pour devenir bipolaires et migrer par adhésion le long des fibres des cellules gliales radiaires via la voie Rap1/N-Cadhérine. Lorsque les neurones atteignent la limite entre la plaque corticale (CP) et la zone primitive corticale (PCZ), qui est constituée de neurones immatures, ils adhèrent à la matrice extracellulaire de la zone marginale (MZ) via l'extrémité de leur processus antérieur. Cette adhésion permet ensuite de réaliser la translocation somatique terminale dans la PCZ et d'assurer l'organisation *inside-out* du cortex. (B) Schéma de l'activation de l'intégrine α5β1 dépendante de la Reelin. La phosphorylation de Dab1 dépendante de la fixation de la Reelin sur ses récepteurs entraine le recrutement de Crk et la phosphorylation de C3G (1). C3G active ensuite Rap1 (2), qui va recruter des effecteurs (3) permettant le changement de conformation de l'intégrine α5β1. L'activation de l'intégrine α5β1 assure l'adhésion du processus antérieur des neurones à la fibronectine présente dans la zone marginale et régule le processus de translocation somatique terminale. (D'après Sekine et al. 2012)

b-2 La voie Dab1-PI3K-Akt

La signalisation Reelin-Dab1 est connue pour pouvoir moduler les deux éléments du cytosquelette, les filaments d'actine et les microtubules, via le recrutement de PI3K par Dab1 phosphorylé (Ballif et al., 2004).

Chen et *coll* ont montré que l'activation de la signalisation Reelin mène à la phosphorylation de l'actine dépolymérase n-cofiline par la kinase Limk1, ce qui résulte en une inactivation de la n-cofiline et la stabilisation des filaments d'actine (Chai et al., 2009). Les auteurs suggèrent que cette phosphorylation de la n-cofiline est dépendante de la voie Reelin-Dab1-PI3K et prend place au niveau du processus antérieur des neurones en migration à mesure qu'ils s'approchent de la zone marginale sécrétant la Reelin et ainsi régulerait les étapes terminales de la migration par réorganisation des filaments d'actine (Chai et al., 2009). Plus récemment, il a été montré que la Reelin et la cofiline coopèrent et sont indispensables pour le processus de migration radiaire en régulant la dynamique du processus antérieur via la modulation du cytosquelette d'actine (Chai et al., 2016). En effet, les auteurs montrent par exemple que l'expression de la kinase Limk1 permet de sauver le phénotype de migration des neurones provenant d'embryons *Reeler*. Cependant l'implication de cette voie dans le processus de

translocation terminale reste à élucider, notamment en prenant en considération que lorsque Franco et *coll* perturbent la fonction de la cofiline ou Limk1, ils n'observent pas de défaut de migration des neurones précoces qui se déplacent selon un mode de translocation somatique se rapprochant du processus de translocation terminale. (Franco et al. 2011).

Des études ont suggéré un lien entre Dab1 et la voie PI3K-Akt puisque Dab1 phosphorylé serait capable de recruter PI3K pour ensuite activer la voie PI3K-Akt (Ballif et al., 2004; Beffert et al., 2002; Bock et al., 2003). La signalisation Reelin, via la régulation de PI3K et Akt, semble nécessaire à la formation correcte de la plaque corticale (Bock et al., 2003; Jossin and Goffinet, 2007). De plus, la voie Reelin-PI3K-Akt est également décrite pour réguler la dynamique des microtubules dans les neurones en migration par activation de la protéine associée aux microtubules MAP1B via la phosphorylation de GSK-3β (González-Billault et al., 2005). Cependant, Jossin et Goffinet suggéraient que la formation correcte de la plaque corticale dépendante de Reelin-PI3K-Akt ne requiert pas GSK-3β (Jossin and Goffinet, 2007). Des études complémentaires sont donc nécessaires afin d'évaluer l'influence réelle de la voie Dab1-PI3K-Akt-GSK3β sur le processus de migration neuronale via la régulation des microtubules.

Un lien entre Reelin et Akt est aussi suggéré par une étude récente montrant que des défauts de migration induits par une mutation gain de fonction dans Akt peuvent être restaurés par la diminution de l'expression de Reelin. Ce sauvetage phénotypique s'expliquerait par le fait qu'une activation aberrante de Akt aurait un effet négatif sur le facteur de transcription Foxg1 (*Forkhead Box G1*) induisant une expression ectopique de Reelin dans les neurones en migration (Baek et al., 2015) (Figure 42). L'importance du contrôle de l'activité de Akt dans le développement cortical a été mis en évidence par l'identification de mutations dans le gène *AKT3* chez des patients présentant des malformations du développement cortical focales et dont la conséquence majeure de ces mutations est la sur-activation de *AKT3* (Lee et al., 2012a; Poduri et al., 2012; Rivière et al., 2012). D'autre part, il est intéressant de noter que récemment une étude a montré que Akt et son activateur PDK1 (*phosphoinositide-dependent protein kinase 1*) régule la vitesse de locomotion des neurones pyramidaux par le contrôle du mouvement coordonné du noyau et du centrosome, probablement via la régulation du complexe dynéine-dynactine (Itoh et al., 2016). Ces données relieraient ainsi la voie PDK1-Akt et les protéines associées aux microtubules dans le développement du cortex.

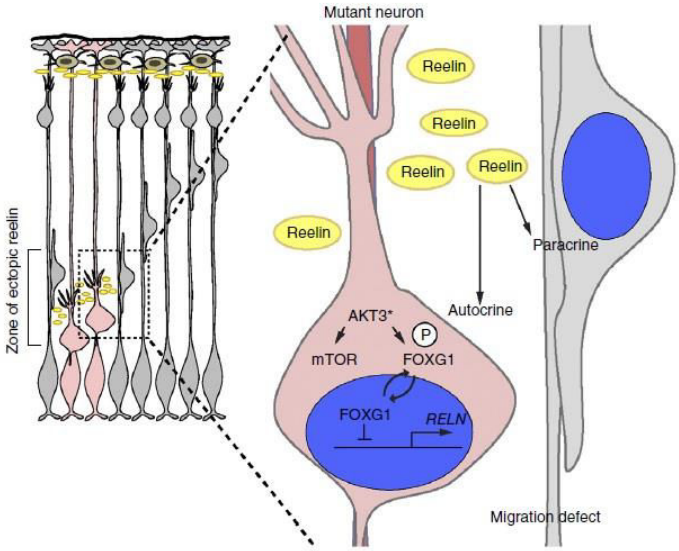


Figure 42 : Modèle de l'effet d'une mutation mosaïque somatique activatrice de AKT3 sur la migration neuronale.

Les cellules présentant la mutation mosaïque somatique activatrice de AKT3 (AKT3*) responsable de malformations du développement cortical focales sont roses tandis que les cellules voisines sont grises. L'activation aberrante de AKT3 entraine l'activation de la voie mTOR et la phosphorylation de FOXG1, entrainant sa relocalisation au niveau du cytoplasme. FOXG1 n'exerce plus son effet répressif sur l'expression de la Reelin, qui est ainsi sécrétée par les cellules mutantes de manière ectopique et agit selon un mode autocrine et paracrine. Cette expression ectopique mène à des défauts de la migration des neurones de manière cellule autonome (autocrine) mais également cellule non-autonome (paracrine), ce qui pourrait expliquer comment des mutations mosaïques somatiques retrouvées dans une faible proportion de cellules peuvent être responsables de troubles sévères et répandus du développement du cerveau. (D'après Baek et al. 2015)

b-3 Régulation de Dab1 par le système ubiquitine/protéasome

Une caractéristique commune et particulièrement intéressante des souris déficientes pour l'un des composants clés de la signalisation Reelin, telles que Src ou ApoER2 et Vldlr, est l'accumulation de la protéine Dab1 (Howell et al., 2000; Kuo et al., 2005; Trommsdorff et al., 1999). Toutes ces déficiences résultent en une réduction ou une absence de la phosphorylation de Dab1 suggérant que cette phosphorylation est importante pour la régulation du niveau de Dab1 et apporte ainsi un moyen de réguler négativement le signal Reelin après son activation. De manière cohérente, Honda et Nakajima ont récemment montré par électroporation *in utero* que l'excès de Dab1 dans le cytoplasme des neurones en migration provoque un arrêt de la migration radiaire (Honda and Nakajima, 2016).

Des études précédentes ont montré que la phosphorylation de Dab1 induite par la Reelin entraine l'ubiquitination dépendante de la Cullin-5 E3 ubiquitine ligase et de son adaptateur SOCS7 (*Suppressor of cytokine signaling 7*) puis la dégradation par le protéasome de Dab1 activé (Feng et al., 2007; Lawrenson et al., 2015; Simó and Cooper, 2013; Simó et al., 2010). L'expression d'un mutant Dab1 phosphorylable mais résistant à la dégradation dépendante de Cul5 entraine un excès de migration des neurones pyramidaux, indiquant que la dégradation de Dab1 est essentielle pour le positionnement correct des neurones dépendant de la signalisation Reelin (Simó et al., 2010). De la

même manière, les défauts de positionnement des neurones chez des souris KO de manière conditionnelle pour le gène *Rbx2* (sous-unité du complexe Cullin-5 E3 ubiquitine ligase) sont sauvés par l'expression à l'état hétérozygote de Dab1 (Simó and Cooper, 2013).

Plus récemment, Moon et *coll* ont montré que la délétion conditionnelle de la protéine TSC2 (Tuberin), laquelle est retrouvée mutée dans des scléroses tubéreuses complexes qui sont associées à des anomalies neurodéveloppementales, mène à des défauts de la migration neuronale (Simó and Cooper, 2013). Ces défauts sont dus à une augmentation de Dab1 totale et une diminution de Dab1 phosphorylée conséquente à l'augmentation de l'expression de Cul5 via l'activation anormale de mTORC1 (Moon et al., 2015) (Figure 43). L'inhibition de l'activité de mTORC1 entraine un retour à un niveau d'expression normal de Dab1 phosphorylée et Cul5 et sauve le phénotype de migration neuronale observé chez les souris KO conditionnelles pour *Tsc2*. Ces résultats semblent donc indiquer que l'ubiquitine ligase Cul5 est un régulateur clé du couplage entre les voies de signalisations Reelin-Dab1 et mTOR dans la pathogenèse des scléroses tubéreuses complexes.

En parallèle, il est intéressant de noter que CUL4B, une autre protéine de la famille des Cullin E3 ubiquitine ligase, serait également un régulateur de la signalisation mTORC1 et que des mutations dans CUL4B sont associées à des malformations du développement cortical chez l'homme, ce qui renforce l'importance des ubiquitines ligases dans le développement cortical (Vulto-van Silfhout et al., 2015).

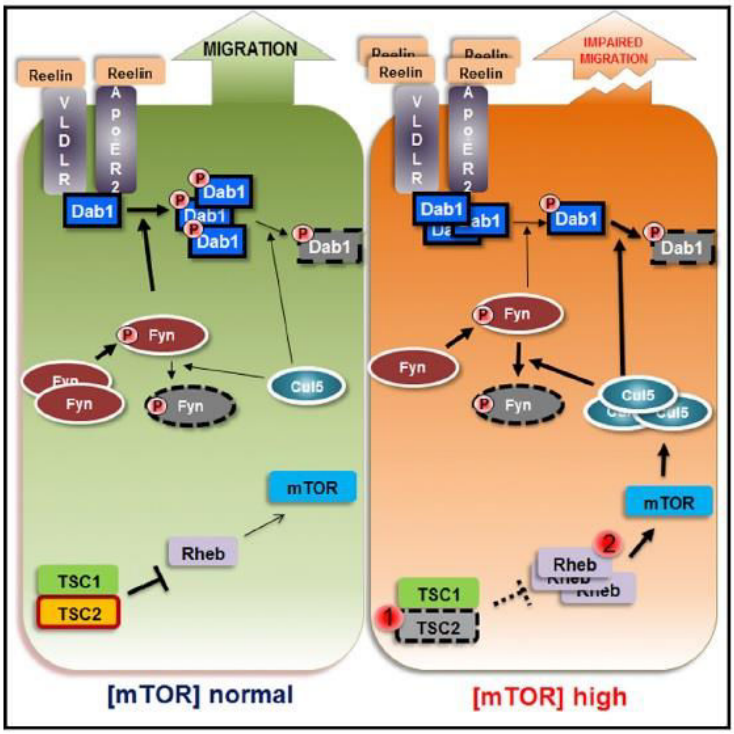


Figure 43 : La dérégulation de la signalisation Reelin-Dab1 souligne les défauts de migration neuronale des scléroses tubéreuses complexes.

La délétion de TSC2, qui est retrouvée mutée chez des patients atteints de scléroses tubéreuses complexes, dans les neurones en migration entraine un retard de la migration associé à des défauts au niveau du processus antérieur. Ce défaut de migration est conséquent à une dérégulation de la voie de signalisation Reelin-Dab1. En effet, l'absence de Tsc2 dans les cortex de souris est accompagnée d'une augmentation du niveau de Reelin et de Dab1. Cependant, le niveau de Dab1 phosphorylée est fortement réduit suite à l'augmentation de l'expression de la E3 ubiquitine ligase Cul5 via l'activation aberrante de la voie mTORC1. (D'après Moon et al. 2015)

La Reelin est décrite pour exercer un effet sur la migration neuronale et la dynamique des processus dendritiques par l'activation de mTOR via l'activation de Akt et PI3K, ce qui laisse suggérer que l'activation de mTOR pourrait participer au processus de migration neuronale via un mécanisme de régulation négative de Cul5 afin de contrôler le niveau de Dab1 phosphorylée (Jossin and Goffinet, 2007). De manière cohérente, il est montré que l'activation de mTOR induit un défaut de positionnement des neurones associé à une augmentation de la taille du corps cellulaire des neurones en migration (Kassai et al., 2014). De plus, des mutations dans le gène *mTOR* ont été retrouvées chez des patients présentant des malformations du développement cortical focales (hémimégalencéphalie et dysplasie corticale focale de type II) avec comme principale caractéristique une sur-activation de la voie mTORC1 (Lee et al., 2012b; Lim et al., 2015; Mirzaa et al., 2016; Nakashima et al., 2015).

2.4.6 Rab, Arf et le trafic membranaire intracellulaire

Comme nous l'avons évoqué à plusieurs reprises, la famille des petites GTPases et en particulier les Rho GTPases telles que Rac1 et Cdc42 sont impliquées dans plusieurs processus cruciaux pour la migration neuronale en exerçant leurs fonctions via la régulation de la dynamique des filaments d'actine et des microtubules (Konno et al., 2005; Ridley, 2015). Un autre aspect de la régulation de la migration neuronale a récemment émergé et concerne la régulation du trafic membranaire intracellulaire au sein des neurones en migration. Chez les cellules eucaryotes mammifères, le trafic membranaire est principalement assuré par la famille des petites GTPases Rab et Arf et comme nous allons le voir maintenant ces protéines commencent à être impliquées dans le contrôle de la migration neuronale (Stenmark, 2009; Tang, 2016).

Le rôle des protéines Rab dans la migration neuronale radiaire a été souligné par une étude de Kawauchi et *coll* en 2010. Premièrement les auteurs examinent l'effet de l'expression d'une forme dominante négative de la dynamine, inhibant presque tous types d'endocytose, dans les neurones en migration et observent des défauts de migration neuronale indiquant un rôle crucial de l'endocytose dans ce processus. Ensuite, en utilisant la technique d'électroporation *in utero*, ils démontrent que l'endocytose dépendante de Rab5 (endocytose menant à plusieurs voies de recyclage) et de Rab11 (voie de recyclage lente via les endosomes) sont nécessaires à la migration et en particulier à la phase de locomotion mais pas l'endocytose dépendante de Rab4 (voie de recyclage directe à la membrane). De plus, ces résultats montrent que la voie de dégradation lysosomale dépendante de Rab7 est impliquée dans la phase finale de la translocation somatique plutôt que dans la locomotion. Le mécanisme général proposé pour rendre compte de ces effets est la régulation de la distribution et de la quantité de N-Cadhérine dans les neurones en migration. En effet, les suppressions de Rab5 et Rab11 sont généralement associées à une augmentation de la N-Cadhérine au niveau de la membrane et la suppression de Rab7 à une augmentation de la quantité cellulaire totale de la N-Cadhérine. L'ensemble de ces données révèle donc un rôle critique des différentes voies d'endocytoses dans différentes étapes de la migration neuronale (Kawauchi et al., 2010) (Figure 44).

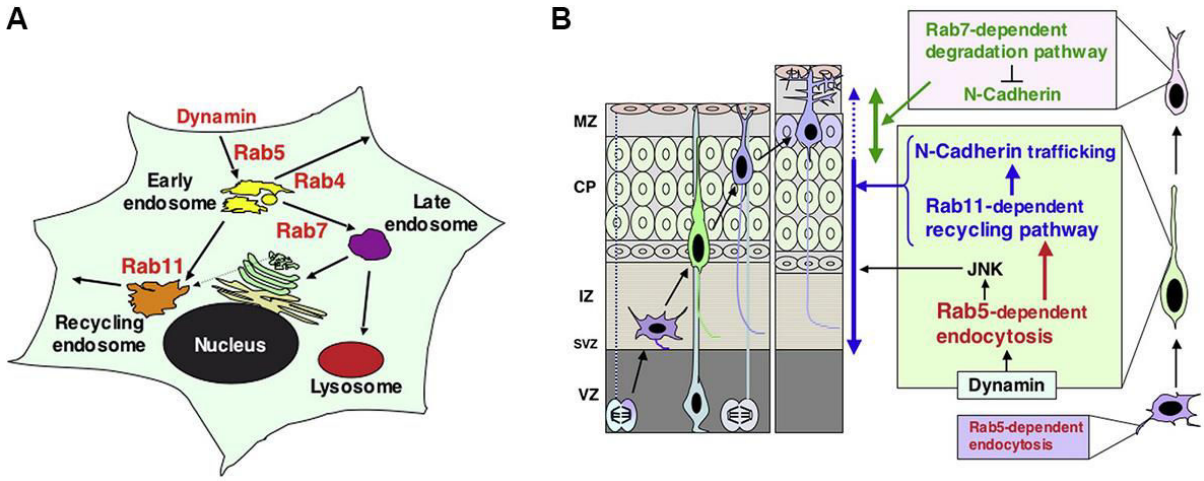


Figure 44 : Les voies d'endocytoses dépendantes des protéines Rab régulent la migration neuronale.

(A) Schéma récapitulatif des voies d'endocytoses dépendantes des protéines Rab. Rab5 régule l'endocytose et la dynamique des endosomes précoces. A partir des endosomes précoces, Rab4 permet le recyclage rapide à la membrane, Rab7 contrôle la dégradation dépendante du lysosome et Rab11 régule le recyclage lent via les endosomes. (B) Modèle de la régulation de la migration neuronale par les protéines Rab. Rab5 et Rab11 régulent le processus de locomotion et l'entrée dans la plaque corticale via le trafic intracellulaire de la N-Cadhérine tandis que Rab7 régule la phase terminale de la migration neuronale via la régulation de la dégradation de la N-Cadhérine dépendante du lysosome. (D'après Kawauchi et al. 2010).

Plus récemment, la petite GTPase Arf6 a également été décrite dans la migration neuronale via l'analyse du rôle de TBC1D24 (*Tre2/Bub2/Cdc16 domain family member 24*) (Falace et al., 2014). Le recyclage de membrane vers le compartiment endocytaire dépendant de Arf6 est impliqué dans de nombreux processus cellulaires tels que le mouvement cellulaire et la cytocinèse (Schweitzer et al., 2011). TBC1D24 est une protéine GAP (*GTPase-activating protein*) interagissant avec Arf6 afin de réguler sa fonction et est retrouvée mutée chez des patients avec des syndromes incluant des malformations corticales, des déficiences intellectuelles et des épilepsies (Falace et al., 2010; Frasa et al., 2012). Les auteurs ont montré que l'inhibition de l'expression de *Tbc1d24* par électroporation *in utero* entraine une dérégulation de la transition multipolaire-bipolaire dans la zone intermédiaire et donc une altération de la migration neuronale. La surexpression d'une forme dominante négative de Arf6 permet de sauver le phénotype de migration neuronale suggérant ainsi que le rôle de Tbc1d24 dans la migration neuronale s'exerce via le contrôle de l'activation de Arf6 (Falace et al., 2014).
L'ensemble de ces données mettent donc en avant l'importance du trafic membranaire dans la régulation de la migration neuronale

2.4.7 Le cil primaire

Comme nous l'avons déjà abordé précédemment, le cil primaire est un organite sensoriel permettant de réguler de nombreuses voies de signalisation dans le cortex en développement et de nombreuses études récentes impliquent le cil primaire dans la régulation de la neurogenèse. Cependant, son rôle

durant le processus de migration neuronale radiaire reste encore très peu étudié et les principales données proviennent de deux études sur le rôle du cil primaire dans la migration tangentielle des interneurones. La première étude montre que le cil primaire joue un rôle dans le guidage de la migration et le placement des interneurones dans le cortex en développement et que l'expression de mutant de Arl13b (une petite GTPase de la famille des Arf/Arl localisée spécifiquement dans le cil primaire) responsable du syndrome de Joubert (caractérisé par une malformation du tronc cérébral et une agénésie ou une hypoplasie du vermis cérébelleux) induit des défauts de la migration neuronale (Higginbotham et al., 2012). De manière similaire, Baudoin et *coll* ont démontré que le cil primaire présent à la membrane des interneurones des éminences ganglionnaires médianes favorise les changements directionnels nécessaires à leur ciblage au niveau du cortex via la signalisation Shh (Baudoin et al., 2012). Concernant la migration radiaire, il est intéressant de noter l'étude de Guo et *coll* en 2014 qui a consisté à évaluer les conséquences de l'ARN interférence de très nombreux gènes responsables de ciliopathies, connues pour causer des troubles neurologiques, sur les principales étapes du développement cortical dont la migration radiaire (Guo et al., 2015) (Figure 45). De manière intéressante, ces résultats montrent que 17 gènes sur les 30 sélectionnés modulent différentes phases de la migration radiaire, telles que la régulation de la dynamique du processus antérieur et la transition multipolaire-bipolaire, soulignant ainsi le rôle crucial du cil primaire dans ce processus (Guo et al., 2015). De manière intéressante, l'ARN interférence de *AHI1 (Abelson helper integration site 1)* et de plusieurs *BBS* (*Bardet-Biedl syndrome*) induisent des défauts de la migration neuronale, ce qui apporte des informations sur les mécanismes physiopathologiques soulignant les hétérotopies corticales et les polymicrogyries présentes chez des patients portant des mutations dans les gènes *AHI1* et *BBS* (Dixon-Salazar et al., 2004; Guo et al., 2015; Rooryck et al., 2007).

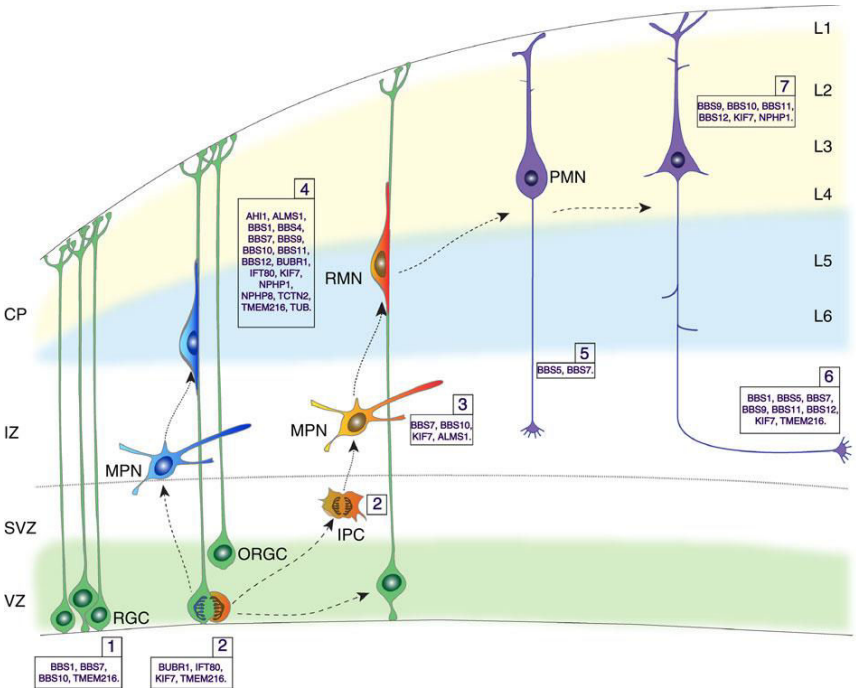


Figure 45 : Les gènes associés à des ciliopathies et le développement cortical.

Schéma des étapes majeures du développement cortical. (1) Organisation et polarisation des cellules gliales radiaires. (2) Prolifération des cellules gliales radiaires et des progéniteurs intermédiaires. (3) Transition multipolaire-bipolaire des neurones. (4) Locomotion des neurones sur les fibres des cellules gliales radiaires. (5) Croissance axonale. (6) Guidage axonal. (7) Dendritogenèse. Les gènes identifiés dans des ciliopathies sont indiqués selon leurs rôles supposés dans les différentes étapes du développement cortical. (D'après Guo et al. 2015)

2.4.8 Les régulations épigénétiques et post-transcriptionnelles

a. Mécanismes épigénétiques

L'importance des mécanismes épigénétiques dans la migration radiaire a récemment émergé. Par exemple, la nitrosation de HDAC2 (*Histone deacetylase 2*) a été impliquée dans la régulation de la migration radiaire via le contrôle de l'expression d'une sous-unité d'un complexe de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP (Nott et al., 2013). Un autre exemple correspond à la protéine CoREST, qui est un composant co-répresseur d'un système de remodelage de la chromatine et qui régule l'expression de gènes durant le développement. En effet, la déplétion de CoREST durant le développement cortical entraine un retard dans la transition d'une morphologie multipolaire vers une morphologie bipolaire au début de la migration neuronale et cet effet est dû à la perte d'interaction entre CoREST et l'histone déméthylase LSD1 (*lysine (K)-specific demethylase 1A*) (Fuentes et al., 2012). Finalement, une étude montre que la méthyltransférase Ezh2 (*Enhancer of zest homolog 2*), qui est un membre du complexe répresseur PRC2 (*Polycomb repressive complex 2*) responsable de la tri-méthylation de l'histone H3 sur le résidu lysine 27 (H3K27me3), est essentielle pour l'orientation

correcte des neurones en migration (Zhao et al., 2015). Dans cette étude, les auteurs proposent que Ezh2 régule négativement l'expression de la Reelin en se liant à son promoteur.

b. Les régulations post-transcriptionnelles

b-1 Les microARN

Les microARN (miARN) correspondent à une classe d'ARN courts (une vingtaine de nucléotides après les processus de maturation) simples brins et non codants qui permettent de nombreuses régulations post-transcriptionnelles en induisant la dégradation de leurs ARN cibles ou en affectant l'efficacité de traduction. Les miARN sont maintenant largement décrits pour réguler l'ensemble des étapes essentielles pour le développement cortical (Davis et al., 2008). Il n'est donc pas surprenant que les études des souris KO pour *Dicer* (une ribonucléase de classe III impliquée dans la maturation des miARN) suggèrent des altérations dans l'ensemble des processus de la corticogenèse et en particulier dans la neurogenèse (Davis et al., 2008; Kawase-Koga et al., 2009). Cependant, ce n'est que récemment que plusieurs études impliquent les miARN directement dans le processus de migration. En particulier, Volvert et *coll* ont montré que les miARN miR-22 et miR-124 régulent la dynamique de la transition de morphologie bipolaire-multipolaire et la polarisation des neurones nécessaires à la locomotion le long des fibres des cellules gliales radiaires (Volvert et al., 2014). Cette régulation s'exerce par contrôle de l'expression de DCX via le complexe de répression transcriptionnel CoREST/REST (Volvert et al. 2014) (Figure 46). De plus, une autre étude montre que les miARN miR369-3p, miR496 et miR543 régule la locomotion des neurones via le contrôle de l'expression de la N-Cadhérine, laquelle est nécessaire au cours de la migration en permettant l'interaction entre les neurones et les fibres des cellules gliales radiaires (Rago et al., 2014; Shikanai et al., 2011).

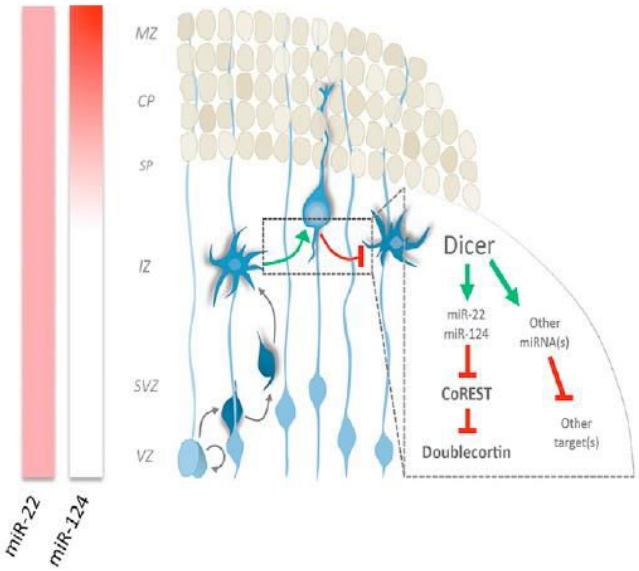


Figure 46 : Le ciblage de CoREST par les microARN régule la polarisation des neurones corticaux en migration.

Les microARN miR-22 et miR-124, qui sont exprimés respectivement dans l'ensemble des zones du cortex et principalement dans la plaque corticale, contrôlent l'expression des composants du complexe de répression transcriptionnelle CoREST/REST dans les neurones en migration. Ce ciblage de CoREST par les microARN est critique pour promouvoir la dynamique de transition multipolaire/bipolaire à l'initiation de la migration (flèche verte dans l'encadré) et à la stabilisation de la morphologie bipolaire durant la migration (trait rouge dans l'encadré), via le contrôle de l'expression de la protéine associée aux microtubules DCX. (D'après Volvert et al. 2014)

b-2 L'épissage alternatif

L'épissage alternatif de l'ARN est un processus post-transcriptionnel essentiel qui entre en jeu dans la régulation de plus de 90% des gènes humains mais son rôle dans la migration neuronale est très peu étudié (Wang et al., 2008). Cependant, une étude a mis en évidence le rôle crucial joué par l'épissage alternatif dans la migration neuronale. En effet, Yano et *coll* ont montré que les défauts de lamination corticale observés chez la souris KO pour Nova2 (*Neuro-oncological ventral antigen 2*), qui est une protéine de liaison à l'ARN régulant l'épissage, sont conséquents à une altération de l'épissage alternatif de Dab1 (Yano et al., 2010) (Figure 47).

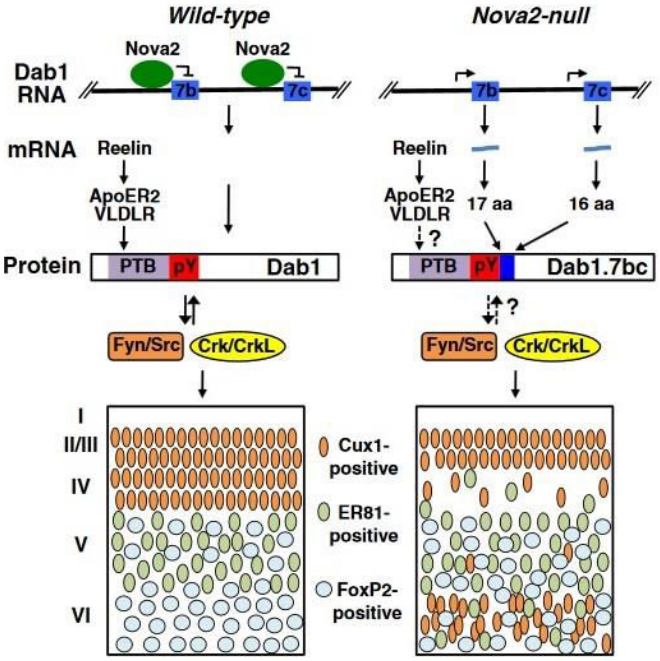


Figure 47 : La régulation de la migration neuronale par épissage alternatif de Dab1.

Dans les souris sauvages (Wild-type), la protéine de liaison à l'ARN Nova2 se lie aux motifs YCAY directement en amont des exons 7b et 7c de Dab1, ce qui mène à l'épissage de ces exons. Dans les souris KO pour Nova2, les exons 7b et 7c sont incorporés dans l'ARNm, entrainant l'addition de 33 acides aminés juxtaposés au résidu phosphotyrosine. L'expression de ce variant pourrait perturber la signalisation Reelin en amont via ApoER2 ou VLDLR ou en aval via l'adaptateur Crk ou les kinases Fyn/Src. La régulation de l'épissage de Dab1/Dab1.7bc dépendante de Nova2 est capable d'induire une permutation entre un état capable de répondre à la signalisation Reelin et un état incapable d'y répondre, régulant ainsi la lamination corticale. (D'après Park & Curran 2010; Yano et al. 2010)

Plus récemment, afin de mieux comprendre le rôle de l'épissage alternatif dans le destin cellulaire des progéniteurs neuronaux, Zhang et *coll* ont comparé les résultats du séquençage de l'ARN des progéniteurs et des neurones purifiés à partir de cortex en développement (Zhang et al., 2016). Ces analyses ont révélé que le processus d'épissage alternatif régule préférentiellement des gènes codant pour des protéines du cytosquelette qui sont retrouvées mutées dans des maladies neurodéveloppementales. Le destin neuronal et l'inclusion d'exons spécifiques des neurones sont régulés de manière antagoniste par les protéines de liaison à l'ARN Ptb1 (*Polypyrimidine tract-binding protein 1*) et Rbfox1/2/3 (*RNA Binding Protein, Fox-1 Homolog*), lesquelles sont exprimées respectivement dans les progéniteurs et les neurones. L'épissage alternatif régulé par Rbfox1/2/3 permet à la Ninein d'être délocalisée du centrosome dans les neurones tandis que l'expression de Ptbp1 est requise pour l'adhésion apicale des cellules gliales radiaires via le maintien de l'expression de Filamin a et b dans les progéniteurs.

3. Mise en place des connectivités par croissance et guidage axonal

3.1 Généralités

La fonction du cortex cérébral repose sur les nombreuses connexions longues distances mises en place par les neurones pyramidaux, ou de projection, des différentes couches du cortex.
Les trois classes majeures de neurones de projection, classés selon leur position au sein des différentes couches du cortex et des structures sur laquelle ils projettent leur axone, sont les neurones à projection calleuse, les neurones corticothalamiques et les neurones à projection sous-corticale (Leyva-Díaz and López-Bendito, 2013; Molyneaux et al., 2007) (Figure 48).

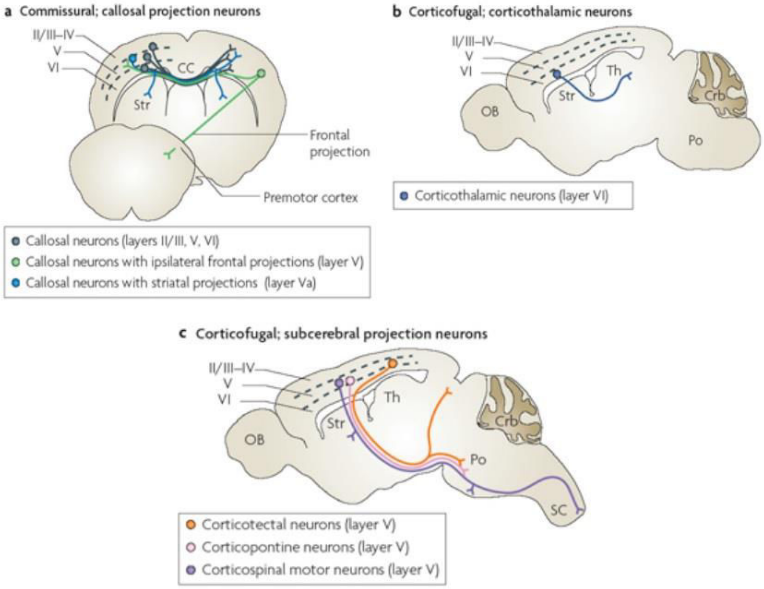


Figure 48 : Les Principaux types de neurones de projection du cortex en développement.

(D'après Molyneaux et al. 2007)

Les neurones à projection calleuse projettent leur axone soit vers d'autres neurones du même hémisphère (connexions ipsilatérales), soit vers les neurones de l'hémisphère opposé en passant par le corps calleux (connexions calleuses). Les projections calleuses proviennent des neurones occupant les couches corticales II/III (environ 80% chez les rongeurs), la couche V (environ 20%) et très peu de la couche VI (Leyva-Díaz and López-Bendito, 2013). Le corps calleux correspond donc à un large faisceau d'axones permettant l'intégration des informations sensorielles, motrices et cognitives entre

les deux hémisphères. Bien que les mécanismes physiopathologiques soient encore inconnus, l'agénésie du corps calleux chez l'homme est soit asymptomatique, soit associée à de nombreux syndromes neurologiques avec divers symptômes, incluant des défauts du langage, des déficits de l'attention, de l'hyperactivité ou des difficultés d'apprentissage (Paul et al., 2007).

Les communications entre les différentes aires du cortex et le thalamus se font via les projections axonales des neurones corticothalamiques occupant principalement la couche corticale profonde VI. Les faisceaux axonaux provenant des neurones corticothalamiques associés aux projections corticales des neurones thalamiques contribuent à la formation d'une des plus grande voie axonale du subpallium, la capsule interne.

Les neurones à projection sous-corticale sont des neurones situés dans la couche corticale V et projettent leur axone au niveau du tronc cérébral et de la moelle épinière. Parmi eux, les neurones corticopontiques émettent des axones directement dans les pons, les neurones corticotectaux projettent au niveau des colliculi et des pons et les neurones moteurs corticospinaux de l'aire sensorimotrice du cortex permettent d'établir des connexions avec la moelle épinière (Molyneaux et al., 2007).

Les neurones pyramidaux peuvent être également classés selon leur profil d'expression différentiel de facteurs de transcription. En effet, un grand nombre de facteurs de transcription exprimés spécifiquement par certaines couches de neurones et nécessaires à leur spécification ont été mis en évidence durant ces dernières années (Molyneaux et al., 2007). A titre d'exemple, le facteur de transcription Satb2 (*Special AT-rich sequence-binding protein 2*) est exprimé principalement dans les neurones des couches II-IV et est un régulateur clé de la spécification des neurones à projection calleuse (Alcamo et al., 2008; Britanova et al., 2008). Les facteurs de transcription Ctip2 (*COUP-TF interacting protein 2*) et Tbr1 (*T-box, brain 1*) sont essentiels pour la spécification en neurones à projection sous-corticale et corticothalamique respectivement (Arlotta et al., 2005; Hevner et al., 2001). Il existe de nombreuses interactions entre ces différents facteurs de transcription permettant l'établissement de l'identité des neurones de projection (Figure 49).

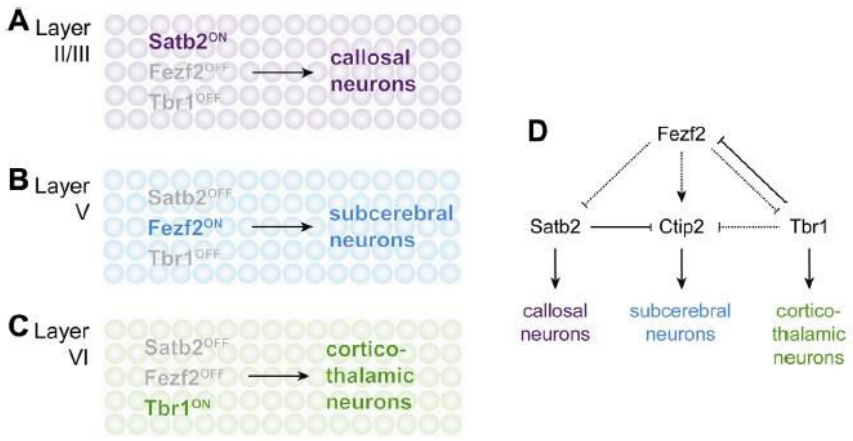


Figure 49 : Interactions entre les principaux facteurs de transcription clés régulant la différenciation des neurones corticaux.

(D'après Leyva-Díaz & López-Bendito 2013)

3.2 Mécanismes cellulaires et moléculaires de la croissance axonale

Les neurones pyramidaux en migration émettent un processus postérieur dirigé vers le ventricule et un processus antérieur dirigé vers la surface du cortex qui vont respectivement devenir par la suite les futurs axones et dendrites (Figure 50).

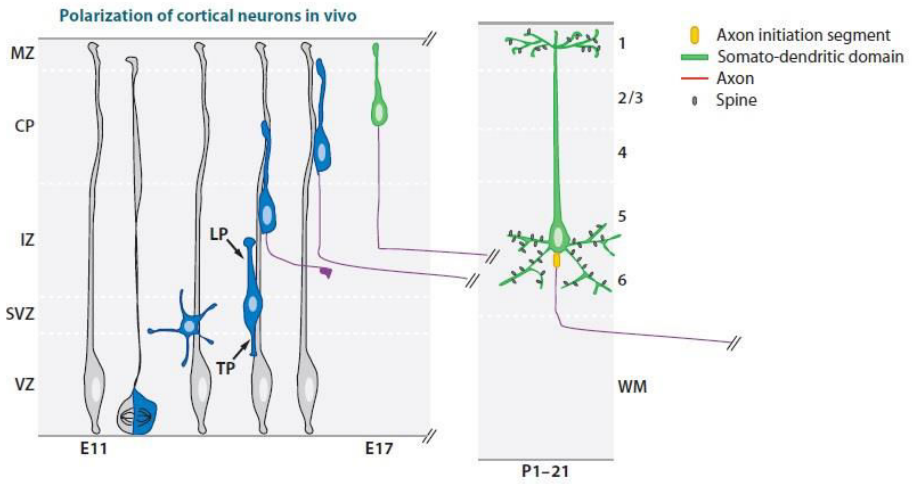


Figure 50 : Mise en place de la polarité neuronale durant le développement cortical.

Durant le développement cortical, les neurones nouvellement générés transitent par la zone intermédiaire où ils émettent de multiples neurites immatures et adoptent une morphologie multipolaire avant qu'un neurite majeur se forme de manière radiaire et devienne le processus antérieur (En anglais : *Leading process*, LP). Ces neurones adoptent ensuite une morphologie bipolaire qui leur permet de s'engager dans le processus de migration radiaire. Pendant la migration radiaire, les neurones migrant de manière radiaire le long des fibres de la glie radiaire laissent émerger un processus postérieur (En anglais : *Trailing process*, TP), lequel s'allonge de manière tangentielle dans la zone intermédiaire et formera par la suite l'axone (violet). (D'après Barnes & Polleux 2009).

Après cette étape de spécification, la croissance de l'axone, qui est intimement liée à son guidage, peut avoir lieu afin de contacter les différentes cibles des neurones pyramidaux. Nous allons nous intéresser dans cette partie à la régulation de la dynamique du cytosquelette permettant cette élongation.

La croissance de l'axone au niveau du cône de croissance est le produit de l'intégration de deux forces : le transport axonal lent et la polymérisation des microtubules produisent une force permettant la pousse axonale qui est combinée à une dynamique des filaments d'actine au niveau de la périphérie du cône de croissance (Letourneau et al., 1987; Suter and Miller, 2011) (Figure 51).

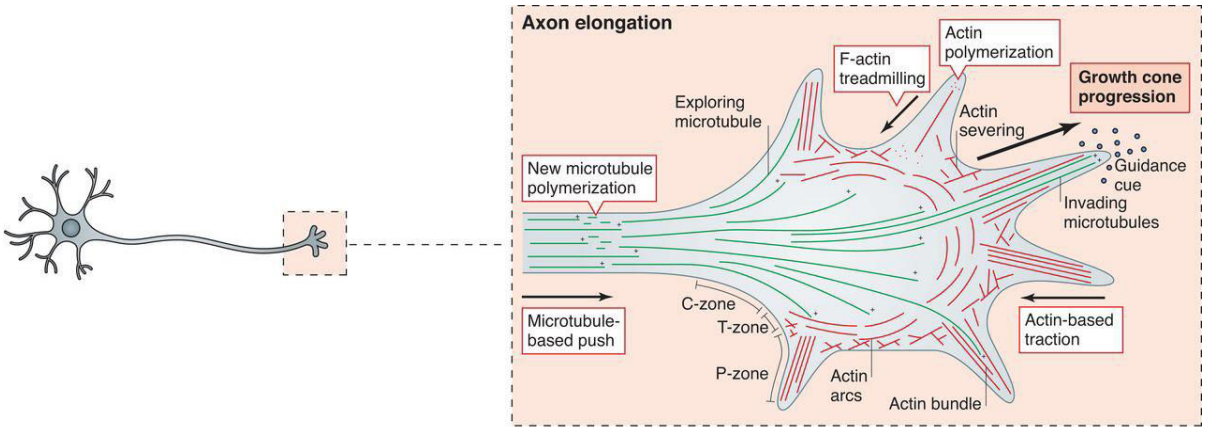


Figure 51 : Les réorganisations du cytosquelette intervenant durant l'élongation axonale.

Les microtubules provenant de l'axone se dispersent dans la zone centrale de l'axone (C-zone). Quelques microtubules passent à travers la zone de transition (T-zone), contenant le réseau de F-actine, pour atteindre les filopodes de la zone périphérique (P-zone). La stimulation par des facteurs extracellulaires entraine la stabilisation et l'entrée massive des microtubules dans la zone périphérique où ils vont produire une force de poussée qui se combine à la force de traction provenant de l'actine, fournissant les forces nécessaires à l'extension du cône de croissance. (D'après Lewis et al. 2013)

Bien que les dynamiques coordonnées des microtubules et des filaments d'actine soient nécessaires à la fonction du cône de croissance, il a été montré que des molécules perturbant le cytosquelette d'actine avaient des effets limités sur l'élongation de l'axone et que l'actine était plutôt essentiel pour le guidage *in vitro* et *in vivo* (Bentley and Toroian-Raymond, 1986; Marsh and Letourneau, 1984). Au contraire de l'actine, la polymérisation des microtubules est requise pour l'élongation de l'axone (Letourneau et al., 1987). Les protéines axonales et les éléments du cytosquelette sont transportés le long de l'axone via le transport axonal lent dépendant des moteurs moléculaires associés aux microtubules (Xia et al., 2003; Yabe et al., 1999). De ce fait, la perturbation du transport axonal lent des tubulines altère la force produit par la polymérisation des microtubules permettant la pousse axonale et dérégule l'élongation (Suter and Miller, 2011). Il n'est pas non plus surprenant que de nombreuses études ont révélé l'importance des protéines associées aux extrémités (+) en croissance des microtubules (+TIPs), telles que les familles de protéines CLIP (*Cytoplasmic-linker protein*) et EB (*end-binding protein*), dans la motilité du cône de croissance suite à la réponse à des signaux extracellulaires (Lowery and Van Vactor, 2009). Les +TIPs de la famille CLIP interagissent avec APC

(Adenomatous polyposis coli) afin de contrôler l'activité de GSK3β, qui est connue pour réguler la dynamique des microtubules et le guidage de l'axone via la voie Wnt (Ciani et al., 2004; Lucas et al., 1998; Zhou et al., 2004). Il a aussi été montré que les CLIP se lient avec IQGAP, laquelle permet la régulation de la dynamique des filaments d'actine par le ciblage des GTPases Rac1/Cdc42 au niveau du cône de croissance (Fukata et al., 2002; Kholmanskikh et al., 2006). KIF2A est un autre exemple proche des +TIPs régulant la dynamique de l'extrémité (+) via son activité microtubule dépolymérase (Desai et al., 1999). Homma et *coll* ont étudié la souris KO pour *Kif2a* et ont observé une dérégulation des ramifications de l'axone qui est conséquente à une surextension des ramifications collatérales. Les auteurs suggèrent que KIF2A dépolymérise les microtubules au niveau de la bordure du cône de croissance permettant l'élongation et le guidage de l'axone vers sa cible en supprimant l'apparition de ramifications axonales collatérales (Homma et al., 2003) (Figure 52).

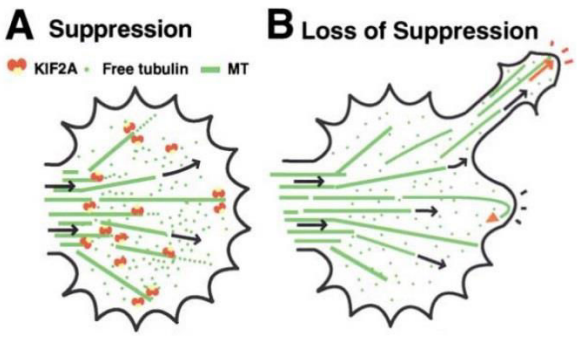


Figure 52 : Modèle du rôle de KIF2A dans la suppression des branchements collatéraux de l'axone.

(A-B) Schéma de la dynamique des microtubules dans le cône de croissance. (A) En présence de KIF2A, l'extension du cône de croissance est contrôlée par le maintien à l'équilibre entre polymérisation et dépolymérisation des microtubules par KIF2A, en particulier à l'extrémité du cône de croissance. (B) Dans les neurones KO pour la microtubule dépolymérase KIF2A, la polymérisation des microtubules se déroule de manière incontrôlée au niveau des extrémités (+), ce qui entraine une force de poussée au niveau de la membrane et la formation d'un branchement collatéral (flèche rouge). (D'après Homma et al. 2003)

3.3 Mécanismes de guidage axonal

Les axones, via leur cône de croissance, naviguent sur de très longues distances afin d'atteindre la structure cible. Le guidage axonal repose principalement sur quatre types de mécanismes : l'attraction de contact, la chimio-attraction, la répulsion de contact et la chimio-répulsion (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996) (Figure 53). Ces signaux extracellulaires entrainent une combinaison d'effets attractifs et répulsifs médiés par la réorganisation du cytosquelette d'actine et des microtubules.

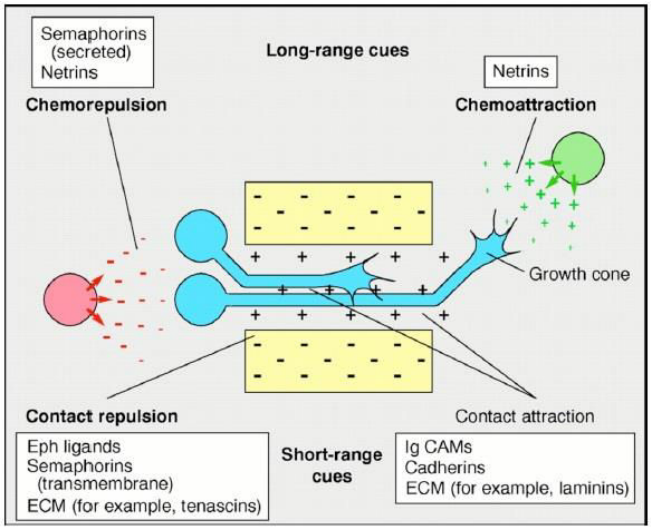


Figure 53 : Schéma récapitulatif des principaux processus de régulation du guidage axonal.

(D'après Tessier-Lavigne & Goodman 1996)

A titre d'exemple, la traversée de la ligne médiane (entre les deux hémisphères) par les axones des neurones à projection calleuse fait intervenir une combinaison de couples ligands/récepteurs, tels que Nétrine/DCC et Slit/Robo, permettant le contrôle de la traversée via leurs effets attractifs et répulsifs respectivement (Chilton, 2006; Dickson and Gilestro, 2006) (Figure 54).

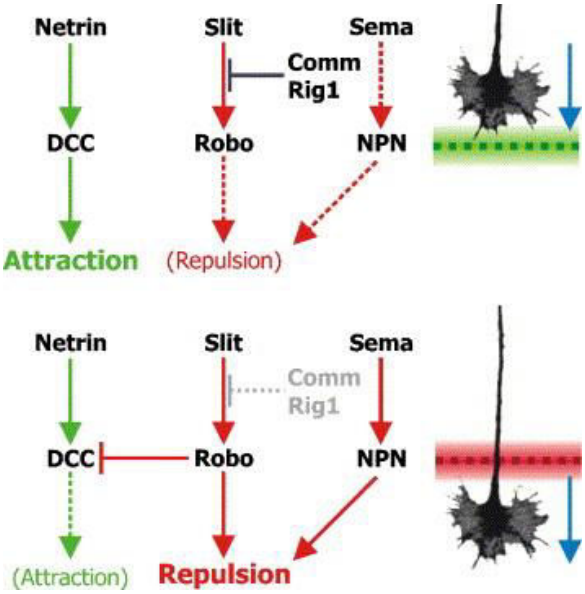


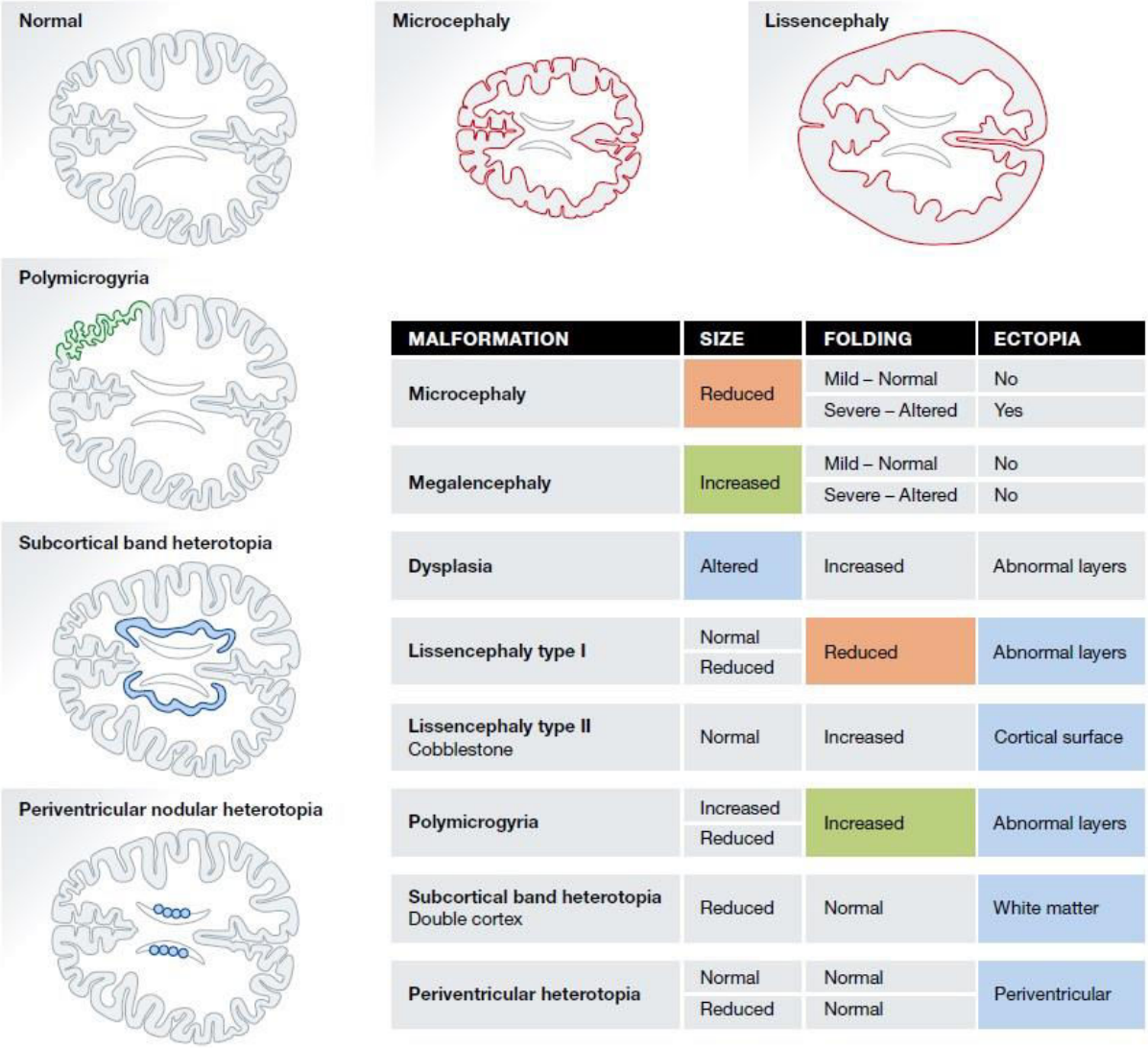
Figure 54 : Modèle de régulation de la traversée de la ligne médiane par les axones commissuraux.

Différentes combinaisons de couples ligand/récepteur régulent la traversée de la ligne médiane. A mesure que le cône de croissance (gris) se rapproche de la ligne médiane (partie haute), la nétrine se lie à DCC, ce qui exerce un effet attractif pour le cône de croissance tandis que l'effet répulsif du couple Slit/Robo est réprimé par Rig1. La ligne médiane correspond donc à un signal attractif (pointillés verts). Après le passage de la ligne médiane (partie basse), l'expression de Rig1 est diminuée, ce qui permet l'activation du couple Slit/Robo. De plus, Robo inhibe le signal attractif provenant de DCC. La ligne médiane devient donc un signal répulsif pour le cône de croissance (pointillés rouges), ce qui permet sa croissance au-delà de la ligne médiane. (D'après Chilton 2006)

B. Malformations du développement cortical

1. Généralités

Comme nous avons pu le voir jusqu'à maintenant, le développement du cortex cérébral correspond à un ensemble de processus complexes et finement régulés. La perturbation de l'un ou de plusieurs de ces processus peut mener à une grande variété de troubles du développement. La majorité de ces troubles du développement sont à l'origine de nombreuses malformations chez l'homme reconnaissables par imagerie cérébrale et qui ont donc été désignées comme des malformations du développement cortical (MDC). Les MDC sont une cause commune de déficiences intellectuelles et d'épilepsies sévères. Plusieurs classifications des MDC ont été proposées au cours des dernières années, reposant sur les caractéristiques neuro-anatomiques, génétiques et plus récemment physiopathologiques grâce, entre autre, à l'apport des modèles rongeurs KO ou KI et de la technique d'électroporation *in utero* (Barkovich et al., 2012). Cette dernière consiste à classer les MDC selon la principale étape du développement altéré et comprend donc trois groupes majeurs que sont les anomalies de la prolifération des progéniteurs neuronaux, de la migration neuronale et de l'organisation des couches corticales. Cependant, il n'existe pas encore de classification idéale, ce qui a été mis en avant récemment par de nombreuses découvertes suggérant une grande hétérogénéité de malformations corticales associées à des mutations dans un même gène (tels que *WDR62*, *DYNC1H1* ou *TUBG1*) (Bilgüvar et al., 2010; Nicholas et al., 2010; Poirier et al., 2013; Yu et al., 2010). La figure 57, qui correspond à un schéma récapitulatif (non exhaustif) des gènes associés à des MDC en fonction des principaux processus de la corticogenèse, permet d'apprécier cette hétérogénéité. Dans cette partie, nous allons tenter de présenter brièvement les différentes MDC selon la principale caractéristique de la malformation, c'est-à-dire la taille du cerveau, la gyration corticale et les ectopies (Figure 55).



MALFORMATION	SIZE	FOLDING	ECTOPIA
Microcephaly	Reduced	Mild – Normal	No
		Severe – Altered	Yes
Megalencephaly	Increased	Mild – Normal	No
		Severe – Altered	No
Dysplasia	Altered	Increased	Abnormal layers
Lissencephaly type I	Normal	Reduced	Abnormal layers
	Reduced		
Lissencephaly type II Cobblestone	Normal	Increased	Cortical surface
Polymicrogyria	Increased	Increased	Abnormal layers
	Reduced		
Subcortical band heterotopia Double cortex	Reduced	Normal	White matter
Periventricular heterotopia	Normal	Normal	Periventricular
	Reduced	Normal	

Figure 55 : Les différentes malformations du développement cortical et leur phénotype associé.

Il est important de noter que certaines de ces malformations sont associées à des anomalies d'autres structures telles que le cervelet, le corps calleux, le tronc cérébral et les ganglions de la base. (D'après Fernández et al. 2016)

2. Anomalies de la taille du cerveau

2.1 Microcéphalie

La microcéphalie est une maladie neurodéveloppementale caractérisée par un périmètre crânien réduit d'au moins 2,5 à 3 écarts-types par rapport à la mesure moyenne (Gilmore and Walsh, 2013). Les microcéphalies sont dans de nombreux cas également associées à des altérations de la gyration corticale (Adachi et al., 2011; Bilgüvar et al., 2010; Yu et al., 2010). La majorité des gènes connus pour être responsables de microcéphalies sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires liés à la prolifération des progéniteurs neuronaux et la balance entre divisions symétriques/asymétriques, ce

qui a pour conséquence finale une forte diminution de la production de neurones matures (Alcantara and O'Driscoll, 2014; Thornton and Woods, 2009). Les principaux processus cellulaires et gènes associés sont les suivants : la maturation du centrosome (*CDK5RAP2, CENPJ, STIL, NDE1*), la progression du cycle cellulaire (*MCPH1, CENPJ, CDK5RAP2, WDR62*), la réparation de l'ADN (*MCPH1, PCNT*) et l'orientation du fuseau mitotique (*WDR62, NDE1, ASPM, MCPH1*) (Alcantara and O'Driscoll, 2014; Bizzotto and Francis, 2015; Thornton and Woods, 2009). L'ensemble de ces processus cellulaires étant finement liés et chevauchant durant le développement cortical, il n'est donc pas surprenant que les mutations dans un gène soient décrites pour perturber plusieurs de ces processus. Il est intéressant de noter qu'en plus de la perte de capacité proliférative des progéniteurs, la diminution du nombre de neurones matures dans le cortex est également expliquée par l'induction de la mort cellulaire par apoptose. En effet, des mutations dans les gènes *TUBB* et *WDR62* provoquent un défaut dans la progression mitotique induisant l'apoptose dépendante de p53 et finalement la réduction du pool de progéniteurs (Breuss et al., 2016; Chen et al., 2014).

2.2 Mégalencéphalie

Le terme de mégalencéphalie se réfère à un cerveau d'une taille anormalement élevée qui excède la mesure moyenne de 2 écarts-types. Cette augmentation de la taille du cerveau est souvent reliée à une production excessive de progéniteurs neuronaux et de neurones matures qui est due à une diminution de l'apoptose ou un raccourcissement du cycle cellulaire (Barkovich et al., 2012; Dehay and Kennedy, 2007). Une des raisons pour lesquelles les causes génétiques des mégalencéphalies restent encore très peu définies vient du fait qu'elles sont retrouvées fréquemment associées avec d'autres malformations. En effet, les mégalencéphalies sont par exemple retrouvées en combinaison avec d'autres défauts du développement dans des syndromes tels que macrocéphalie – malformation capillaire (MCAP) et mégalencéphalie-polymicrogyrie-polydactylie postaxiale-hydrocéphalie (MPPH) (Mirzaa et al., 2012). Cependant des avancées ont été réalisées récemment suite à l'identification de mutations somatiques dans les membres de la voie PI3K-AKT-mTOR chez des patients atteints d'hémimégalencéphalie (Lee et al., 2012a; Poduri et al., 2012; Rivière et al., 2012) (Figure 56). L'hémimégalencéphalie (parfois nommée mégalencéphalie dysplasique) est caractérisée par une croissance excessive de seulement un des deux hémisphères du cerveau et est responsable d'épilepsies sévères.

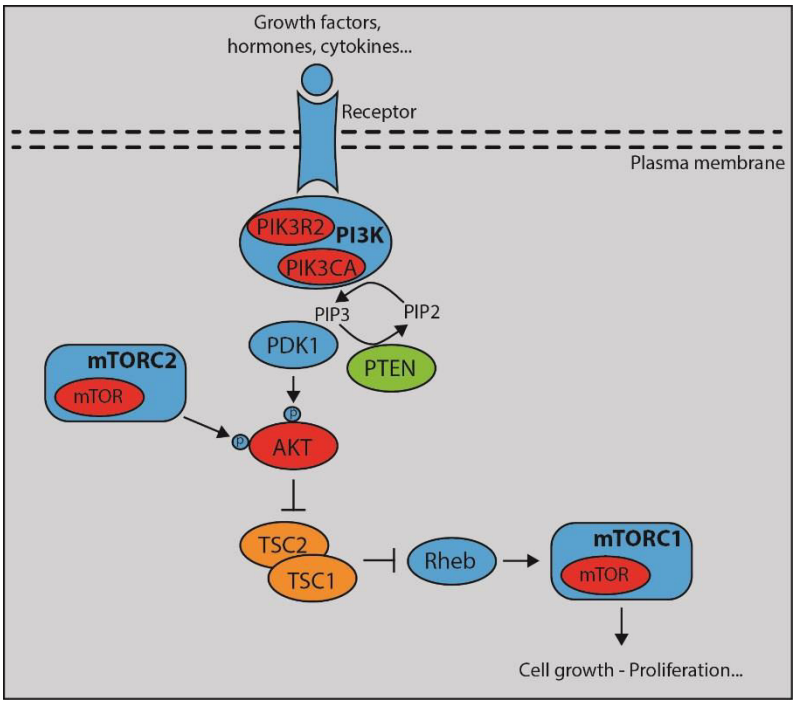


Figure 56 : Protéines de la voie PI3K-AKT-mTOR identifiées dans les malformations du développement cortical.

Schéma représentatif des principales protéines de la voie PI3K-AKT-mTOR. Les protéines mTOR (faisant parties du complexe mTORC1 et mTORC2), AKT et les sous-unités de PI3K, PIK3R2 et PIK3CA, sont codées par des gènes impliqués dans des hémimégalencéphalies et sont colorées en rouge. Les protéines TSC1 et TSC2 sont codées par des gènes impliqués dans la sclérose tubéreuse complexe (le cerveau présente un phénotype comparable à des dysplasies corticales focales) et sont indiquées en orange tandis que la protéine PTEN dont le gène a été identifié dans un cas de dysplasie corticale focale, est indiquée en verte.

3. Anomalies de la gyration corticale

3.1 Lissencéphalie classique et hétérotopie laminaire sous-corticale

Les lissencéphalies incluent un spectre de malformations caractérisées par une absence de la gyration (agyrie), une diminution de la gyration (pachygyrie) ou des hétérotopies laminaires sous-corticales (présence de neurones hétérotopiques en organisation laminaire entre le cortex et les ventricules latéraux). Ces malformations sont reconnaissables par l'aspect lisse du cerveau et l'augmentation de l'épaisseur du cortex qui est causée par un défaut de la migration neuronale résultant en une désorganisation au sein du cortex et une perte de la structure laminaire. Il y a 20 ans, le gène *LIS1* fut le premier gène impliqué dans les lissencéphalies puis 5 ans plus tard le gène *DCX* fut identifié et la majorité des cas de lissencéphalies a été attribuée à des mutations dans ces deux gènes codant pour des protéines de régulation du cytosquelette de microtubules (Gleeson et al., 1998; Pilz et al., 1998; Des Portes et al., 1998; Reiner et al., 1993). Plus récemment, les gènes codant pour TUBA1A, KIF2A, TUBG1 et DYNC1H1 ont également été identifiés chez des patients présentant un large spectre de

lissencéphalies renforçant davantage l'importance du réseau de microtubules et de ses protéines associées dans le processus de migration neuronale et dans la pathogenèse des lissencéphalies (Keays et al., 2007; Poirier et al., 2013).

3.2 Polymicrogyrie

Les polymicrogyries sont caractérisées par une surface corticale irrégulière et un nombre excessif de petits gyri partiellement fusionnés et séparés par des sillons peu profonds. Résumer les causes à l'origine des polymicrogyries reste difficile du fait qu'elles sont généralement identifiées dans des cas de MDC complexes et donc associées à d'autres malformations telles que des microcéphalies. Cette difficulté est encore renforcée par l'existence de causes non génétiques à l'apparition de polymicrogyries (Squier and Jansen, 2014). Du fait de cette complexité phénotypique, les causes génétiques et les mécanismes physiopathologiques responsables de polymicrogyries restent encore très peu clairs. Les polymicrogyries sont de plus en plus décrites comme secondaires à une anomalie de l'attachement basal des processus des cellules gliales radiaires et de l'intégrité de la membrane piale comme c'est le cas pour des mutations dans les gènes *TUBB2B* et *GPR56* (Jaglin and Chelly, 2009; Jaglin et al., 2009; Piao et al., 2004). A titre d'exemple, l'analyse anapathologique d'un cas fœtal avec une mutation dans le gène *GPR56*, codant pour un récepteur transmembranaire qui interagit avec la matrice extracellulaire et qui a un rôle dans l'adhésion cellulaire, a montré des brèches dans la membrane basale ainsi qu'une dérégulation de l'attachement basal des fibres des cellules gliales radiaires (Bahi-Buisson et al., 2010). Cette caractérisation des polymicrogyries comme étant secondaires à des anomalies de la membrane piale restent débattue du fait que des classifications attribuent ce phénotype à des malformations de type lissencéphalies pavimenteuses (Barkovich et al., 2012).

4. Ectopies

4.1 Lissencéphalie de type II ou pavimenteuse

Les lissencéphalies pavimenteuses sont caractérisées par un aspect granuleux de la surface cérébrale et une réduction plus ou moins importante de la gyration. La physiopathologie des lissencéphalies pavimenteuses s'explique par une perturbation de l'attachement basal des pieds de la glie radiaire au niveau de la matrice extracellulaire entrainant ainsi la fragmentation de la membrane basale et une migration excessive des neurones corticaux dans l'espace méningé (Devisme et al., 2012). Ces lissencéphalies s'observent souvent dans des syndromes comprenant des anomalies oculaires, des

dystrophies musculaires et des dysplasies du cervelet. Malgré ce large spectre de phénotypes, les études génétiques humaines ont permis de montrer que les lissencéphalies pavimenteuses étaient liées à des mutations dans des gènes codant pour des protéines impliquées dans l'attachement des cellules gliales radiaires à la membrane basale ou dans la glycosylation de l'α-dystroglycane, ce qui est fondamental pour l'accrochage du complexe de la dystrophine à la matrice extracellulaire (van Reeuwijk et al., 2005; Roscioli et al., 2012). Six gènes majeurs (*POMT1*, *POMT2*, *POMGnT1*, *FKRP*, *LARGE*, *FKTN*) ont été identifiés dans les lissencéphalies pavimenteuses avec une fonction de glycosyltransférase démontrée ou suggérée (Hewitt, 2009). Par ailleurs, il est intéressant de mentionner que des mutations dans le gène *LAMB1* ont été associées à des lissencéphalies pavimenteuses (Radmanesh et al., 2013). *LAMB1* code pour la sous-unité beta-1 de la laminine, qui est la glycoprotéine majeure de la matrice extracellulaire de la membrane basale et qui est impliquée dans l'attachement du processus basal de la glie radiaire.

4.2 Hétérotopie nodulaire périventriculaire

Contrairement aux lissencéphalies pavimenteuses, dans les hétérotopies nodulaires périventriculaires (HNP) les neurones sont incapables d'entreprendre leur processus de migration neuronale, ce qui entraine l'accumulation d'un grand nombre de neurones à proximité de la zone ventriculaire. Au niveau des imageries cérébrales, cette accumulation de neurones se traduit par l'observation de nodules de substance grise longeant les ventricules latéraux. De manière intéressante, la plupart du cortex apparait le plus souvent normal et les patients porteurs d'hétérotopies présentent principalement des épilepsies sans altération majeure des fonctions cognitives. Cependant, les HNP apparaissent dans de nombreux cas dans des syndromes polymalformatifs complexes avec par exemple des microcéphalies associées (Parrini et al., 2006). Les altérations génétiques les plus fréquentes liées à des HNP sont retrouvées dans le gène *FLNA* (codant pour la Filamin A) (Fox et al., 1998; Parrini et al., 2006; Sheen et al., 2001). C'est pourquoi les HNP sont généralement classées dans les MDC secondaires à des anomalies de la migration neuronale qui proviennent d'un défaut dans le remodelage du cytosquelette d'actine dans les neurones en migration (Barkovich et al., 2012). Cependant, une étude de Ferland et *coll* a suggéré que la formation des HNP provient d'une voie impliquant la dérégulation du trafic vésiculaire menant à une altération de l'adhésion intercellulaire et la perte de l'intégrité du neuroéphitélium (Ferland et al., 2009). En effet, la Filamin A est connue pour s'associer de manière dynamique avec la membrane de l'appareil de Golgi et ainsi réguler le trafic endosomal (Ikonen et al., 1997; Liu et al., 1997). Ce phénotype a été consolidé par une étude récente montrant que la désorganisation de l'attachement apical des cellules gliales radiaires est la principale cause de la pathogenèse des HNP associées à des mutations dans *FLNA* (Carabalona et al., 2012). De

manière cohérente, la perte de fonction chez la souris de *MEKK4* (*Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4*), un régulateur de la phosphorylation de Filamin A, entraine un phénotype similaire (Sarkisian et al., 2006). Ces observations ont ainsi permis de clarifier pourquoi des mutations dans *ARFGEF2* sont retrouvées chez des patients présentant des HNP (Sheen et al. 2004). *ARFGEF2* (*ADP-ribosylation factor guanine exchange factor 2*), qui code pour la protéine BIG2, joue un rôle important dans le trafic vésiculaire du Golgi vers la membrane plasmique. L'inhibition de BIG2 altère la localisation membranaire des protéines des jonctions adhérentes, la E-cadhérine et la β-caténine, en perturbant leur transport du Golgi vers la membrane plasmique, ce qui est à l'origine de la formation de HNP (Sheen et al., 2004; Zhang et al., 2012, 2013b). De plus, étant donné que la Filamin-A peut interagir avec *ARFGEF2*, ce complexe pourrait réguler l'exocytose vésiculaire du Golgi vers la membrane plasmique (Zhang et al. 2012). En parallèle, il est également intéressant de mentionner que des mutations dans les gènes codant pour les protocadhérines FAT4 et DCHS1 sont retrouvées chez des patients présentant un syndrome de Van Maldergem, qui est un syndrome de malformations multiples incluant des HNP (Cappello et al., 2013). En particulier, la protéine Fat4 se localise au niveau des jonctions adhérentes apicales des progéniteurs neuronaux chez la souris, où elle régule l'organisation de la membrane apicale, favorise l'accumulation de l'actine au niveau des jonctions apicales et régule ainsi la prolifération des progéniteurs (Badouel et al., 2015; Ishiuchi et al., 2009). L'ensemble de ces résultats soulignent donc l'importance des fonctions coordonnées de l'actine et du trafic vésiculaire dans l'adhésion cellulaire au niveau de la région apicale de la zone ventriculaire et finalement dans la pathogenèse des HNP.

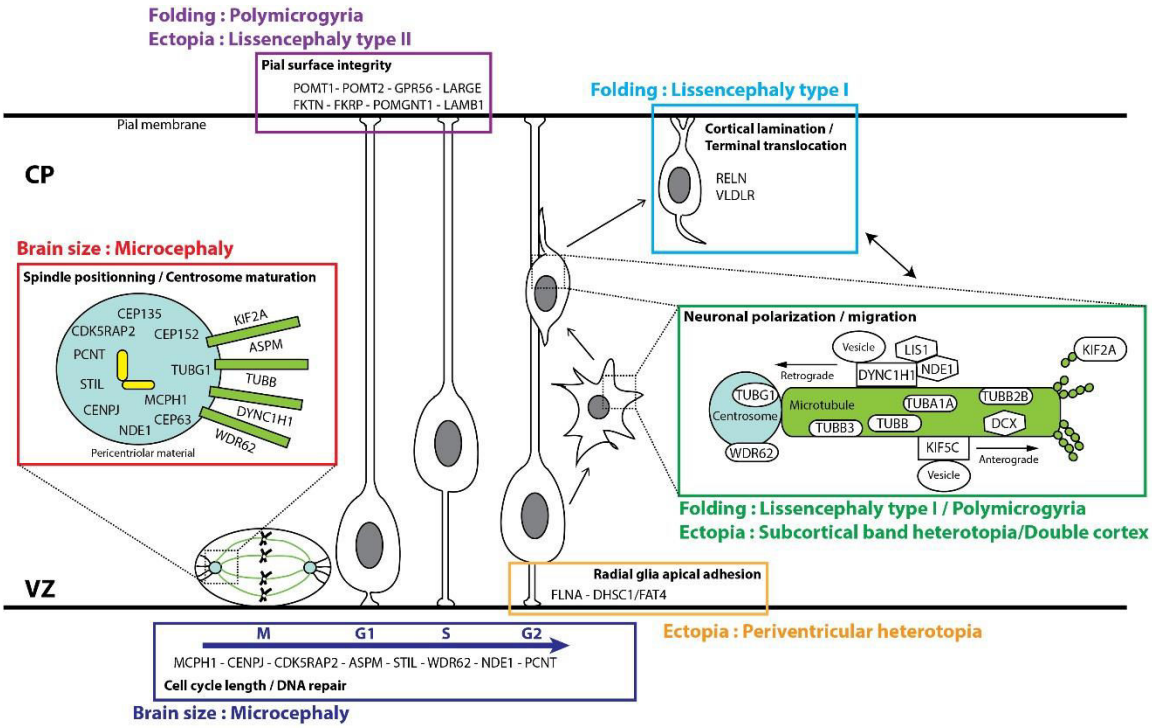


Figure 57 : Schéma récapitulatif des gènes impliqués dans les malformations du développement cortical selon les mécanismes cellulaires altérés et les phénotypes associés.

RESULTATS

RESULTATS

Au cours de mes travaux de thèse, j'ai d'abord participé à démontrer l'implication des gènes *DYNC1H1*, *KIF5C*, *KIF2A* et *TUBG1* dans un large spectre de MDC souvent associées à des microcéphalies. Ces données ont permis de renforcer l'importance du centrosome et des protéines liées aux microtubules dans le développement cortical et ont suggéré que les processus mitotiques et post-mitotiques dépendants des microtubules contribuent à la pathogenèse des MDC. Ces travaux ont été publiés dans *Nature Genetics* en 2013 (Poirier et al. 2013).

A la suite de cette étude, mes travaux de thèse se sont répartis en deux projets majeurs.
Le premier projet a consisté à mieux comprendre les conséquences cellulaires et neurodéveloppementales qui résultent de mutations dans le gène codant pour la kinésine KIF2A retrouvées chez des patients présentant des MDC. Ces données sont présentées sous forme d'un article en cours de rédaction.
Parallèlement à ces études, nos explorations génétiques ont permis d'identifier des mutations dans le domaine HECT de la E3 ubiquitine ligase NEDD4L en association avec des hétérotopies nodulaires périventriculaires. Mes travaux ont permis de définir les conséquences cellulaires associées à ces différentes mutations et l'implication de NEDD4L dans le développement cortical par l'approche de l'électroporation *in utero* chez la souris. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans Nature Genetics en 2016 et sont présentés dans l'article 2 (Broix et al. 2016).

Enfin, j'ai également contribué aux explorations du rôle de la β-tubuline TUBB3 dans le développement cortical dans le but de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques des MDC associées à des mutations dans *TUBB3.* Cet article publié dans *Human Molecular Genetics* en 2014 est présenté dans l'article annexe 1 (Saillour et al. 2014).

RESULTATS

Article 1 :

Des mutations dans les gènes TUBG1, DYNC1H1, KIF5C et KIF2A sont responsables de malformations du développement cortical et de microcéphalies

nature genetics

Mutations in *TUBG1*, *DYNC1H1*, *KIF5C* and *KIF2A* cause malformations of cortical development and microcephaly

Karine Poirier[1,2], Nicolas Lebrun[1,2], Loic Broix[1,2,23], Guoling Tian[3,23], Yoann Saillour[1,2], Cécile Boscheron[4], Elena Parrini[5,6], Stephanie Valence[1,2], Benjamin Saint Pierre[1,2], Madison Oger[1,2], Didier Lacombe[7], David Geneviève[8], Elena Fontana[9], Franscesca Darra[9], Claude Cances[10], Magalie Barth[11,12], Dominique Bonneau[11,12], Bernardo Dalla Bernadina[9], Sylvie N'Guyen[13], Cyril Gitiaux[1,2,14], Philippe Parent[15], Vincent des Portes[16], Jean Michel Pedespan[17], Victoire Legrez[18], Laetitia Castelnau-Ptakine[1,2], Patrick Nitschke[19], Thierry Hieu[19], Cecile Masson[19], Diana Zelenika[20], Annie Andrieux[4], Fiona Francis[21,22], Renzo Guerrini[5,6], Nicholas J Cowan[3], Nadia Bahi-Buisson[1,2,14,24] & Jamel Chelly[1,2,24]

The genetic causes of malformations of cortical development (MCD) remain largely unknown. Here we report the discovery of multiple pathogenic missense mutations in *TUBG1, DYNC1H1* and *KIF2A*, as well as a single germline mosaic mutation in *KIF5C*, in subjects with MCD. We found a frequent recurrence of mutations in *DYNC1H1*, implying that this gene is a major locus for unexplained MCD. We further show that the mutations in *KIF5C, KIF2A* and *DYNC1H1* affect ATP hydrolysis, productive protein folding and microtubule binding, respectively. In addition, we show that suppression of mouse *Tubg1* expression *in vivo* interferes with proper neuronal migration, whereas expression of altered γ-tubulin proteins in *Saccharomyces cerevisiae* disrupts normal microtubule behavior. Our data reinforce the importance of centrosomal and microtubule-related proteins in cortical development and strongly suggest that microtubule-dependent mitotic and postmitotic processes are major contributors to the pathogenesis of MCD.

© 2013 Nature America, Inc. All rights reserved.

The formation of the complex architecture of the mammalian brain requires coordinated timing of proliferation, migration and layering, as well as differentiation of distinct neuronal populations[1,2]. Substantial insights into these developmental processes have emerged through genetic and neurobiological investigations of the mechanisms underlying disorders of cortical development. These disorders include lissencephaly, pachygyria, polymicrogyria and microcephaly[3–7]. Many of these disorders are associated with severe intellectual disability and epilepsy, and they have traditionally been classified on the basis of which biological process (proliferation, migration or cortical organization) is likely to be affected[5].

Genetic studies in humans and mice have identified a spectrum of mutations in genes involved in an array of crucial processes that often disrupt the development of the cerebral cortex and can lead to severe cortical malformations. Aside from genes such as *ARX* and *WDR62* (reviewed in ref. 5), the more predominant importance of genes encoding cytoskeletal proteins has become evident. For example, mutations in *DCX* and *PAFAH1B1* (also known as *LIS1*), both of which encode proteins involved in microtubule homeostasis, are associated with a large spectrum of neuronal migration disorders (reviewed in ref. 3). More recently, new syndromes have been described that are associated with mutations in α- or β-tubulin–encoding genes such as *TUBA1A*,

[1]Institut Cochin, Université Paris-Descartes, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 8104, Paris, France. [2]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1016, Paris, France. [3]Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, New York University Medical Center, New York, New York, USA. [4]Institut des Neurosciences, INSERM U836, Université Joseph Fourier–Grenoble 1, Grenoble, France. [5]Pediatric Neurology Unit and Laboratories, A. Meyer Children's Hospital–University of Florence, Florence, Italy. [6]Istituto Di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS) Stella Maris Foundation, Pisa, Italy. [7]Department of Medical Genetics, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Pellegrin, Bordeaux, France. [8]Department of Medical Genetics, Université Montpellier 1, INSERM U844, Montpellier, France. [9]Unità Operativa Complessa (UOC) di Neuropsichiatria Infantile, Azienda Ospedaliera Univesritaria di Verona, Verona, Italy. [10]Département de Pédiatrie, CHU Toulouse, Toulouse, France. [11]INSERM U694, Université d'Angers, CHU 4, Angers, France. [12]Service de Génétique CHU Angers, Angers, France. [13]Clinique Médicale Pédiatrique, CHU de Nantes, Nantes, France. [14]Unité de Neurologie Pédiatrique, Hôpital Necker Enfants Malades, Université Paris Descartes, Paris, France. [15]Service de Pédiatrie et Génétique Médicale, Brest, France. [16]Centre de Référence Déficiences Intellectuelles de Causes Rares, CHU Lyon, Université Lyon 1, L2C2 CNRS, Bron, France. [17]Service de Pédiatrie, CHU Pellegrin, Bordeaux, France. [18]CHU Bicetre Service Neuropediatrie, Le Kremlin-Bicetre, France. [19]Bioinformatics Platform, Université Paris Descartes, Paris, France. [20]Centre National de Génotypage (CNG), Evry, France. [21]INSERM, Institut du Fer à Moulin, Paris, France. [22]Université Pierre et Marie Curie, Paris, France. [23]These authors contributed equally to this work. [24]These authors jointly directed this work. Correspondence should be addressed to J.C. (jamel.chelly@inserm.fr) or N.J.C. (nicholas.cowan@nyumc.org).

Received 9 November 2012; accepted 22 March 2013; published online 21 April 2013; doi:10.1038/ng.2613

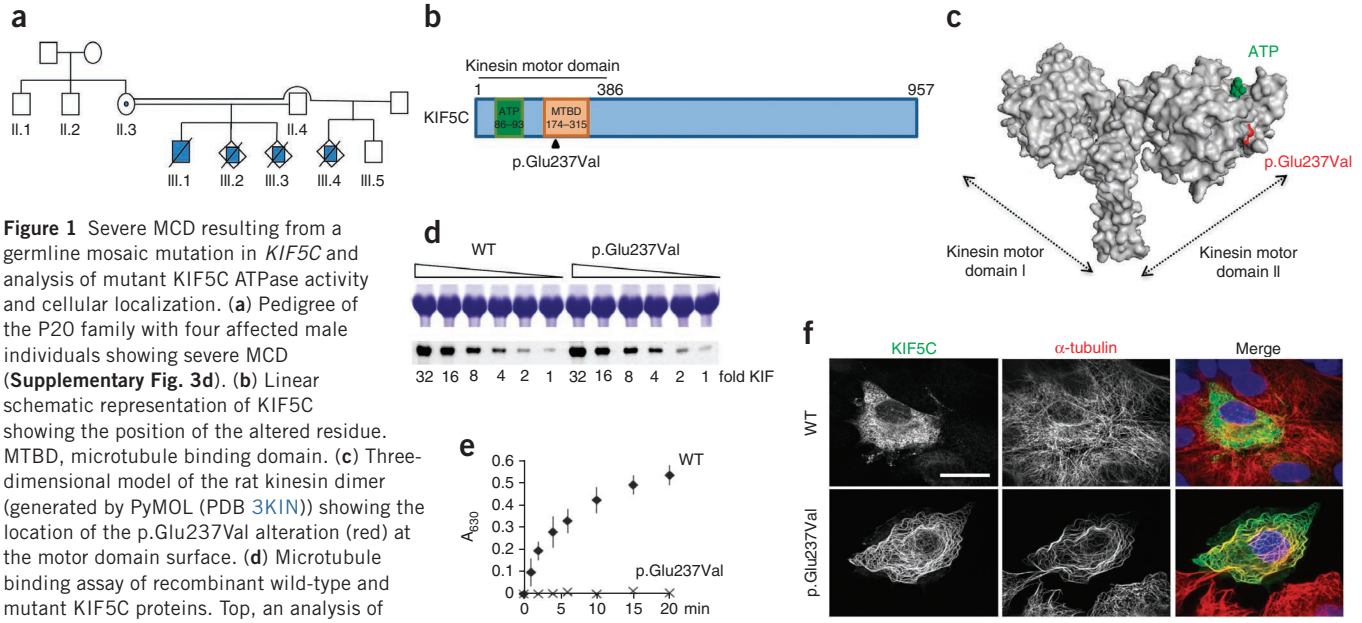


Figure 1 Severe MCD resulting from a germline mosaic mutation in *KIF5C* and analysis of mutant KIF5C ATPase activity and cellular localization. (**a**) Pedigree of the P20 family with four affected male individuals showing severe MCD (**Supplementary Fig. 3d**). (**b**) Linear schematic representation of KIF5C showing the position of the altered residue. MTBD, microtubule binding domain. (**c**) Three-dimensional model of the rat kinesin dimer (generated by PyMOL (PDB 3KIN)) showing the location of the p.Glu237Val alteration (red) at the motor domain surface. (**d**) Microtubule binding assay of recombinant wild-type and mutant KIF5C proteins. Top, an analysis of sedimented microtubules by SDS-PAGE (as loading controls); bottom, autoradiographs of the same gels. Note that the p.Glu237Val alteration does not appreciably affect the ability of the protein to bind to microtubules. Fold KIF indicates the relative concentration of added KIF protein in the assay, where 1 refers to a molar ratio of 1:1,000 of KIF5 with respect to tubulin. (**e**) Kinetics of microtubule-dependent ATP hydrolysis by wild-type and mutant KIF5C proteins. The production of inorganic phosphate was measured kinetically in reactions containing taxol-stabilized microtubules, an equal amount of purified recombinant KIF5C protein and ATP using the malachite green colorimetric reaction. Diamonds and crosses represent wild-type and mutant (p.Glu237Val) proteins, respectively. Each time point represents the average of six experiments ± s.d. Note the complete absence of detectable ATP hydrolysis for the p.Glu237Val mutant protein. A_{630}, absorbance at 630 nm. (**f**) Subcellular localization of transfected wild-type and p.Glu237Val mutant KIF5C in COS-7 cells. KIF5C immunostaining (green) shows a diffuse cytoplasmic distribution of wild-type KIF5C with enrichment, visualized as fluorescent puncta, along microtubules and in cortical regions of the cell, whereas mutant KIF5C heavily colocalizes with and decorates microtubules (identified by α-tubulin labeling, shown in red) throughout the cell but does not appear as puncta or accumulate in cortical clusters. DAPI was used as a counterstain to highlight nuclei. Scale bar, 20 μm.

© 2013 Nature America, Inc. All rights reserved.

TUBB2B, *TUBB3* and *TUBB5* (also called *TUBB*). These tubulin-related cortical dysgeneses are thought to involve a combination of abnormal neuronal proliferation, migration, differentiation and axonal guidance[8–10]. The vanishing boundaries between disorders of neuronal migration, cortical organization and proliferation have been highlighted by the recent identification of mutations in *WDR62* and their implication in a large spectrum of malformations, including pachygyria, lissencephaly, polymicrogyria, schizencephaly, and hippocampal and cerebellar abnormalities[11,12]. These findings, together with genetic and functional data, support the hypothesis that MCD-related genes are involved at multiple developmental stages and that proliferation and migration are genetically and functionally interdependent.

Sporadic, unexplained cases of MCD are by far the most common instances of these disorders, and identification of causative mutations remains a challenging task, in part because many result from *de novo* mutations (reviewed in ref. 13). To extend the spectrum of genes identified as being involved in MCD, we used a whole-exome sequencing (WES) approach and focused on variants in candidate genes encoding centrosomal and microtubule-related proteins.

RESULTS

Subgroups of individuals with MCD analyzed by WES

We selected 16 individuals with either lissencephaly or pachygyria (6 cases) or polymicrogyria (10 cases) associated with one of the following features: microcephaly (head circumferences more than 2–3 s.d. below the mean for age), dysgenesis of the cerebellum, brainstem or basal ganglia, or agenesis or dysgenesis of the corpus callosum (**Supplementary Table 1**). **Supplementary Figure 1** highlights the overall experimental workflow for detecting and prioritizing sequence variants and validation of the MCD-related genes detailed below. All families had a single affected member (sporadic cases), except one family, in which MCD was diagnosed in four individuals (family P20; **Fig. 1a**). For all subjects, mutations in known MCD genes (*PAFAH1B1*, *DCX*, *TUBA1A*, *TUBB2B*, *TUBB3* and *GPR56*) and pathogenic copy-number variations had been previously excluded.

We applied WES methodology and, in line with previous studies[14,15], identified approximately 21,500 variants affecting essential splicing sites and coding regions in each subject. After applying variant filtering using available genomic databases (dbSNP, 1000 Genomes, Exome Variant Server and a local Paris Descartes Bioinformatics platform database) and excluding all variants with a frequency greater than 1%, we identified an average of 390 variants per subject (**Supplementary Table 2**).

A germline mosaic *KIF5C* mutation

At first glance, in family P20 (**Fig. 1a**), which includes four affected boys with severe MCD and microcephaly, the apparent transmission of the recurrent phenotype through the mother suggested the segregation of an X-linked disorder in this family. However, we found no linkage between the disease and a large set of X-linked markers (**Supplementary Fig. 2a,b**). Exclusion of the X chromosome and the unlikely possibility of autosomal-recessive inheritance (because of its occurrence even when the progenitor father was different) led us to consider a mosaic germline mutation in the mother. We therefore performed WES (using DNA from patient III-1; **Fig. 1a**) and genome-wide SNP genotyping using a high-density microarray (Online Methods)

Table 1 Summary of *KIF5C*, *KIF2A*, *TUBG1* and *DYNC1H1* mutations

Patient	Gene	cDNA variation	Protein variation	Transmission
P20	*KIF5C*	c.710A>T	p.Glu237Val	Maternal mosaicism
P462	*KIF2A*	c.961C>G	p.His321Asp	*De novo*
P147	*KIF2A*	c.950G>A	p.Ser317Asn	*De novo*
P367	*TUBG1*	c.1160T>C	p.Leu387Pro	*De novo*
P388	*TUBG1*	c.275A>G	p.Tyr92Cys	*De novo*
P478	*TUBG1*	c.991A>C	p.Thr331Pro	Father's DNA unavailable
P144	*DYNC1H1*	c.del1976–1987	p.del659–662	*De novo*
P582	*DYNC1H1*	c.386A>T	p.Lys129Ile	*De novo*
P122	*DYNC1H1*	c.10008G>T	p.Lys3336Asn	*De novo*
P217	*DYNC1H1*	c.10151G>A	p.Arg3384Gln	*De novo*
P398	*DYNC1H1*	c.4700G>A	p.Arg1567Gln	*De novo*
P535	*DYNC1H1*	c.10031G>A	p.Arg3344Gln	*De novo*
360J	*DYNC1H1*	c.5884C>T	p.Arg1962Cys	*De novo*
346D	*DYNC1H1*	c.9722A>C	p.Lys3241Thr	Familial
574C	*DYNC1H1*	c.10031G>A	p.Arg3344Gln	*De novo*

of the affected family members and their mother to identify shared segments transmitted by the mother (**Supplementary Table 3**). Among the shared genomic regions, we found a 44-Mb region on chromosome 2 (**Supplementary Fig. 2c**,**d**) harboring a missense variant (c.710A>T, p.Glu237Val) in *KIF5C*, encoding kinesin 5C (**Table 1**). We tested the segregation of this variant in the family and found it to be present in all affected individuals but absent from the mother's DNA (derived from blood) and the healthy son (**Supplementary Fig. 2d**,**e**). Also, in the case of the fetus corresponding to the most recent medical abortion of the mother's pregnancy, we tested expression of *KIF5C* alleles by RT-PCR using total RNA extracted from brain and lung and found that both alleles were expressed to the same extent (**Supplementary Fig. 3a**). Taken together these data are consistent with a *KIF5C* germline mosaic mutation as the probable cause of the disease phenotype in the P20 family.

KIF5C encodes a member of the kinesin superfamily of proteins, most of which are ATP-dependent molecular motors involved in intracellular transport along microtubules[16]. The p.Glu237Val variant is located in the microtubule-interacting domain (**Fig. 1b**), and three-dimensional modeling shows the surface location of this residue within the motor domain (**Fig. 1c**). The p.Glu237Val alteration might be expected to affect conformational changes of the switch II loop, which is required for microtubule-dependent activation of the motor[16].

To assess the consequences of the mutation on KIF5C function, we expressed and purified the motor domains of both wild-type and mutant KIF5C as recombinant proteins in *Escherichia coli* (**Supplementary Fig. 3b**). The mutant protein behaved as a native species in gel filtration (**Supplementary Fig. 3c**), eliminating the possibility that the mutation might result in a completely misfolded or aggregated protein. We first compared the abilities of the wild-type and mutant proteins to bind to microtubules and found no marked difference (**Fig. 1d**). However, when we measured the ability of each protein to hydrolyze ATP in a microtubule-dependent assay, we found a complete absence of measurable hydrolysis for the mutant protein (**Fig. 1e**). This finding is consistent with the location of the altered residue in the crystal structure, as well as with the deleterious effect of the mutation in the severe MCD diagnosed in the P20 family (**Supplementary Fig. 3d**).

To test the *in vivo* consequences of the p.Glu237Val alteration, we expressed wild-type and mutant KIF5C proteins by transfection in COS-7 cells and compared their distribution and localization by double-label immunofluorescence. As previously reported[17], we found a diffuse cytoplasmic distribution of wild-type KIF5C with an enrichment, visualized as fluorescent puncta, along microtubules and in cortical regions of the cell (**Fig. 1f** and **Supplementary Fig. 3e**). In contrast, we found that mutant KIF5C heavily colocalizes with and decorates microtubules throughout the cell but does not appear as puncta or accumulate in cortical clusters (**Fig. 1f** and **Supplementary Fig. 3e**). This result is consistent with the loss of ATPase activity shown by the *in vitro* assay and is also in agreement with earlier work on a nonmotile mutant Kif5c (p.Thr93Asn) that binds to microtubules but inhibits ATP hydrolysis[18]. For the mutation identified in this family, both *KIF5C* alleles are expressed. In common with most kinesins, KIF5C functions as a tetramer consisting of two heavy chains and two light chains. It is therefore possible that mutant KIF5C could titrate out the wild-type isoform and exert a dominant-negative effect.

Mutations in *KIF2A*

The identification of a mutation in *KIF5C* prompted us to screen this gene in a cohort of 162 individuals affected by various MCDs (Online Methods) and analyze all other variants in kinesin genes identified by WES and not reported in existing databases. Among 15 heterozygous variants, we found a single *de novo* missense change in *KIF2A* (c.961C>G, p.His321Asp) in a female subject (P462; **Table 1**) with frontal band heterotopia and posterior predominant pachygyria, severe congenital microcephaly and neonatal onset seizures (**Fig. 2a**,**b**, **Table 1** and **Supplementary Tables 1** and **4**). We then screened *KIF2A* (coding exons and their flanking sequences) in the same follow-up cohort and identified a second *de novo* missense variant in *KIF2A* (c.950G>A, p.Ser317Asn) (**Table 1** and **Fig. 2a**,**b**) in a girl affected by congenital microcephaly and posterior predominant pachygyria (P147; **Fig. 2a** and **Supplementary Table 4**).

KIF2A is a member of the M-kinesins (kinesin-13 family), in which the motor domain is located in the middle of the protein (**Fig. 2b**). Rather than a direct involvement in microtubule-based motility, KIF2A functions by driving the ATP-dependent depolymerization of microtubules[19]. In addition to a potential deleterious effect predicted by the PolyPhen-2 and SIFT algorithms[20,21] (**Supplementary Table 5**), inspection of the protein structure (Protein Data Bank (PDB) 2GRY; **Fig. 2c**) showed that both conserved residues Ser317 and His321 are located around the nucleotide binding pocket, suggesting that the ability of KIF2A mutants to bind and/or hydrolyze ATP is probably impaired. To investigate this possibility, we expressed the wild-type and mutant ATP-binding domains (residues 126–526) in *E. coli* as recombinant C-terminally hexahistidine (His_6)-tagged proteins. We found that the wild-type protein was present as a conspicuous Coomassie-stained band in soluble extracts of host cells (**Fig. 2d**). However, the two mutant proteins expressed in parallel soluble extracts were not convincingly identifiable; indeed, after affinity purification the mutant KIF2A proteins were recovered at substantially reduced amounts compared to the wild-type control protein and were present instead in higher amounts (relative to the wild-type control) in the insoluble fraction after host-cell lysis (**Fig. 2d**). These data imply that the mutations lead to substantially reduced solubility as a result of misfolding and therefore result at a minimum in a reduced yield of functional protein. We also transfected constructs engineered for the expression of these *KIF2A* mutations into COS-7 and human fibroblast cells and analyzed them by immunofluorescence. We consistently found that both overexpressed mutant KIF2A proteins (p.His321Asp and p.Ser317Asn) had abnormal cellular localization (**Fig. 2e** and **Supplementary Fig. 4a**). We also examined endogenous mutant

© 2013 Nature America, Inc. All rights reserved.

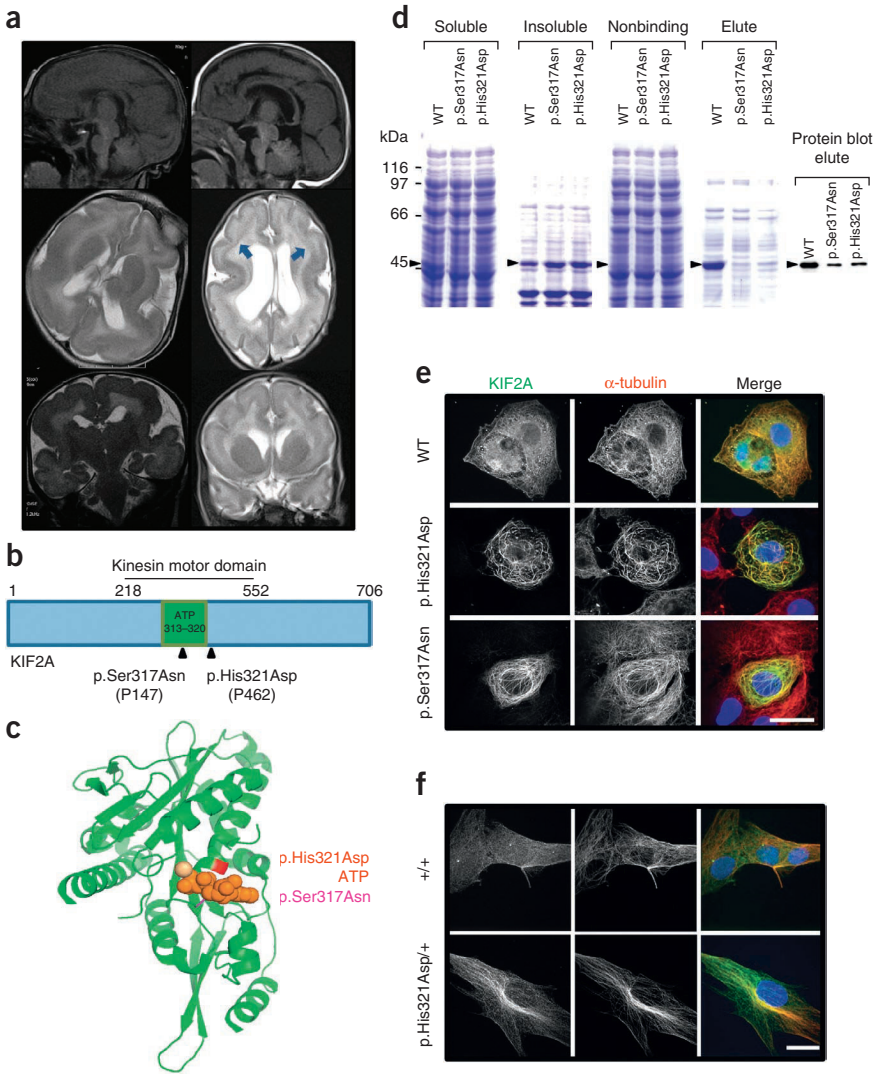


Figure 2 Mutations in *KIF2A* cause posterior predominant agyria or pachygyria and compromise productive folding and cellular localization. (**a**) Brain MRI scans of subjects with *KIF2A* mutations. Shown are representative T1-sagittal (first row), T2-axial (second row) and T2-coronal (third row) MRI scans performed at 5 weeks in patient P147 (left) and at 3 weeks in patient P462 (right). Patient P147 shows posterior predominant pachygyria with a thick cortex and a thin corpus callosum. Patient P462 has posterior predominant pachygyria with subcortical band heterotopias (arrows) and a thin corpus callosum. (**b**,**c**) Linear (**b**) and three-dimensional ribbon (**c**) (PDB 2GRY) representations of the KIF2A polypeptide showing the position of the two heterozygous MCD-associated alterations (shown in red and pink) near the nucleotide binding site (shown in orange). (**d**) Folding of KIF2A. Wild-type and mutant (p.Ser317Asn, p.His321Asp) forms of the KIF2A nucleotide binding domain (residues 126–526) were expressed in *E. coli* as recombinant C-terminally His_6-tagged proteins. Soluble extracts of host cells, the insoluble (particulate) fraction and products that either did not bind (nonbinding) or bound and eluted (eluted) from columns of solid phase–bound Co^{2+} were analyzed by SDS-PAGE and (for the affinity purified material) by protein blotting with a His_6 antibody. The arrows identify the recombinant KIF2A nucleotide binding domain. The locations of molecular mass markers are shown at left. (**e**,**f**) Immunofluorescence staining of KIF2A (green) and α-tubulin (red) in either COS-7 cells transfected with wild-type or mutant (p.Ser317Asn and p.His321Asp) *KIF2A* cDNA constructs (**e**) or wild-type and p.His321Asp patient-derived fibroblasts (**f**). Note that instead of the expected diffuse punctiform cytoplasmic and nuclear distribution (as observed for wild-type KIF2A), KIF2A mutants showed a predominant colocalization with and decoration of microtubules. In cells expressing high levels of mutant forms of KIF2A, the decorated microtubule network is located mainly in the central region of the cells and around the nucleus with a disorganized and bundled appearance of microtubules. The nuclear distribution is also disrupted, and in both mutants, the nucleus is free of KIF2A. A similar altered distribution of KIF2A is evident in patient-derived fibroblasts. Scale bars (**e**,**f**), 20 μm.

© 2013 Nature America, Inc. All rights reserved.

KIF2A in fibroblasts derived from the subject bearing the c.961C>G (p.His321Asp) mutation and found similar results (**Fig. 2f**).

In view of the fact that both *KIF2A* alleles are expressed in patient fibroblasts (**Supplementary Fig. 4b**) and the KIF2A molecule functions as a dimer[22], our *in vitro* and *in vivo* data are consistent with a dominant-negative effect of these mutations.

Recurrent mutations in *DYNC1H1* and *TUBG1*

We searched for the recurrence of mutations in the same gene in unrelated subjects with similar phenotypes and identified two variants in *DYNC1H1* (P122 and P398; **Table 1**, **Fig. 3** and **Supplementary Table 4**) and two others in *TUBG1* (P367 and P388; **Table 1**, **Fig. 4** and **Supplementary Table 4**). The *de novo* mutations in *DYNC1H1* were present in subjects with complex MCD from group A, whereas those in *TUBG1* occurred in two subjects with MCD from group B (**Supplementary Table 1**). Because of the large spectrum of MCDs associated with mutations in genes such as *WDR62*, *TUBA1A* and *TUBB2B*[11,12,23], we analyzed all variants detected in *DYNC1H1* or *TUBG1* in either group and identified (and confirmed) one additional *de novo* variant in *DYNC1H1* in a subject from group B (P217; **Table 1** and **Fig. 3a**). To confirm the involvement of *DYNC1H1* and *TUBG1* in complex MCD, we screened coding exons in *TUBG1* and *DYNC1H1* in the cohort of 162 subjects with MCD. Consistent with our exome sequencing findings, we identified six additional *DYNC1H1* mutations (**Table 1** and **Supplementary Table 5**). The discovery of the same mutation (encoding p.Arg3344Gln) in two unrelated subjects with a similar phenotype strongly supports the involvement of *DYNC1H1* in MCD. For *TUBG1*, the screening identified one additional mutation (P478; **Table 1** and **Fig. 4a**). Whenever it was possible, an analysis of parental DNAs demonstrated the *de novo* occurrence of these mutations, with the exception of the *DYNC1H1* variant encoding p.Lys3241Thr, which we identified as being associated with a familial form of MCD (**Table 1** and **Supplementary Fig. 5**). Consistent with a pathogenic effect, interspecies sequence comparison and prediction showed a high degree of conservation and potential deleterious effects of all residues involved (**Supplementary Table 5**).

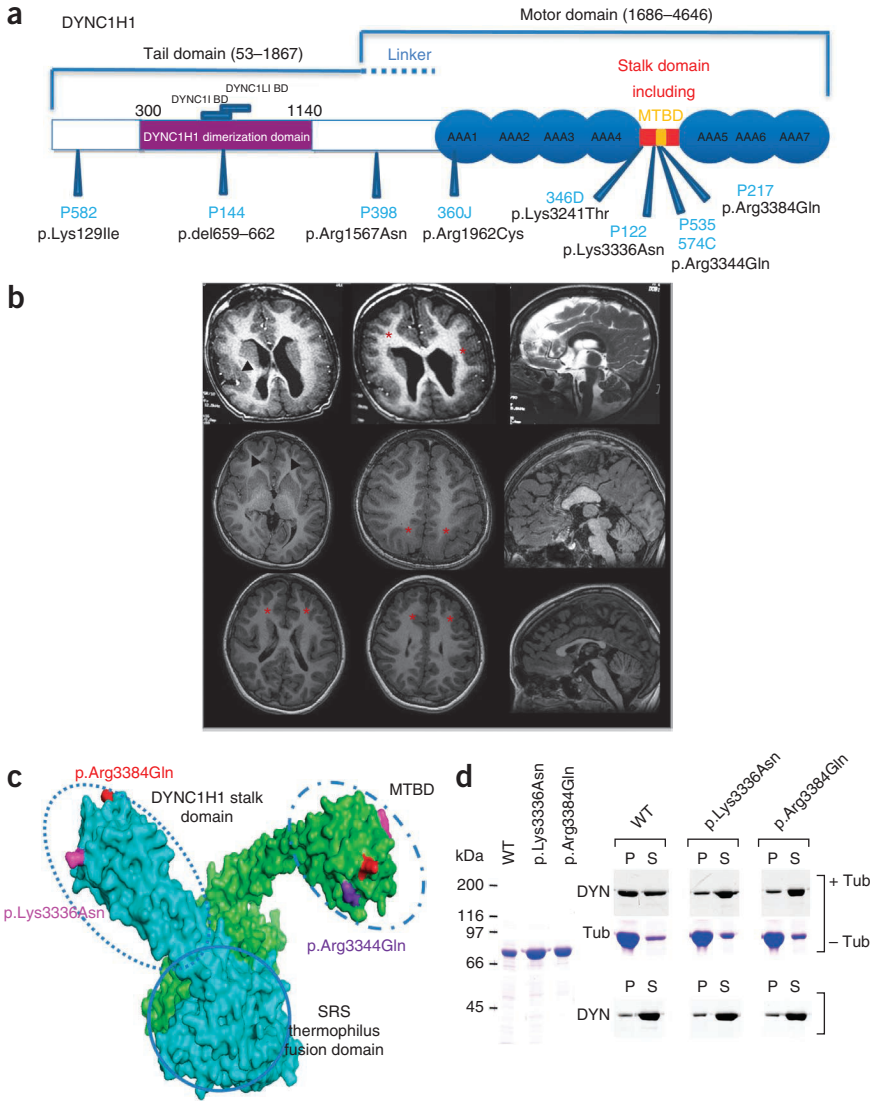


Figure 3 Spectrum of MCD associated with mutations in *DYNC1H1* and analysis of the ability of mutant DYNC1H1 to bind to microtubules. (**a**) Schematic representation of DYNC1H1 protein showing the positions of alterations causing MCD. (**b**) Brain MRI scans showing the phenotypic spectrum associated with *DYNC1H1* mutations. Top row, axial T1-weighted images from patient P122 showing diffuse coarse polymicrogyria, which is most prominent in the perisylvian region (arrowhead). In the frontal regions, polymicrogyria has the appearance of a dysmorphic cortex (asterisks). The sagittal T2-weighted section shows a dysmorphic thick corpus callosum and hypoplasic brainstem. Second row, axial T1-weighted images from patient P535 showing a simplified gyral pattern on both frontal regions (arrowheads), large and dysmorphic basal ganglia and parieto-occipital pachygyria (asterisks). The sagittal T1-weighted image shows a thick and dysmorphic corpus callosum. Third row, axial T1-weighted images from patient P398 showing bilateral frontal polymicrogyria (asterisks) with multiple small gyri giving an appearance of delicate polymicrogyria. (**c**) Illustration of the structure of the DYNC1H1 MTBD (ellipses) and the distal portion of the coiled-coil stalk of mouse cytoplasmic dynein as a fusion with seryl-tRNA synthetase (SRS; solid circle) from *Thermus thermophilus* (PDB 3ERR). The illustration shows the surface location on the MTBD of the alterations p.Lys3336Asn, p.Arg3344Gln and p.Arg3384Gln. (**d**) Effect of dynein heavy chain mutations on binding to microtubules. Left, Coomassie stain of purified ^{35}S-labeled wild-type and mutant seryl-tRNA synthetase–DYNC1H1 MTBD fusion proteins analyzed by SDS-PAGE. Right, purified labeled recombinant proteins (as shown on the left) were tested for their ability to co-sediment through sucrose cushions either in the presence (+Tub) or absence (–Tub) of taxol-polymerized microtubules. Labeled material (DYN, seryl-tRNA synthetase–DYNC1H1 MTBD fusion proteins) contained in the supernatants (S) and pellets (P) was analyzed by SDS-PAGE. Note that for the mutant proteins, the amount of label sedimenting with microtubules was reduced to a level close to that present in control reactions done without added tubulin.

© 2013 Nature America, Inc. All rights reserved.

Functional effects of *DYNC1H1* mutations

Among the 11 individuals (8 sporadic cases plus 2 brothers and their mother) with *DYNC1H1* mutations reported here, re-examination of magnetic resonance imaging (MRI) scans identified a wide range of brain malformations (**Fig. 3b** and **Supplementary Table 4**). Because *DYNC1H1* mutations have been reported in families with dominant peripheral neuropathy and an axonal (type 2) form of Charcot-Marie-Tooth disease[24,25], we re-evaluated our patients and found clear clinical evidence of peripheral neuropathy in three cases. We further confirmed this in one subject by nerve conduction studies.

The DYNC1H1 (cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1) protein is a large (>530 kDa) crucial subunit of the cytoplasmic dynein complex[26,27]. The C-terminal region (residues 1846–4646) is the motor domain complex; it is arranged as a heptameric ring with seven AAA domains and a stalk from which protrudes a microtubule-binding domain[26]. Notably, six out of the eight mutations we identified in individuals with MCD are located either in the stalk domain, in AAA1 or in the linker region; the remaining two are in the tail domain (**Fig. 3a**). One of these latter mutations is located outside of the homodimerization domain, whereas the second (leading to a deletion of four residues) is located in a region that is required for binding of the associated light chains DYNC1L and DYNC1LI (**Fig. 3a**). Homology modeling of the DYNC1H1 alterations showed that three are located on the surface of the microtubule binding domain (**Fig. 3c**). Previous *in vitro* experiments have shown that a nearby alteration (p.Arg3384Pro) weakens microtubule binding[26] (the residue is referenced as R3382 in the previous work).

We evaluated the effect of two of our newly discovered *DYNC1H1* mutations on microtubule binding. Wild-type and mutant (p.Lys3336Asn and p.Arg3384Gln) sequences containing the DYNC1H1 microtubule binding domain were fused with the antiparallel coiled-coil side arm contained in the native structure of seryl–transfer RNA (tRNA) synthetase[27] as C-terminally His_6-tagged proteins. This chimeric arrangement fixes the alignment of the two strands of the coiled-coil arm in their native conformation such that their registry results in a relatively high microtubule binding affinity[26]. We expressed the

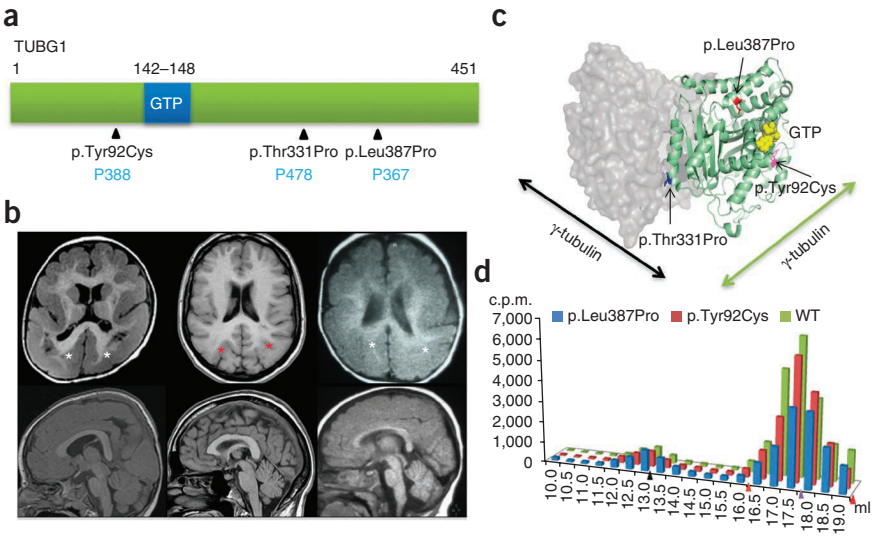


Figure 4 Mutations in *TUBG1* cause MCD with posterior predominant pachygyria, and analysis of the effect of γ-tubulin mutations on facilitated folding. (**a**) Linear representation of the TUBG1 protein showing the localization of the GTP binding site and TUBG1 alterations. (**b**) Brain MRI scans of subjects with *TUBG1* mutations. First row, axial T1-weighted images in three different patients (P388, first column; P478, second column; and P367, third column) with different *TUBG1* mutations showing different degrees of pachygyria, with a thick cortex that is most prominent in the parieto-occipital regions of patients P388 and P367 (white asterisks). In the less severe case, patient P478, the pachygyria is milder, with an aspect of posterior subcortical band heterotopia (red asterisks). Second row, sagittal T1-weighted sections showing a dysmorphic thick corpus callosum. Note that in the three cases, the cerebellum and brainstems are normal. (**c**) Three-dimensional model of the TUBG1 dimer (PDB 3CB2) showing the localization of the three altered residues and the bound GTP molecule (yellow). (**d**) Effect of γ-tubulin alterations on facilitated folding. Sequences encoding full-length wild-type and mutant (p.Tyr92Cys, p.Leu387Pro) γ-tubulin were expressed as ^{35}S-labeled proteins in reticulocyte lysate, and the reaction products were analyzed by gel filtration on Superose 6. Fractions emerging from the column were subjected to SDS-PAGE, and the radioactivity migrating as γ-tubulin was quantified using a phosphorimager. Note the diminished yield of material migrating as monomeric γ-tubulin for p.Leu387Pro, with a corresponding increase (relative to the wild-type protein) of radioactivity migrating as a binary complex with the cytosolic chaperonin (the CCT binary complex has the same apparent mass as the largest molecular mass marker, thyroglobulin, indicated by the black arrowhead). Arrows mark the elution positions of molecular mass standards run under identical conditions: thyroglobulin (black), 670 kDa; IgG (orange), 158 kDa; ovalbumin (purple), 44 kDa; and myoglobin (red), 17 kDa.

© 2013 Nature America, Inc. All rights reserved.

recombinant proteins in *E. coli*, affinity purified them and tested their ability to co-sediment with taxol-polymerized microtubules through sucrose cushions. This experiment showed a substantial reduction in the microtubule binding affinity of both the p.Lys3336Asn and p.Arg3384Gln mutants compared to the wild-type control protein (**Fig. 3d**).

Functional effects of *TUBG1* mutations

Two subjects with *TUBG1* mutations (P367, c.1160T>C, p.Leu387Pro; and P388, c.275A>G, p.Tyr92Cys) share a complex MCD combining posteriorly predominant pachygyria (or agyria) and severe microcephaly (−4 s.d.). The third but less severe case (P478, c.991A>C, p.Thr331Pro) showed posterior pachygyria and laminar heterotopia with a thick and dysmorphic corpus callosum (**Fig. 4b** and **Supplementary Table 4**). *TUBG1* is one of two human genes encoding γ-tubulin[28] and is highly expressed in fetal brain. The protein is a structural component of the centrosome and associates with at least six other proteins to form the γ-tubulin ring complex (γTuRC), which functions in microtubule nucleation[29]. Two of the altered residues (Thr331 and Leu387) are located in buried sites in two distinct α-helices (**Fig. 4c**); their alteration to proline residues is likely to destabilize these helices. One of these residues (Thr331) is located in the γ-γ interaction domain; the conserved altered residue (Tyr92) is located in the vicinity of the GTP binding site (**Fig. 4c**).

The events leading to the assembly of the γTuRC are unknown. However, γ-tubulin, similarly to the components of the α/β-tubulin heterodimer, requires facilitated folding by the cytosolic chaperonin CCT and is discharged from it as a monomer[30]. We therefore assessed the effect of two of the γ-tubulin alterations (p.Tyr92Cys and p.Leu387Pro) on facilitated folding and on the structural stability of the monomer *in vitro*. The latter experiment showed that the integrity of the recombinant proteins is not affected by either of the disease-associated mutations (**Supplementary Fig. 6**). Conversely, we found a diminished yield of material migrating as monomeric γ-tubulin for p.Leu387Pro with a corresponding increase (relative to the wild-type protein) of radioactivity migrating as an undischarged binary complex with CCT (**Fig. 4d**). These data suggest that the chaperonin-dependent folding (and hence the yield) of monomeric γ-tubulin is compromised by the p.Leu387Pro alteration. The effect of the p.Tyr92Cys alteration on facilitated folding through interaction with chaperonin is less evident (**Fig. 4d**), and it therefore seems probable that this alteration (and perhaps the others, to some extent) exerts its influence through the assembly and/or functional integrity of the γTuRC.

We analyzed the consequences of these newly discovered γ-tubulin alterations *in vivo* in two ways. First we investigated the phenotype in yeast (*S. cerevisiae*) cells in which we introduced these alterations into the conserved (although nonidentical) residues in the single yeast γ-tubulin gene *TUB4* (**Supplementary Fig. 7a**). All of the mutant heterozygous and homozygous strains we generated were viable. However, although we found no change in microtubule plus-end dynamics (**Supplementary Table 6**), cells harboring TUB4 p.Trp92Cys showed an enhancement in the number and average maximal length of astral microtubules, as well as a decrease in the frequency of nucleation of new microtubules from the spindle pole body (**Supplementary Table 7** and **Supplementary Fig. 7b**). Moreover, we found abnormal mitotic features in a large number of cells (TUB4 p.Trp92Cys, 23%; TUB4 p.Val387Pro, 8%), consistent with incorrect nuclear positioning and reflecting a defect in mitotic microtubule organization (**Fig. 5a** and **Supplementary Table 7**). These data are consistent with both the disease-causing γ-tubulin alterations having a deleterious effect on crucial aspects of microtubule behavior and with the more severe clinical phenotype associated with the p.Tyr92Cys alteration. Second, we used *in utero* RNA interference (RNAi) to analyze the consequences of *Tubg1* downregulation on cortical radial neuronal migration in mice. We found that brain sections of embryonic day (E) 18.5 embryos that had been electroporated 4 d previously with short hairpin RNA

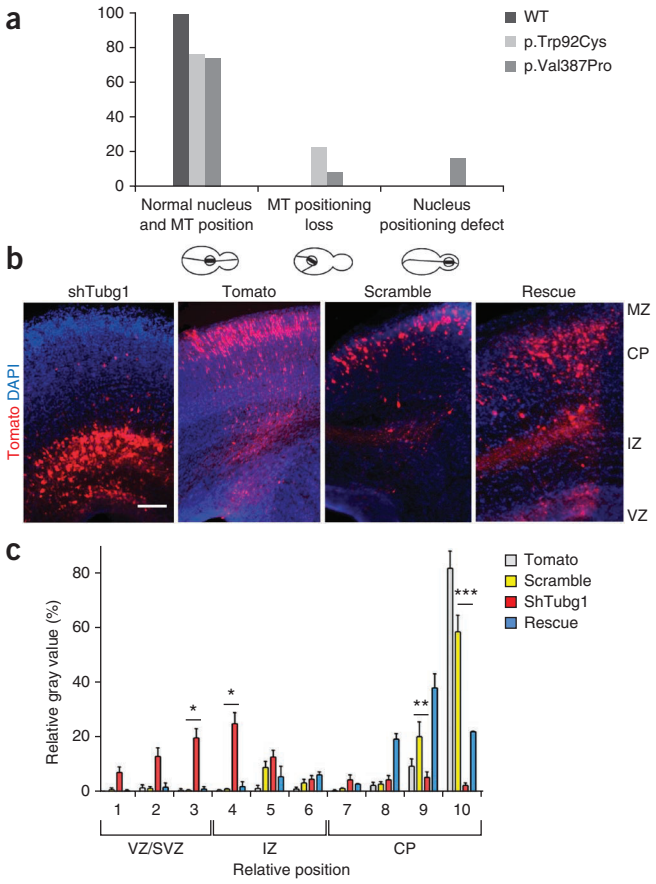


Figure 5 TUBG1 alterations affect mitotic figures in yeast cells, and suppression of *Tubg1* expression disrupts neuronal migration in the developing mouse neocortex. (**a**) Yeast mitotic figures of γ-tubulin disease-related substitutions. At least 100 cells were examined in each strain after transformation with GFP-BIK1P, an α-tubulin–binding protein that labels mitotic spindle and astral microtubules. The percentage of large budded cells with nuclei and microtubule positions were scored in the different strains as indicated. $P < 0.001$ for all χ^2 test comparisons. MT, microtubule. (**b**) Validated shRNAs that suppressed *Tubg1* expression in cultured N2a cells by approximately 50–60% were co-electroporated with an RFP-encoding reporter construct (tomato) into progenitor cells located in the ventricular zone (VZ) of E14.5 mouse neocortices. The images show coronal sections of mouse brains 4 d after electroporation at E14.5 with an RFP-encoding vector (tomato), control shRNA (scramble), *Tubg1* shRNA (shTubg1) or *Tubg1* shRNA in combination with pCMV6-*Tubg1* (rescue). MZ, marginal zone; CP, cortical plate; IZ intermediate zone. Scale bar, 100 μm. (**c**) Fluorescence intensities reflecting the distribution of electroporated cells within the cortex were converted into gray values and measured from the VZ to the MZ. Bars represent the mean ± s.e.m. of fluorescence intensities in ten equal strata (with stratum one corresponding to the VZ and stratum ten corresponding to the MZ) dividing the cortices of independent brains (tomato, $n = 4$; scramble, $n = 3$; shTubg1, $n = 11$; rescue, $n = 2$). Note that knockdown with shTubg1 leads to an increase in the percentage of transfected cells located in the SVZ and IZ (strata 3 and 4) and a significant decrease in the upper layers of the CP (strata 9 and 10) compared with the scramble control. Cells transfected with shTubg1 and pCMV6-*Tubg1* mainly reached the upper layers of the CP (strata 8 to 10), showing that migration disruption is a specific consequence of *Tubg1* RNAi. $^*P < 0.1$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ calculated by Student's *t* test.

(shRNA) targeting *Tubg1* showed a significant fraction of red fluorescent protein (RFP)-positive cells in the subventricular and intermediate zone ($P < 0.01$), suggesting that *Tubg1* downregulation induced a significant arrest of migrating cells (**Fig. 5b**,**c**). In contrast, embryos transfected identically *in utero* with RFP alone showed strong labeling in the cortical plate ($P < 0.001$; **Fig. 5b**,**c**). Expression of scrambled shRNA controls had no effect on migration, whereas shRNA-induced neuronal migration defects were substantially rescued by overexpression of a wild-type human *TUBG1* complementary DNA (cDNA) (**Fig. 5b**,**c**). Quantification of these effects is shown in **Figure 5c**. We repeated these *in utero* RNAi experiments using a second shRNA targeting the coding sequence and found that it also affected neuronal radial migration, although the positions of misplaced cells were more dispersed than with the first shRNA (data not shown). This observation is probably attributable to the fact that downregulation of *Tubg1* expression using the first shRNA was more efficient than when the second shRNA was used (data not shown). We conclude that TUBG1 has a crucial role in neuronal migration during corticogenesis.

DISCUSSION

Among 16 subjects analyzed by WES, we identified mutations in four genes (*KIF5C*, *KIF2A*, *DYNC1H1* and *TUBG1*) encoding proteins that interact with microtubules in 7 of 16 cases. The remaining nine subjects include four in whom all tested variants were inherited from one of the healthy parents and five with *de novo* events predicted to alter protein functions but with no clear link to microtubules (**Supplementary Table 8**). Further screening and re-evaluation of MRI data showed that mutations in *KIF5C*, *KIF2A*, *DYNC1H1* and *TUBG1* are involved in a wide range of cortical and gyral pattern abnormalities associated with microcephaly, callosal, cerebellum and/or brainstem dysgenesis (**Supplementary Table 4**). First, in the familial form of severe MCD described here (P20; **Fig. 1**), we obtained convincing evidence for the presence of a maternal mosaic germline mutation in *KIF5C* that is responsible for the phenotype in four male subjects. There is now a wide range of disorders for which the occurrence of parental germline mosaicism has been reported[31]. Indeed, with the recent application of DNA sequencing to whole genomes and whole exomes, the frequency of somatic and germline mosaicism may be higher than is currently appreciated. Our results highlight both the contribution of germline mosaic mutational events in families with recurrent genetic disorders and the power of WES to resolve these situations. For *KIF5C*, we note that a recent report documented a *de novo* mutation in a sporadic case with severe intellectual disability and microcephaly for whom MRI data were not available[32]. Second, subjects with mutations in *KIF2A* or *TUBG1* share microcephaly and a cortical gyration pattern that more severely affects the posterior cortex. This gyration pattern is reminiscent of the *PAFAH1B1*-related cortical gyration pattern[33]. Third, mutations in *DYNC1H1* are the cause of a wide spectrum of cortical malformations characterized mainly by posterior pachygyria (present in 8/11 individuals with *DYNC1H1* mutations studied here; **Supplementary Table 4**). Some individuals with mutations in *DYNC1H1* had evidence of additional abnormalities, including microcephaly, nodular heterotopia, hypoplasia of the corpus callosum and dysmorphy of the basal ganglia, as well as evidence of peripheral neuropathy (3/11). However, the most striking finding is the concomitant presence in two individuals of both pachygyria and polymicrogyria patterns (P122 and P217; **Fig. 3** and **Supplementary Table 4**), which are traditionally regarded as distinct entities. This association has also been reported in *WDR62*-related disorders[11] that include individuals with microcephaly, polymicrogyria and schizencephaly.

Interestingly, missense mutations in *DYNC1H1* have been associated primarily with neuropathy: an axonal dominant form

© 2013 Nature America, Inc. All rights reserved.

of Charcot-Marie-Tooth disease[25] and a dominant form of spinal muscular atrophy[24,34]. More recently, *de novo* missense mutations in *DYNC1H1* were reported in two individuals with intellectual disability and signs of cortical malformations[32,35]. Taken together these data indicate that heterozygous missense mutations in *DYNC1H1* underlie a broad phenotypic spectrum extending from peripheral neuropathies to cerebral malformations. However, *DYNC1H1* is emerging as an important and principal locus for mutations responsible for MCD, and its screening should be recommended in unexplained and difficult-to-classify lissencephaly, pachygyria and polymicrogyria with or without microcephaly.

The data reported here extend the association between microtubule-based cellular processes and proper cortical development[8,9,36,37] to γ-tubulin and the microtubule-dependent motor proteins KIF5C, KIF2A and DYNC1H1. Regarding the α- and β-tubulin isotypes (TUBA1A, TUBB2B, TUBB3 and TUBB5), all mutations identified so far in the genes encoding these proteins are heterozygous missense mutations. In the absence of loss-of-function mutations (that is, nonsense, frameshift, splicing or genomic deletions), these observations are consistent with dominant-negative effects rather than haploinsufficiency as the primary molecular mechanism causing disease. This hypothesis is further supported by our data showing the behavior of mutant forms of KIF5C and KIF2A in cells. It is nonetheless possible that haploinsufficiency could also contribute to functional defects of MCD-related proteins.

Our phenotypic evaluation of *S. cerevisiae* strains harboring disease-causing alterations in TUB4 as well as our *in utero* suppression experiments suggest that adequate expression of TUBG1 is required for normal microtubule behavior and proper neuronal migration. Previous studies, including analyses of *Kif2a*$^{-/-}$ and *Kif5c*$^{-/-}$ mice[19,38], imply that sufficient expression of functional KIF5C, KIF2A and DYNC1H1 proteins is also required for proper cortical development. For *DYNC1H1*, inactivation of the mouse homolog is embryonic lethal[39], whereas *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU)-induced mouse mutants harboring heterozygous missense mutations in the tail domain (*Legs at odd angles* (*Loa*, p.Phe580Tyr) and *Cramping 1* (*Cra1*, p.Tyr1055Cys)) result mainly in early onset progressive neurodegenerative diseases[40]. This analysis also identified defects in retrograde axonal transport[40] and in hippocampal neocortical lamination and neuronal migration[41]. In line with these results, another study reported that *in vivo* RNAi-mediated downregulation of *Dync1h1* impairs neuronal migration and positioning in the developing neocortex[42].

Our data strongly suggest that the regulation of microtubule-dependent mitotic processes in progenitor cells, as well as the trafficking activities of the microtubule-dependent molecular motors KIF2A, KIF5C and DYNC1H1 in postmitotic neuronal cells, are collectively essential for correct neuronal development (**Supplementary Fig. 8**). In light of this conclusion, it is understandable that functional disruption of any of these genes can lead to substantial defects in neuronal polarization, migration and differentiation.

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper.

Accession codes. Human *TUBG1* (NM_001070), human *KIF5C* (NM_004522), human *DYNC1H1* (NM_001376), human *KIF2A* (NM_001098511), mouse *Tubg1* (NM_134024), human *DCX* (NM_000555), human *PAFAH1B1* (RefSeq NM_000430), human *ARX* (NM_139058), human *TUBA1A* (NM_006009), human *TUBB2B* (NM_178012), human *TUBB3* (NM_006086), human *GPR56* (NM_201524).

Note: Supplementary information is available in the online version of the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the patients and their families for their participation. We thank F.J. Fourniol, N. Levy and members of the Chelly lab for their thoughtful comments and help. We thank I. Gibbons and A. Carter (Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology) for providing the seryl-tRNA synthetase dynein heavy chain fusion constructs used in the experiments described in this paper. A full-length cDNA encoding human KIF5C was generously provided by F.A. Stephenson (School of Pharmacy, University College London). A full-length cDNA encoding human γ-tubulin was generously provided by B.R. Oakley (Department of Molecular Biosciences, University of Kansas). We also thank members of the Cochin Hospital Cell Bank, the Centre National de Genotypage, Genoscope, the Paris Descartes Bioinformatics platforms and the Cochin Institute genomic platform for their technical and bioinformatic assistance. This work was supported by funding from INSERM, the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM funding within the frame of the programme Equipe FRM; J.C.), the Fondation JED, the Fondation Maladies Rares, the Agence National de Recherche (ANR Blanc 1103 01, project R11039KK; ANR E-Rare-012-01, project E10107KP) and the EU-FP7 project GENECODYS, grant number 241995. This work was also supported by a grant (GM097376 to N.J.C.) from the US National Institutes of Health.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.C. coordinated and instigated the study with N.J.C. K.P. and N.L. analyzed WES data and performed genetic and molecular studies. L.B. and Y.S. performed and analyzed *in utero* RNAi experiments. F.F. provided technical assistance for *in utero* RNAi experiments. N.B.-B. and R.G. coordinated collection of clinical and imaging data. D.G., E.F., F.D., C.C., M.B., D.B., B.D.B., S.N., C.G., P.P., V.d.P., J.M.P., D.L. and V.L. helped in selecting patients. S.V., B.S.P. and M.O. analyzed variations in candidate genes and screened subject DNA. G.T. and N.J.C. performed the biochemical studies. C.B. and A.A. performed the yeast studies. L.C.-P. and E.P. performed all DNA extractions from patient samples. P.N., T.H. and C.M. performed bioinformatics analysis of exome sequencing data. D.Z. coordinated the WES procedure (library generation, exome enrichment and WES). J.C. and N.J.C. drafted and finalized the manuscript with the help of K.P., N.L., L.B. and Y.S.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permissions information is available online at http://www.nature.com/reprints/index.html.

1. Caviness, V.S. Jr., Takahashi, T. & Nowakowski, R.S. Numbers, time and neocortical neuronogenesis: a general developmental and evolutionary model. *Trends Neurosci.* **18**, 379–383 (1995).
2. Rakic, P. & Caviness, V.S. Jr. Cortical development: view from neurological mutants two decades later. *Neuron* **14**, 1101–1104 (1995).
3. Francis, F. *et al.* Human disorders of cortical development: from past to present. *Eur. J. Neurosci.* **23**, 877–893 (2006).
4. Guerrini, R., Dobyns, W.B. & Barkovich, A.J. Abnormal development of the human cerebral cortex: genetics, functional consequences and treatment options. *Trends Neurosci.* **31**, 154–162 (2008).
5. Barkovich, A.J., Guerrini, R., Kuzniecky, R.I., Jackson, G.D. & Dobyns, W.B. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. *Brain* **135**, 1348–1369 (2012).
6. Ostergaard, P. *et al.* Mutations in *KIF11* cause autosomal-dominant microcephaly variably associated with congenital lymphedema and chorioretinopathy. *Am. J. Hum. Genet.* **90**, 356–362 (2012).
7. Kousar, R. *et al.* Mutations in *WDR62* gene in Pakistani families with autosomal recessive primary microcephaly. *BMC Neurol.* **11**, 119 (2011).
8. Jaglin, X.H. & Chelly, J. Tubulin-related cortical dysgeneses: microtubule dysfunction underlying neuronal migration defects. *Trends Genet.* **25**, 555–566 (2009).
9. Tischfield, M.A., Cederquist, G.Y., Gupta, M.L. Jr. & Engle, E.C. Phenotypic spectrum of the tubulin-related disorders and functional implications of disease-causing mutations. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**, 286–294 (2011).
10. Breuss, M. *et al.* Mutations in the β-tubulin gene *TUBB5* cause microcephaly with structural brain abnormalities. *Cell Rep.* **2**, 1554–1562 (2012).
11. Bilgüvar, K. *et al.* Whole-exome sequencing identifies recessive *WDR62* mutations in severe brain malformations. *Nature* **467**, 207–210 (2010).
12. Manzini, M.C. & Walsh, C.A. What disorders of cortical development tell us about the cortex: one plus one does not always make two. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**, 333–339 (2011).
13. Veltman, J.A. & Brunner, H.G. *De novo* mutations in human genetic disease. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 565–575 (2012).

© 2013 Nature America, Inc. All rights reserved.

14. Vissers, L.E. *et al.* A *de novo* paradigm for mental retardation. *Nat. Genet.* **42**, 1109–1112 (2010).
15. Li, Y. *et al.* Resequencing of 200 human exomes identifies an excess of low-frequency non-synonymous coding variants. *Nat. Genet.* **42**, 969–972 (2010).
16. Sindelar, C.V. & Downing, K.H. An atomic-level mechanism for activation of the kinesin molecular motors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 4111–4116 (2010).
17. Dunn, S. *et al.* Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. *J. Cell Sci.* **121**, 1085–1095 (2008).
18. Nakata, T. & Hirokawa, N. Point mutation of adenosine triphosphate-binding motif generated rigor kinesin that selectively blocks anterograde lysosome membrane transport. *J. Cell Biol.* **131**, 1039–1053 (1995).
19. Homma, N. *et al.* Kinesin superfamily protein 2A (KIF2A) functions in suppression of collateral branch extension. *Cell* **114**, 229–239 (2003).
20. Kumar, P., Henikoff, S. & Ng, P.C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat. Protoc.* **4**, 1073–1081 (2009).
21. Ramensky, V., Bork, P. & Sunyaev, S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res.* **30**, 3894–3900 (2002).
22. Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y. & Niwa, S. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 682–696 (2009).
23. Poirier, K. *et al.* Expanding the spectrum of TUBA1A-related cortical dysgenesis to polymicrogyria. *Eur. J. Hum. Genet.* **21**, 381–385 (2013).
24. Harms, M.B. *et al.* Mutations in the tail domain of *DYNC1H1* cause dominant spinal muscular atrophy. *Neurology* **78**, 1714–1720 (2012).
25. Weedon, M.N. *et al.* Exome sequencing identifies a *DYNC1H1* mutation in a large pedigree with dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Am. J. Hum. Genet.* **89**, 308–312 (2011).
26. Carter, A.P. *et al.* Structure and functional role of dynein's microtubule-binding domain. *Science* **322**, 1691–1695 (2008).
27. Gibbons, I.R. *et al.* The affinity of the dynein microtubule-binding domain is modulated by the conformation of its coiled-coil stalk. *J. Biol. Chem.* **280**, 23960–23965 (2005).
28. Wise, D.O., Krahe, R. & Oakley, B.R. The γ-tubulin gene family in humans. *Genomics* **67**, 164–170 (2000).
29. Kollman, J.M., Merdes, A., Mourey, L. & Agard, D.A. Microtubule nucleation by γ-tubulin complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 709–721 (2011).
30. Melki, R., Vainberg, I.E., Chow, R.L. & Cowan, N.J. Chaperonin-mediated folding of vertebrate actin-related protein and γ-tubulin. *J. Cell Biol.* **122**, 1301–1310 (1993).
31. Erickson, R.P. Somatic gene mutation and human disease other than cancer: an update. *Mutat. Res.* **705**, 96–106 (2010).
32. de Ligt, J. *et al.* Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1921–1929 (2012).
33. Dobyns, W.B. *et al.* Differences in the gyral pattern distinguish chromosome 17–linked and X–linked lissencephaly. *Neurology* **53**, 270–277 (1999).
34. Tsurusaki, Y. *et al.* A *DYNC1H1* mutation causes a dominant spinal muscular atrophy with lower extremity predominance. *Neurogenetics* **13**, 327–332 (2012).
35. Willemsen, M.H. *et al.* Mutations in *DYNC1H1* cause severe intellectual disability with neuronal migration defects. *J. Med. Genet.* **49**, 179–183 (2012).
36. Higginbotham, H.R. & Gleeson, J.G. The centrosome in neuronal development. *Trends Neurosci.* **30**, 276–283 (2007).
37. Wynshaw-Boris, A., Pramparo, T., Youn, Y.H. & Hirotsune, S. Lissencephaly: mechanistic insights from animal models and potential therapeutic strategies. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**, 823–830 (2010).
38. Kanai, Y. *et al.* KIF5C, a novel neuronal kinesin enriched in motor neurons. *J. Neurosci.* **20**, 6374–6384 (2000).
39. Harada, A. *et al.* Golgi vesiculation and lysosome dispersion in cells lacking cytoplasmic dynein. *J. Cell Biol.* **141**, 51–59 (1998).
40. Hafezparast, M. *et al.* Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science* **300**, 808–812 (2003).
41. Ori-McKenney, K.M. & Vallee, R.B. Neuronal migration defects in the Loa dynein mutant mouse. *Neural Dev.* **6**, 26 (2011).
42. Shu, T. *et al.* Ndel1 operates in a common pathway with LIS1 and cytoplasmic dynein to regulate cortical neuronal positioning. *Neuron* **44**, 263–277 (2004).

© 2013 Nature America, Inc. All rights reserved.

ONLINE METHODS

Subjects. Blood or DNA samples from affected individuals and their parents and informed consent were obtained from all participants according to local institutional review board guidelines. We selected 16 cases with either lissencephaly (6 cases) or polymicrogyria (10 cases) in association with at least one of the following features: microcephaly or dysgenesis of the cerebellum, brainstem, basal ganglia or corpus callosum. Subjects with lissencephaly included those with agyria, pachygyria or subcortical laminar heterotopia, and subjects with polymicrogyria included those with perisylvian, frontal, diffuse and multifocal polymicrogyria.

We used an additional cohort of 162 cases comprising 80 individuals with polymicrogyria, 58 with lissencephaly and 24 with predominant posterior pachygyria to perform extensive screening of candidate genes. These included 57 cases with microcephaly, 74 with dysgenesis or agenesis of the corpus callosum, 18 with dysmorphic basal ganglia and 38 with cerebellar vermian and/or hemispheric hypoplasia or dysplasia.

We analyzed all affected individuals' DNAs by comparative genomic hybridization (CGH) microarray using the NimbleGen chip 720,000-probes (720 K) array (Roche-NimbleGen) to exclude potential pathogenic copy-number variations. Metabolic screening was performed to exclude metabolic disorders. Likewise, we screened the coding regions of *DCX*, *PAFAH1B1*, *ARX*, *TUBA1A*, *TUBB2B*, *TUBB3* and *GPR56* to exclude pathogenic mutations[43–46].

Genotyping. We performed high-throughput microarray genotyping of approximately 262,000 SNPs using one array (version NspI) from the Affymetrix GeneChip Human Mapping 500K Array set (Affymetrix) following the recommended protocol as described in the Affymetrix manual.

WES and analysis. Library generation, exome enrichment and WES were performed at the French National Centre for Genotyping (CNG, Evry, France). Briefly, libraries were prepared from 3 µg genomic DNA extracted from whole blood using an optimized SureSelect Human Exome kit (Agilent) following the manufacturer's instructions. Captured, purified and clonally amplified libraries targeting the exome were then sequenced on a HiSeq 2000 (Illumina) according to the manufacturer's recommendations. Obtained sequence reads were aligned to the human genome (hg19) using BWA software[15]. Downstream processing was carried out with the Genome analysis toolkit (GATK)[47,48], SAMtools[49] and Picard Tools (http://picard.sourceforge.net/). Single-nucleotide variants and indels were subsequently called by the SAMtools suite (mpileup, bcftools, vcfutil). All calls with a read coverage ≤5× and a Phred-scaled SNP quality of ≤20 were filtered out. Substitution and variation calls were made with the SAMtools pipeline (mpileup). Variants were annotated with an in-house Paris Descartes bioinformatics platform pipeline based on the Ensembl database (release 67)[50].

Variations validation and gene screening. After exome analysis, each selected variant was confirmed by PCR and direct sequencing using DNA from the patient and his or her parents. For each patient, the complete *TUBG1* and *KIF5C* coding sequences and splice sites, as well as exons corresponding to the AAA1 and stalk domains of *DYNC1H1*, were amplified in independent PCR reactions from genomic DNA and sequenced using BigDye dideoxy terminator chemistry and an ABI3700 DNA analyzer (Applied Biosystems). Primer sequences and positions, PCR conditions and product sizes are available upon request.

Protein modeling. Amino acid substitutions were plotted on the solved protein structures for rat kinesin, the human KIF2A nucleotide binding domain, human TUBG1 and the mouse Dync1h1 stalk domain in fusion with seryl-tRNA synthetase from *T. thermophilus* using PyMOL software (http://www.pymol.org/). Models were built by homology modeling using Research Collaboratory for Structural Bioinformatics PDB codes 3KIN, 2GRY, 3CB2 and 3ERR. Images in **Figures 1–4** were rendered using PyMOL.

Cloning, expression and *in vitro* translation. A plasmid containing the full-length sequence of *KIF5C* was provided by Professor F.A. Stephenson (School of Pharmacy, University of London). A sequence encoding the N-terminal 380 residues of KIF5C containing a C-terminal His_6 tag was generated from this clone by PCR. Sequences encoding full-length human γ-tubulin were from B.R. Oakley[30]. A sequence encoding the DYNC1H1 microtubule binding domain was obtained by PCR using a human brain cDNA library (Clontech) as a template and inserted into the seryl-tRNA synthetase 12 heptad–containing α-registry fusion construct described by Carter *et al.*[26] (GenBank FJ039866). Mutations were introduced by site-directed mutagenesis using the QuikChange II kit (Stratagene). For experiments requiring *in vitro* expression, sequences were inserted into the pET23b vector (Novagen, EMD Millipore Germany) and used to drive expression in either rabbit reticulocyte lysate (TNT, Promega) containing ^{35}S-methionine or in *E. coli* BL21DE3 pLysS, in which synthesis of endogenous *E. coli* proteins was suppressed by incubation in the presence of rifampicin[51]. In bacterial expression experiments, lysis was effected 2 h after induction with isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) by two successive cycles of freezing and thawing followed by incubation with DNAse I and centrifugation as previously described[52]. Affinity purification of His_6-tagged proteins from the resulting supernatants was done with solid phase–bound Co^{2+} beads using the protocol recommended by the manufacturer (Clontech). The purity of the expressed proteins was checked by SDS-PAGE. In some experiments, the integrity of *in vitro*–translated wild-type and mutant forms of γ-tubulin was assessed by measuring its susceptibility to digestion with proteinase K as described[53].

Gel filtration analyses. The migration properties of the recombinant wild-type and mutant forms of KIF5C sequences containing the motor domains and a portion of the stalk domain were assessed on a column (1.0 cm × 30 cm) of Superose 6 using fast protein liquid chromatography (FPLC) (GE) run in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2, containing 0.1 M NaCl, 0.5 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) and 1 mM dithiothreitol (DTT) (buffer K). The products of *in vitro* TNT reactions done in rabbit reticulocyte lysate (10 µl) were diluted with 0.1 ml of buffer K supplemented with 20 µM GTP and centrifuged for 15 min at 100,000*g* at 4 °C to remove all particulate material. The resulting supernatant was applied to the Superose 6 column equilibrated and run in buffer K containing 20 µM GTP and 5% (vol/vol) glycerol. Radioactivity contained in 0.5-ml fractions was measured in 20 µl aliquots by scintillation counting, and further aliquots were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. Radioactivity contained in the band corresponding to γ-tubulin was quantified using a phosphorimager.

Measurement of rates of ATP hydrolysis. ATP hydrolysis by recombinant wild-type and p.Glu237Val mutant forms of KIF5C was measured in 20-µl reactions containing 1.0 pmol of purified protein in 20 mM PIPES buffer, pH 6.9, 1.0 mM $MgCl_2$, 0.5 mM ATP and 1.0 mg (measured as total protein) of taxol-polymerized microtubules. Reaction mixtures were incubated at 30 °C. At various intervals, aliquots (2.0 µl) were withdrawn, and the inorganic phosphate content was measured using the malachite green phosphomolybdate assay[54].

Microtubule binding assays. Microtubules purified from bovine brain[55] were depolymerized in 20 mM PIPES buffer, pH 6.9, 1 mM $MgCl_2$ and 1 mM EGTA by incubation on ice and cleared by centrifugation at 60,000*g* for 10 min. Purified ^{35}S-labeled KIF5C (in the range 0.2–6.9 nmoles) or ^{35}S-labeled chimeric seryl-tRNA synthetase containing the DYNC1H1 microtubule binding domain was added to reactions (10 µl) containing 2.0 mg/ml depolymerized tubulin, 1 mM GTP, 0.5 mM AMP-PNP and 20 mM taxol, and the mixtures were incubated at 30 °C for 20 min. Reaction products were loaded onto cushions (0.25 ml) containing 1 M sucrose in 40 mM MES, pH 6.8, 0.5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM EGTA, 0.5 mM GTP, 0.25 mM AMP-PNP and 10 mM taxol contained in 1.5 ml Eppendorf tubes and centrifuged for 15 min at 100,000*g* at 30 °C in a Beckman TL-100 rotor. The protein and radioactivity content of the resulting microtubule pellets (in the case of reactions done with bacterially expressed KIF5C proteins) or pellets and supernatants (in the case of experiments done with *in vitro*–translated KIF5C and dynein heavy chain fragments) was determined following SDS-PAGE.

Folding of KIF2A nucleotide binding domains. Sequences spanning the centrally located nucleotide binding domain of human KIF2A (residues 126–526) were obtained by PCR using full-length cloned wild-type (Origene)

© 2013 Nature America, Inc. All rights reserved.

doi:10.1038/ng.2613

or mutant-bearing cDNAs as a template, and the products were inserted in frame with a C-terminal His_6 tag into the pET23b vector using the NdeI and NotI sites. Proteins were expressed in *E. coli* BL21 DE3 cells after induction with 1.0 mM IPTG at an absorbance at 600 nm (A_{600}) of 1.0. At 2.5 h after induction, cells were harvested by centrifugation, washed by resuspension in 0.3 M NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 0.1 mM ATP and 50 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) buffer, pH 7.5, and lysed by three brief pulses of sonication at 0 °C. A particle-free supernatant was obtained after two centrifugations at 30,000*g* and 200,000*g* at 4 °C. The supernatants were applied to columns of Talon cobalt affinity beads (Clontech) and eluted in imidazole-containing buffer. Samples were analyzed by 9% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. In some cases, the gel content was transferred to nitrocellulose and probed with a mouse monoclonal antibody to His_6.

Cell culture, transfections and immunofluorescence. PCMV6 plasmids containing full-length human *KIF2A* (SC117315) or *KIF5C* (RC218796) cDNAs were purchased from Origene. Mutations were introduced by site-directed mutagenesis using a QuikChange II kit. Constructs were transfected into COS-7 or human fibroblast cells using a Neon transfection system (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Cells were then grown on glass coverslips in DMEM containing 10% (vol/vol) FCS. After paraformaldehyde fixation, immunostaining was performed with either a rabbit polyclonal antibody to KIF2A (ab37005, Abcam Inc.) or an antibody to KIF5C (ARP54736, Aviva Systems Biology or ab5630, Abcam) together with a mouse monoclonal antibody to α-tubulin (DM1A, Sigma-Aldrich) used at dilutions of 1:6,000, 1:500 and 1:1,000, respectively.

Yeast strains and plasmids. The yeast strains used in this study were Y20000 (*MAT*a/*MAT*α; *his3Δ 0/his3Δ 0; leu2Δ /leu2Δ 0; met15Δ 0/MET15; LYS2/lys2Δ 0; ura3Δ 0/ura3Δ 0*), all provided by EUROSCARF. The p.Trp92Cys and p.Val387Pro mutations were obtained by direct mutagenesis of the *TUB4* gene carried by the plasmid pKanTUB4::LEU2, using the QuikChange II kit and following the manufacturer's instructions.

Measurement of yeast microtubule dynamics *in vivo*. Cells were seeded and grown overnight in SD complete medium at 30 °C followed by a reseed at 30 °C to the mid-log phase. Cells were pelleted, resuspended in SD complete medium, imaged on an Axio Image MI (Zeiss) microscope with a ×100 Plan Fluor 1.4 numerical aperture (N.A.) objective and captured using a CoolSNAP HQ camera (Photometrics). A typical acquisition protocol acquired five z-series fluorescent images at 0.5-mm axial steps and one differential interference contrast (DIC) image corresponding to the central fluorescent image. Time-lapse image series were acquired at 10-s intervals during 10 min.

shRNA constructs. We conducted RNAi experiments using shRNA constructs commercially designed and provided by Origene. Four different 29-mer sequences cloned in the pGFP-V-RS vector and targeting mouse *Tubg1* mRNA were used to identify the most efficient shRNA construct. Plasmid constructs corresponding to CAGGS-RFP and a HuSH 29-mer noneffective (scrambled; Origene) were used as controls. Efficiency experiments were conducted in N2a cells, normalized by amplification of cyclophilin A and quantified by quantitative PCR using the SYBR Green master mix and a LC480 LightCycler instrument (Roche) according to the manufacturer's instructions.

***In utero* electroporation.** Swiss mice (Janvier) were mated, maintained and used in our animal facilities in accordance with European Union and French legislation. Timed pregnant mice (E14.5) were anesthetized with isoflurane (2 l per min of oxygen, 4% isoflurane during sleep and 2% isoflurane during surgery operation; Minerve). The uterine horns were exposed, and a lateral ventricle of each embryo was injected using pulled glass capillaries and a microinjector (Picospritzer II; General Valve Corp) with Fast Green (2 μg/ml; Sigma) combined with the following DNA constructs: 0.5 mg/ml pCAGGS-RFP (mRFP) either alone or together with 2 μg or 3 μg of shRNA construct at 1.0 mg/ml targeting *Tubg1* mRNA (or scramble or wild-type cDNA). Plasmids were further electroporated on the head of the embryo by discharging a 4500 mF capacitor charged to 45 V with a CUY21EDIT electroporator (Sonidel Ltd) in five electric pulses of 50 ms at 950-ms intervals. Embryonic mice were electroporated at E14.5, and then their brains were harvested after 4 d of development (E18.5), sectioned in 80-μm slices using a VT1000S vibratome (Leica Microsystems) and maintained in 0.01% azide-PBS buffer.

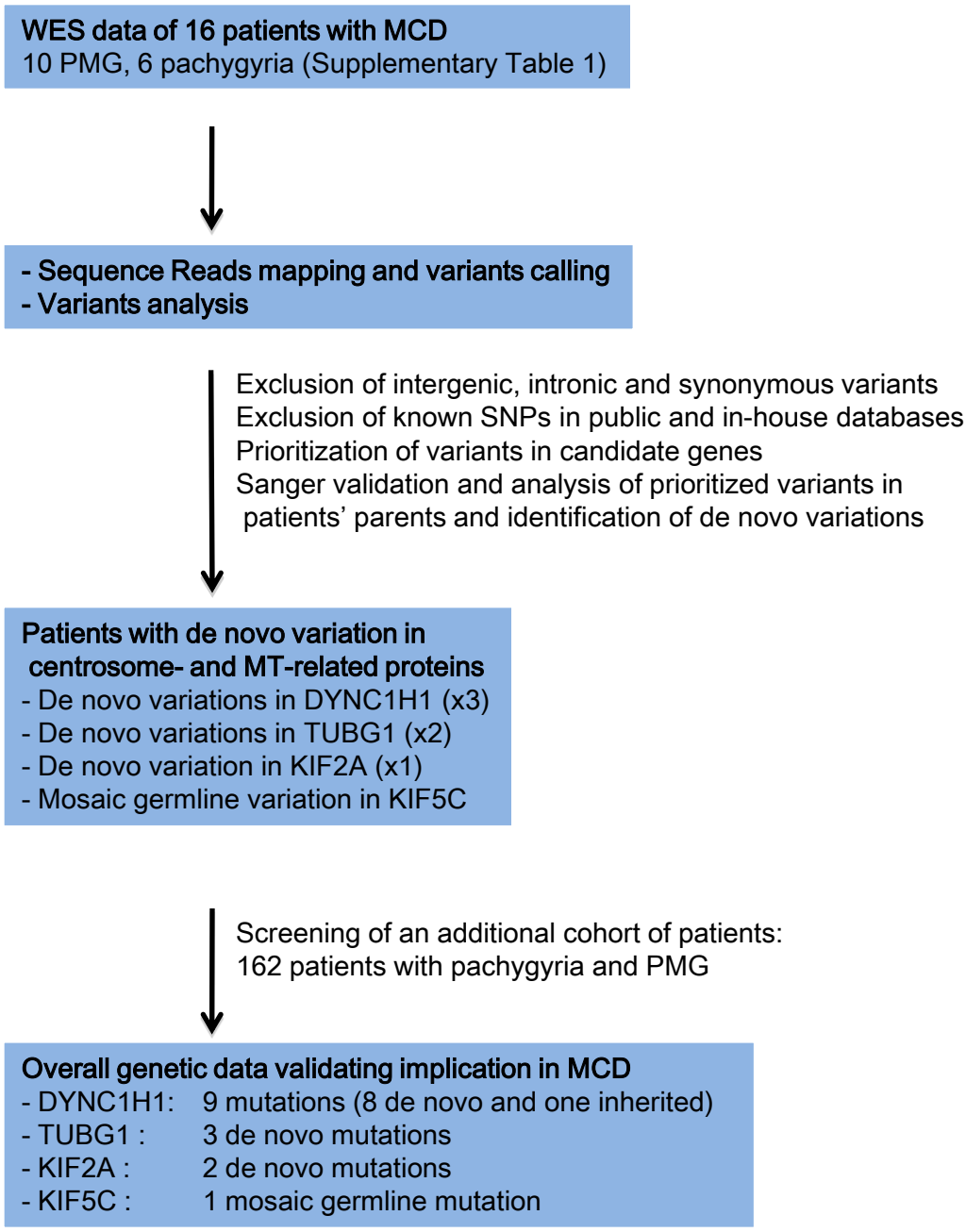
43. Keays, D.A. *et al.* Mutations in α-tubulin cause abnormal neuronal migration in mice and lissencephaly in humans. *Cell* **128**, 45–57 (2007).
44. Poirier, K. *et al.* Large spectrum of lissencephaly and pachygyria phenotypes resulting from *de novo* missense mutations in tubulin α 1A (TUBA1A). *Hum. Mutat.* **28**, 1055–1064 (2007).
45. Jaglin, X.H. *et al.* Mutations in the β-tubulin gene *TUBB2B* result in asymmetrical polymicrogyria. *Nat. Genet.* **41**, 746–752 (2009).
46. Poirier, K. *et al.* Mutations in the neuronal ss-tubulin subunit *TUBB3* result in malformation of cortical development and neuronal migration defects. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 4462–4473 (2010).
47. McKenna, A. *et al.* The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* **20**, 1297–1303 (2010).
48. DePristo, M.A. *et al.* A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat. Genet.* **43**, 491–498 (2011).
49. Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078–2079 (2009).
50. Flicek, P. *et al.* Ensembl 2012. *Nucleic Acids Res.* **40**, D84–D90 (2012).
51. Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. & Dubendorff, J.W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60–89 (1990).
52. Gao, Y., Thomas, J.O., Chow, R.L., Lee, G.H. & Cowan, N.J. A cytoplasmic chaperonin that catalyzes β-actin folding. *Cell* **69**, 1043–1050 (1992).
53. Tian, G., Vainberg, I.E., Tap, W.D., Lewis, S.A. & Cowan, N.J. Specificity in chaperonin-mediated protein folding. *Nature* **375**, 250–253 (1995).
54. Bernal, C., Palacin, C., Boronat, A. & Imperial, S. A colorimetric assay for the determination of 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase activity. *Anal. Biochem.* **337**, 55–61 (2005).
55. Shelanski, M.L., Gaskin, F. & Cantor, C.R. Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 765–768 (1973).

© 2013 Nature America, Inc. All rights reserved.

Supplementary Data

Supplementary Figure 1. Experimental workflow for detecting and prioritising sequence variants, and validation of MCD-related genes.

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613



Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613

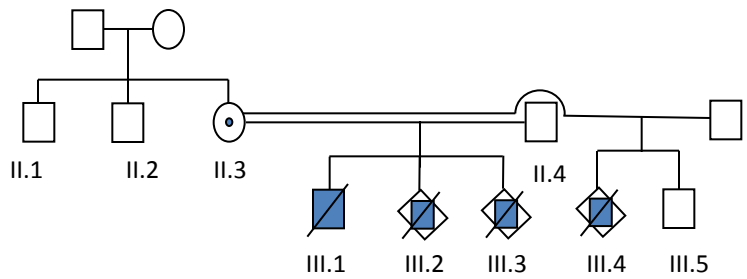
Supplementary Figure 1

Supplementary Figure 2. Genetic analysis of the P20 family

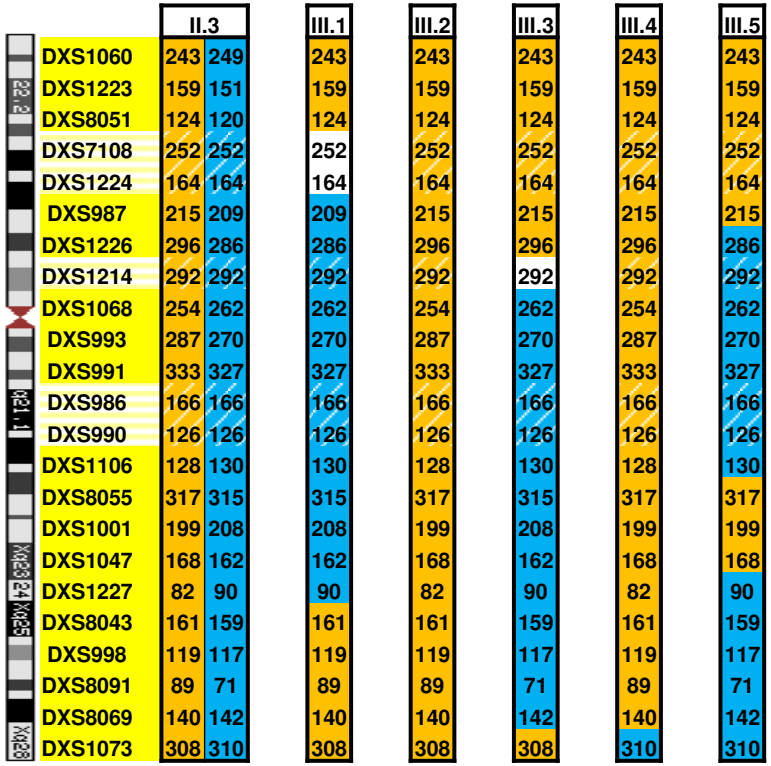
(a) Pedigree of the P20 family. Solid symbols represent affected individuals; central dots represent obligate carrier individuals. The III.3 subject was chosen to undergo exome sequencing. (b) X chromosome genotyping of P20 family members. Note that this analysis excludes X-linked transmission of the pathology. (c) Linkage analysis (with lod score value) for chromosome SNPs showing the non-excluded interval of 44.5Mb (with a lod score of 0.9). (d) Haplotypes neighboring *KIF5C* for II.3, III.4 and III.5 individuals. This reveals the transmission of the same haplotype from the mother to the two brothers (III.4 (affected) and III.5 (unaffected)), reinforcing the hypothesis of transmission of a germline mosaic mutation in *KIF5C* (M: mutated KIF5C; N: normal KIF5C) (e) chromatograms for P20 individuals showing normal and mutated sequences of *KIF5C*. Note the co-segregation of the mutation with the phenotype.

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613

a



b

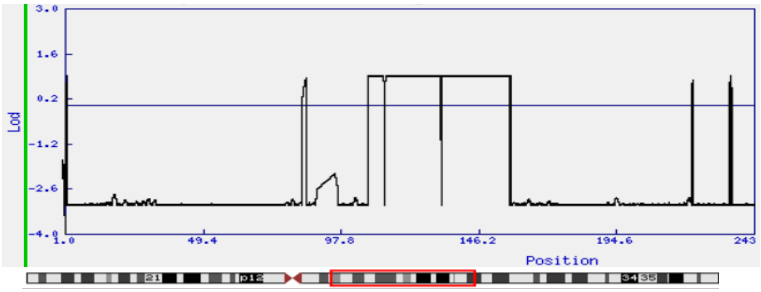


	II.3		III.1	III.2	III.3	III.4	III.5
DXS1060	243	249	243	243	243	243	243
DXS1223	159	151	159	159	159	159	159
DXS8051	124	120	124	124	124	124	124
DXS7108	252	252	252	252	252	252	252
DXS1224	164	164	164	164	164	164	164
DXS987	215	209	209	215	215	215	215
DXS1226	296	286	286	296	296	296	286
DXS1214	292	292	292	292	292	292	292
DXS1068	254	262	262	254	262	254	262
DXS993	287	270	270	287	270	287	270
DXS991	333	327	327	333	327	333	327
DXS986	166	166	166	166	166	166	166
DXS990	126	126	126	126	126	126	126
DXS1106	128	130	130	128	130	128	130
DXS8055	317	315	315	317	315	317	317
DXS1001	199	208	208	199	208	199	199
DXS1047	168	162	162	168	162	168	168
DXS1227	82	90	90	82	90	82	90
DXS8043	161	159	161	161	159	161	159
DXS998	119	117	119	119	117	119	117
DXS8091	89	71	89	89	71	89	71
DXS8069	140	142	140	140	142	140	142
DXS1073	308	310	308	308	308	310	310

Excluded region

non informative region

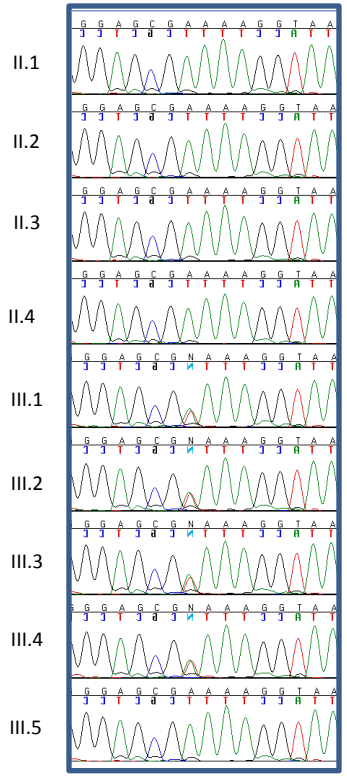
c



d

		II.3		III.4		III.5	
D2S112	133,12Mb	163	165	163	161	163	157
D2S151	147,78Mb	237	239	237	237	237	241
KIF5C	**149,63-149,88Mb**	N	N	M	N	N	N
D2S2241	154,51Mb	93	97	93	93	93	97
D2S142	156,28Mb	274	268	274	276	274	274

e



p.E237V

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613

Supplementary Figure 2

Supplementary Figure 3. Functional consequences, expression and sublocalization of the p.E237V *KIF5C* mutation.

(a) Allelic expression of *KIF5C* in lung and brain tissues from the fetus-III.4 of P20 family. Primers hsKIF5C-3F TGCGTATGGGCAGACTTCATCAGGA and hsKIF5C-10R CCGAGTCATCTTGCTGTCCCGGT were used to perform RT-PCR experiments. These primers correspond to sequences that are located in exons 3 and 10 (separated by a distance of 120 kb) and allowed the amplification of a 610 bp cDNA fragment. Electrophoregrams show cDNA sequences around the mutations and illustrate expression of both alleles in these tissues. Note that these results indicate that KIF5C is not imprinted (at least in these two tissues). (b) Expression and purification of recombinant wild type and p.E237V mutant KIF5C proteins containing the motor domain, neck domain and a portion of the coiled-coil stalk. C-terminally His_6-tagged sequences encoding AA 1-380 of KIF5C were cloned into the pET23b vector and the recombinant proteins expressed in *E. coli* BL21 DE3 pLysS. Each protein was purified from soluble extracts of the host cells by affinity selection on a column of Co^{++}-bound agarose, and the purity of the product assessed by SDS-PAGE. Left hand tracks, total soluble protein extracts; right hand tracks, affinity purified proteins. (c) Recombinant KIF5C proteins behave as dimers. Purified recombinant wild type and mutant (p.E237V) form of KIF5C were analyzed by gel filtration on Superose 6. Note that relative to globular marker proteins (arrowed: thyroglobulin [black; 670kDa], IgG [orange; 158kDa], ovalbumin [purple; 44kDa], myoglobin [red; 17kDa]) both recombinant proteins migrate at a position consistent with their existence as dimers associated via their content of coiled-coil stalk domain. (d) MRI of the III.1 Patient from the P20 family. Axial T1 and T2 weighted images performed at 5 days of life show frontal and perisylvian coarse polymicrogyria. Sagittal T1-weighted section shows thin corpus callosum with normal brainstem and cerebellar vermis.

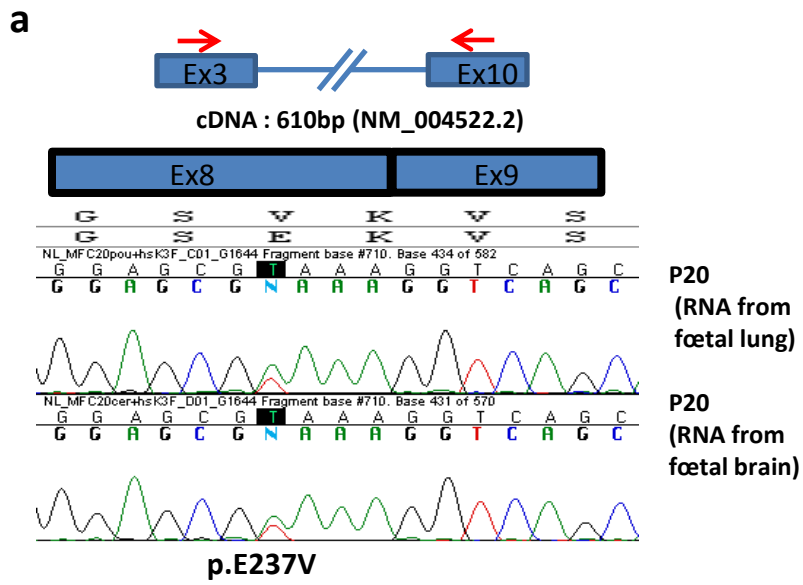
Briefly, the proband (Patient III.1) was the second child of non-consanguineous parents. Intrauterine growth retardation, severe arthrogryposis and microcephaly (-4 SD) were noted at birth. Clonic seizures started during the first months of life, controlled with carbamazepine. Brain MRI performed at 7 days showed a thin cortex with irregularly bumpy sulci and an irregular interface between the cortex and white matter over both frontal regions. We considered these MRI features to be compatible with a diagnosis of PMG. Subsequently, the mother had 3 medical abortions (around 23 GW) for male foetuses that showed developmental delay and

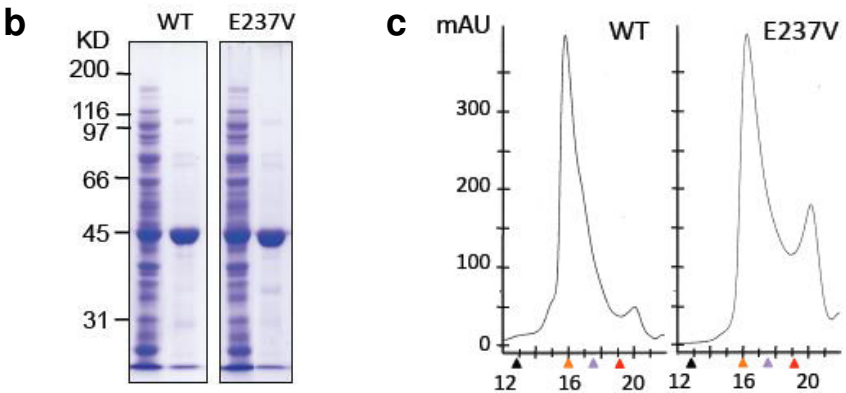
Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613

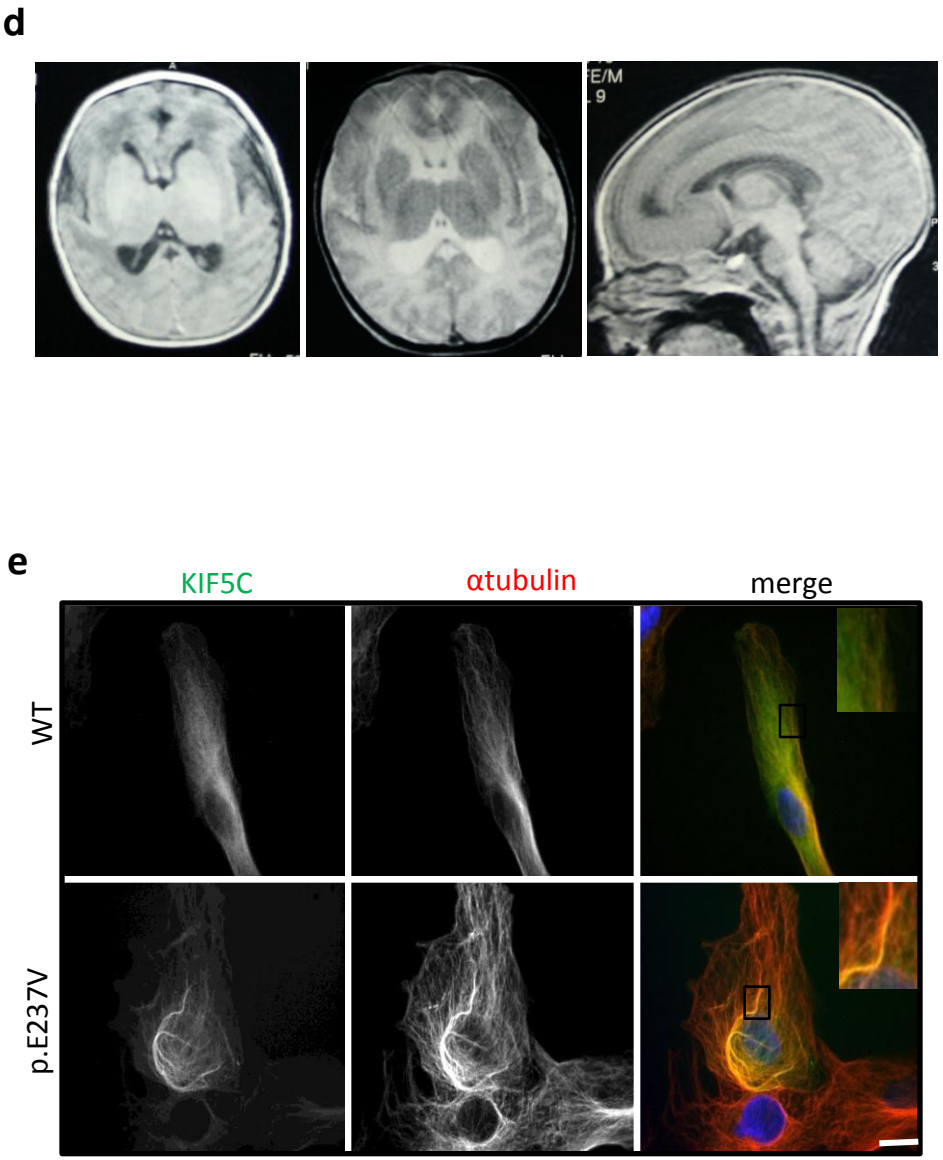
foetal akinesia. Anatomical and histological analyses suggested the presence of malformations that included diffuse polymicrogyria, gyral simplification, delayed development of the cerebellum and brainstem and abnormal positioning of the corticospinal tracts.

(e) Subcellular localization of human wild type and mutant KIF5C (p.E237V) in fibroblasts transfected with promotor-driven cDNA constructs. Note that the p.E237V mutated KIF5C protein (green) co-localises with and decorates MT's (identified by the a-tubulin antibody and revealed in red) but does not appears as cytoplasmic puncta as does the WT KIF5C protein. Scale bar: 20µm

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613







Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613

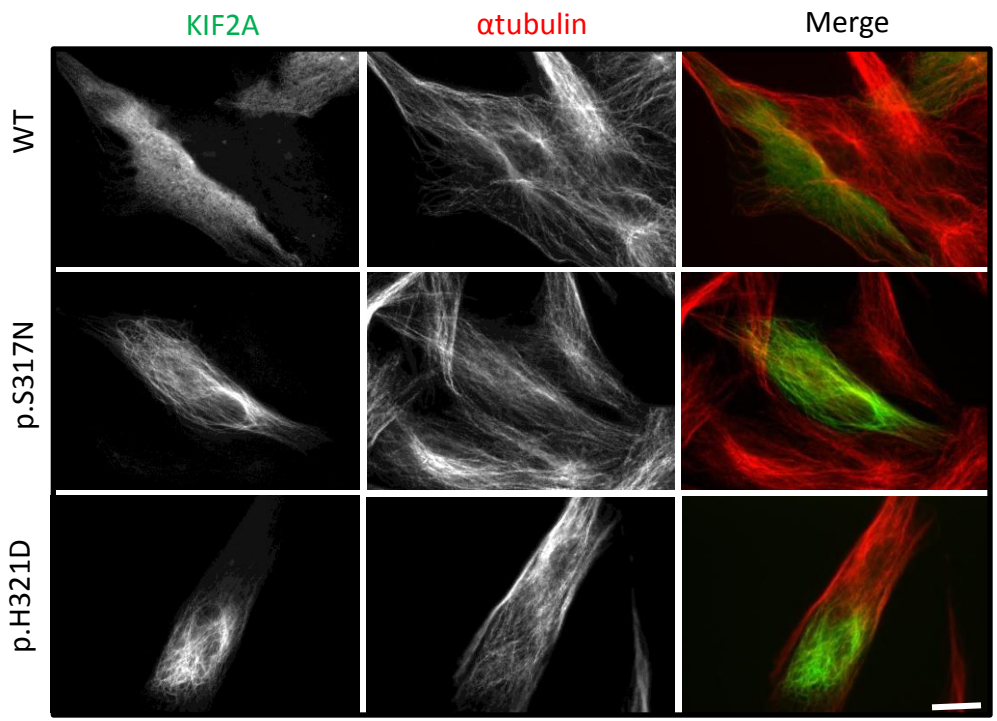
Supplementary Figure3

Supplementary Figure 4. Expression and subcellular localization of KIF2A.

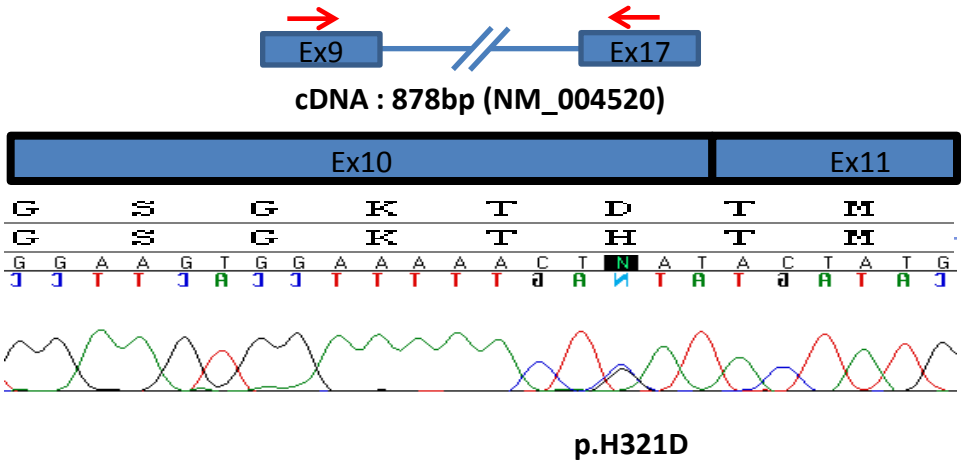
(a) Subcellular localization of wild type and mutant KIF2As (green) in transfected fibroblasts. Note that both KIF2A mutants (p.S317N and p.H321D) co-localize with MTs (red) and are absent from the nucleus, while the KIF2A WT protein shows a diffuse cytoplasmic and nuclear pattern of expression. Centrosomal enrichment is observed in the case of both the WT and mutant KIF2A proteins. Scale bar: 20µm. (b) Allelic expression of KIF2A in fibroblasts derived from the patient with the p.H321D mutation. RT-PCR using hsKIF2A-9F (5-TGACTCAGCTCCTAATGAAATGGT-3) and hsKIF2A-17R (5-TCTGGTTTGGTGGATGGTGC-3) primers allows amplification of the KIF2A cDNA from exon 9 to 17. This reveals biallelic expression of KIF2A in the patient's fibroblasts, indicating that *KIF2A* is not imprinted in this tissue.

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613

a



b



Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613

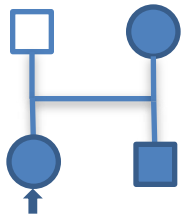
Supplementary Figure 4

Supplementary Figure 5. A dominant form of MCD is associated with the p.K3241T mutation in *DYNC1H1*.

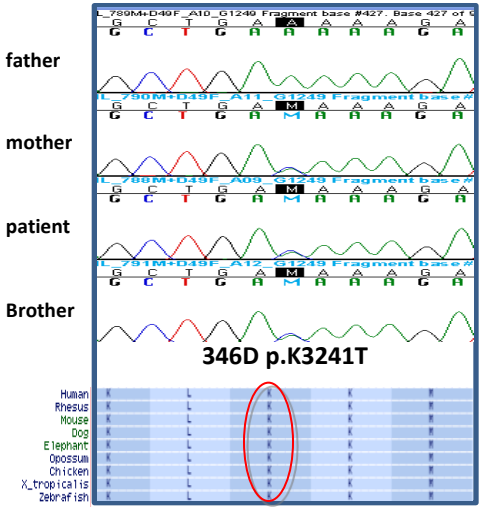
(a) Pedigree of the 346D family. Solid symbols represent affected individuals. (b) Segregation of the *DYNC1H1* mutation in the family (c) Evolutionary conservation of the p.K3241 residue. (d) Axial MRI of the 346D family: mother (upper) and both children (bottom) respectively, showing the same pattern of posterior pachygyria with a thick cortex (asterisk) more pronounced in the two children compared with the less severely affected mother.

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613

a

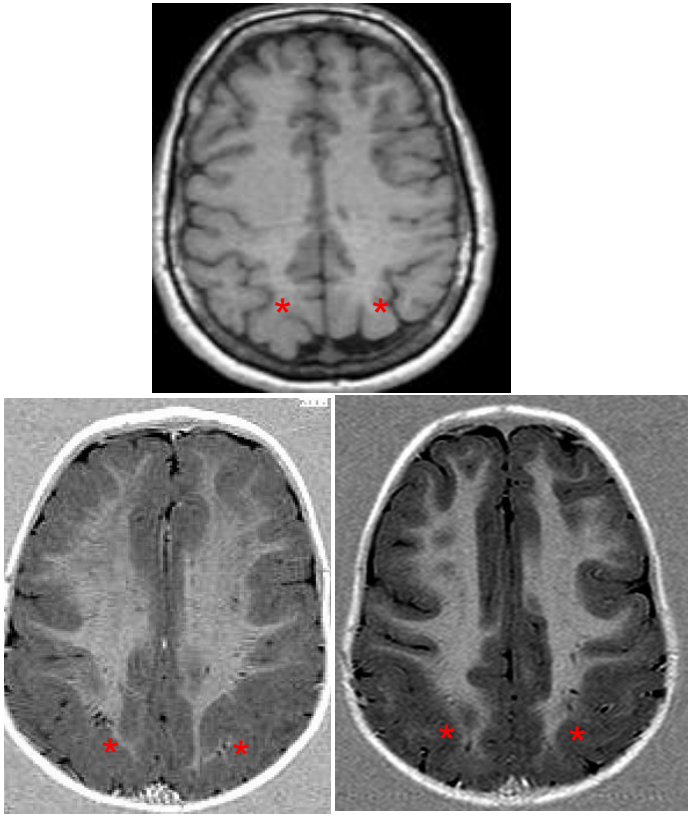


b



c

d



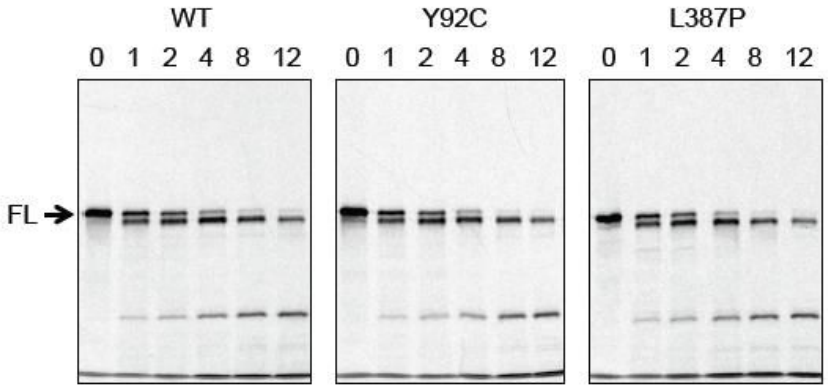
Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613

Supplementary Figure 5

Supplementary Figure 6. Effect of g-tubulin mutations on susceptibility to proteolysis in vitro

^{35}S-methionine-labelled products generated by transcription/translation in rabbit reticulocyte lysate were subjected to proteolysis by incubation with proteinase K as described by Tian et al.[1]. At the times shown (in minutes), aliquots were withdrawn, the reactions quenched by the addition of PMSF and the products analyzed by SDS-PAGE. FL, full-length g-tubulin. Note that the integrity of the recombinant proteins is not significantly affected by either of the disease-associated mutations.

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613



Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613

Supplementary Figure 6

Supplementary Figure 7. Analysis of the consequences of TUBG1 mutations in a yeast (S. cerevisiae) model

(a) Partial protein sequence of human TUBG1 in the region of p.Y92C and p.L387P aligned with *S. cerevisiae* Tub4p sequences. Yeast has a single g-tubulin gene (Tub4p), which shares 40 to 45% sequence identity with mammalian g-tubulin isotypes. Disease-associated residues are conserved but not identical: tyrosine (Y) at position 92 is replaced in yeast by tryptophan (W), while leucine (L) at position 387 is replaced in yeast by valine (V). To examine potential dominant effects of disease-associated mutations, we inserted p.W92C and p.V387P mutations into the yeast *Tub4* locus in heterozygous diploid strains. Three independent heterozygous diploids did not display growth defects on rich medium, establishing that all the mutant heterozygous strains were viable. p.V387P heterozygous diploids were recovered at the expected frequency (90%). In contrast, the p.W92C mutation seemed to be deleterious in that very few (10%) diploid mutants were obtained, showing that even in the heterozygous state the *tub4-W92C* mutation is toxic. However, analysis of mutant homozygotes revealed that the *tub4-W92C* mutation is viable (i.e. spores bearing the mutation were obtained at the expected frequency). *tub4-V387P* haploid spores were also viable when present as the sole copy of *Tub4*. (b) Merged Z stack images showing MTs in WT, p.W92C and p.V387P in budding yeast cells labeled with GFP-Tub1p (a-tubulin, green). Scale bar, 5 mm. To address MT organization in strains bearing the tub4-W92C and tub4-V387P mutations, we imaged cells using a-tubulin labeled with a TUB1::GFP fusion integrated at the *URA3* locus[2]. We found that the spindle pole body (SPB; the yeast equivalent of the centrosome) maintained its essential function. Indeed, for each mutation, MT's were nucleated from the SPB at each cell cycle. To investigate whether the γ-tubulin disease substitutions alter MT dynamics, MT number and/or stability, we examined MT+ end and astral MTs dynamics in living cells[3]. In order to analyse MT + ends dynamics we monitored G1 cell MT + ends labeled with Bik1p-GFP using time-lapse video microscopy. At least 30 MTs were analyzed and no significant differences were observed in tub4-W92C and tub4-V387P compared to wild type cells (Supplementary Table 6). These results suggest that MT + ends dynamics are unaffected in the g-tubulin mutants. We also examined astral MTs in living cells by monitoring dynamic astral MTs in G1 cells. GFP-Bik1p (an a-tubulin binding protein[4]) labeled MTs from heterozygous strains p.W92C and p.V387P were imaged. The p.W92C substitution resulted in

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613

significant changes in measured MT parameters (Supplementary Table 7): we observed an overall enhancement of MT length in p.W92C cells (3.3 +/- 0.25 μm) compared to wild type cells (2.2 +/- 0.14 μm) and p.V387P cells (2.4 +/- 0.15 μm). In addition, the average maximal length of astral MTs also increased in tub4-W92C cells (4.8 +/- 0.33 μm) compared to wild type (3.1 +/- 0.19 μm) and V387P cells (3.3 +/- 0.19 μm), while more numerous MTs were observed in W92C cells (3.4 +/- 0.11 MT/Cell) compared to wild type (2.3 +/- 0.09 MT/cell) and V387P cells (2.5 +/- 0.07 MT/cell). Moreover, we found an effect of the tub4-W92C and tub4-V387P mutations on MT assembly: the frequency at which new MTs emanating from the SPBs became visible (i.e. nucleation or regrowth from existing microtubules) was significantly decreased in tub4-W92C cells (0.5 +/- 0.07 MTs assembled/min) relative to wild-type cells (1.42 +/- 0.11 MTs assembled/min; Supplementary Table 7). Thus, MT lengthening and an enhanced number in tub4-W92C cells is probably a consequence of MT nucleation in a manner that may increase overall polymer stability.

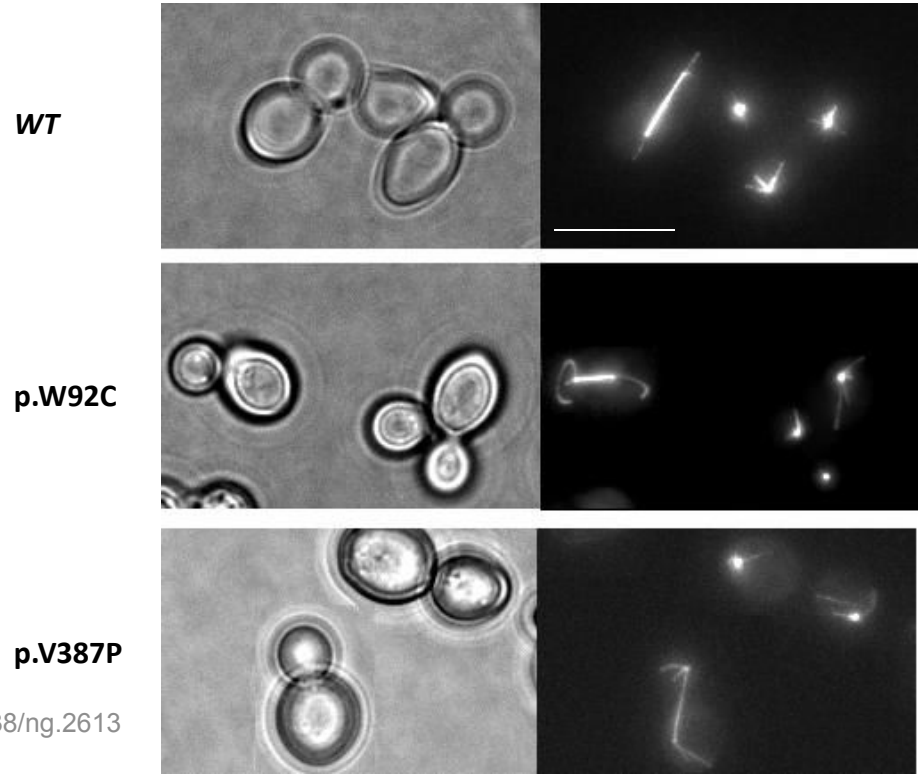
Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613

a

	92
Human γ Tubulin Chain 1	L Y N P E N I **Y** L S E H G G G A G N N W A
Yeast Tub4p	F F D P R N T **W** V A S D G A S A G N S W A

	387
Human γ Tubulin Chain 1	N H T S I S S **L** F E R T C R Q Y D K L R K
Yeast Tub4p	N M S T V V N **V** F E N A C N T F D K V E A

b



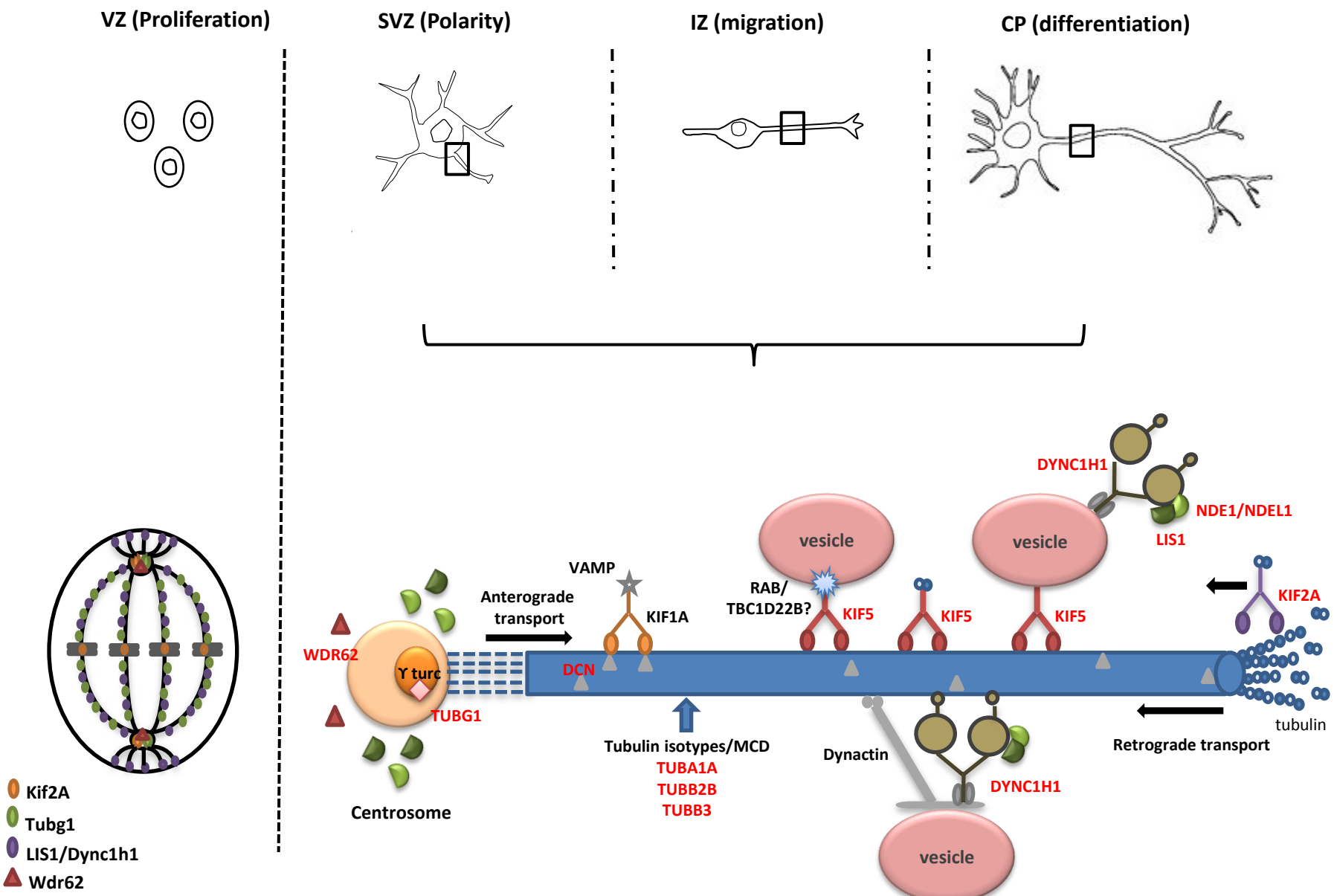
Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613

Supplementary Figure 7

Supplementary Figure 8. MT-dependent transport and MCD

Upper part: Schematic representation of cells in the ventricular zone (VZ), subventricular zone (SVZ), intermediate zone (IZ) and cortical plate (CP) corresponding respectively to progenitor proliferation, neuronal polarity, migration and differentiation steps. Bottom part (left): Representation of a mitotic cell during neuroblast proliferation steps in the VZ. KIF2A, TUBG1 and WDR62 are grouped in the spindle pole body, and KIF2A is also enriched in kinetochores structures. The LIS1/DYNC1H1 complex and TUBG1 proteins are distributed along mitotic spindle MTs with an additional localization of LIS1/DYNC1H1 at astral MT extremities. Bottom (right): Representation of the centrosome, MT and MT-motor protein complexes highlighting a functional coupling between centrosomal and MT-dependent transport proteins as illustrated by the location of MCD-related proteins (shown in red) in both structures. For simplicity, MT-dependent anterograde transport along MTs is shown in the Figure as mediated only by KIF5 and KIF1A. Interaction between KIF5 and LIS1/NDEL1 has been reported to be required for anterograde transport of the dynein-dynactin complex[5]. KIF1A has also been shown to interact with doublecortin (DCN) and mediates VAMP2 transport[6]. Loading and uploading of cargos is dependent on rabGTPases, molecular switches regulated by RabGAPs and RabGEFs, TBC1D22B (a RabGAP protein) is included in the illustration because of the identification of a *de novo* nonsense mutation in patient P386 (with diffuse PMG, Supplementary Table 8). Vesicle retrograde transport is mediated by cytoplasmic heavy chain dynein (DYNC1H1) when associated with dynactin and activated by LIS1/NDE1 or NDEL1 effectors. KIF2A is shown located at MT plus ends where it functions as a MT depolymerase.

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613



Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613

Supplementary Figure 8

Supplementary Table 1. Summary of the phenotype presented by individuals selected for exome sequencing.

Patients are grouped according to the classification proposed by Barkovich[7]. Brain MRI of patients of groups A and B exhibit polymicrogyria (PMG) or lissencephaly phenotypes, respectively. (MCD: malformation of cortical development; CC: corpus callosum; SD: standard deviation; SBH: subcortical band heterotopias; PMG: polymicrogyria; Y: yes; N: normal; F: familial; S: sporadic; post.: posterior.

Group	Patient	Microcephaly	MCD	Basal ganglia	Corpus Callosum	Brainstem	Cerebellum	Familial or sporadic
A	**P20**	(-4SD)	Frontal and perisylvian PMG	N	Thin	N	N	F
A	**P122**	(-4SD)	Post. Pachygyria - Frontal PMG	Dysmorphic	Dysmorphic	Hypoplasic	Vermian hypoplasia	S
A	**P205**	N	Asymetric Fronto-Parietal PMG	Dysmorphic	Post CC agenesis	Hypoplasic	Vermian hypoplasia	S
A	**P317**	N/A	Bifronto-perisylv Pmg	N	Thin	N	N	S
A	**P378**	(- 3SD)	Diffuse PMG	N	Thin	N	N	S
A	**P386**	(- 4SD)	Perisylvian PMG	N	N	Hypoplasic	N	S
A	**P348**	N	Perisylvian PMG	N	Thin	N	N	S
A	**P398**	N	Bifronto-perisylv PMG	N	Dysmorphic	N	N	S
A	**P425**	N	Gyral simplification	N	N	Hypoplasic	Hypoplasic	S
A	**P506**	N	Perisylvian PMG	N	Thin	N	N	S
B	**P217**	(-4SD)	Frontal PMG and perisylvian-post agyria	Dysmorphic	Thick and dysmorphic	Hypoplasic	Vermian hypoplasia	S
B	**P306**	(-2.5 DS)	Post. Agyria and frontal pachygyria	Dysmorphic	Thick and dysmorphic	Hypoplasic	N	S
B	**P351**	(-3SD)	Post. Agyria and frontal pachygyria	N	Thick and dysmorphic	Thin	Hypoplasic	S
B	**P367**	(-5.5SD)	Post. Agyria and frontal pachygyria	N	Thin	N	N	S
B	**P388**	(-4SD)	Post. Agyria and frontal pachygyria	N	Thick and dysmorphic	N	N	S
B	**P462**	(-4SD)	Frontal SBH and post. pachygyria	Dysmorphic	Thin	N	N	S

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613

Supplementary Table 2. Exome sequencing data. For each patient's DNA the mean depth and % of nucleotides with a coverage depth of at least 5X or 15X, respectively, and the total number of detected variations are shown**.** WG: whole genome; Snp: single nucleotide polymorphism; del: deletion; dup: duplication; x/y: heterozygous/homozygous. Note that the same variant can be counted in different types of mutations because of the existence of multiple isoforms for some genes.

Group	Patient	Mean depth	>5X (%)	>15X (%)	Total variations	Total variations (excluding snp>1%	Essential splicing sites	Synonymous	Non-synonymous	In frame del or dup	Frameshift	Stop gain	Start or stop loose
A	**P20**	51	94	83	24058	613	38/2	137/9	403/12	3/0	7/0	26/1	3/1
A	**P122**	48	94	82	20123	246	6/0	67/0	154/4	8/4	5/1	3/0	0/0
A	**P205**	62	95	87	23215	629	24/1	237/7	344/9	14/1	5/0	7/0	3/0
A	**P317**	47	94	83	20790	291	10/0	94/1	161/5	7/0	11/0	7/0	3/0
A	**P348**	64	95	86	20859	323	15/1	108/2	173/6	11/5	10/3	4/0	0/1
A	**P378**	118	96	94	24070	423	14/2	123/1	241/5	17/7	16/4	4/0	1/0
A	**P386**	120	96	94	23534	396	17/3	108/4	205/11	23/4	21/1	10/1	3/0
A	**P398**	45	93	81	20310	316	13/0	88/1	207/0	3/1	4/2	6/0	2/0
A	**P425**	48	94	82	22601	707	20/1	265/4	383/7	17/2	8/2	12/0	4/0
A	**P506**	120	96	94	23452	430	18/3	121/1	215/9	42/4	23/1	8/0	4/1
B	**P217**	81	96	90	20429	260	8/0	72/0	173/0	4/0	4/0	5/0	2/0
B	**P306**	61	95	87	19925	437	10/0	128/0	276/1	9/2	10/1	8/0	1/0
B	**P351**	46	93	80	20411	246	8/1	72/2	159/3	7/3	4/0	4/0	0/0
B	**P367**	55	95	85	19262	263	15/0	77/0	165/0	9/0	5/0	6/0	0/0
B	**P388**	43	93	80	18084	228	10/0	66/1	148/2	4/0	1/1	3/0	1/0
B	**P462**	103	96	94	23686	503	23/3	139/9	281/8	25/7	19/3	4/0	2/0

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613

	mean	70	95	86	21551	394	17	122	236	15	11	7	2
	%						4,1	29,7	57,6	3,7	2,6	1,8	0,5

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613

Supplementary Table 3. Summary of loci (minimum lodscore threshold: 0,9 and length: >1Mb) identified in the P20 family. Identified intervals using the model of an autosomal dominant disorder and a summary of variants identified in the proband (Patient III.1) of the P20 family following exome sequencing.

INTERVAL	Size (Mb)	Total variations	Total variations (excluding snp>1%	Essential splicing	Synonymous	In frame del or dup	Non-synonymous	Frameshift	Stop gained	Start or stop lost
Whole genome		24058	613	38/2	135/9	3/0	398/12	7/0	26/1	3/1
linkage (treshold 0,9, Length 1Mb)	367,3	3015	77	7/1	19/1	2/0	50/0	1/0	1/0	1/0
Chr1 : 159986339-169066351	9,1	78	1	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	0/0	0/0
Chr1 : 201051582-203768328	2,7	61	1	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Chr2 : 107252924-113009021	5,8	43	0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Chr2 : 113046185-157564814	44,5	193	7	2/0	1/0	0/0	5/0	0/0	0/0	0/0
Chr3 : 188043232-197315115	9,3	407	9	0/0	3/0	0/0	6/0	0/0	0/0	0/0
Chr4 : 140729346-145180928	4,5	21	0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Chr4 : 155640777-178501293	22,9	65	1	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Chr5 : 233188-8790528	8,6	70	2	0/0	0/0	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0
Chr5 : 115412737-175074644	59,7	361	12	0/0	5/0	0/0	7/0	0/0	0/0	0/0
Chr7 : 53285915-106106338	52,8	446	12	1/0	2/0	0/0	9/0	0/0	0/0	0/0
Chr7 : 156767585-159072828	2,3	14	0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Chr8 : 55912151-70493974	14,6	22	1	0/0	0/0	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0
Chr9 : 122302024-133481912	11,2	144	6	1/0	1/0	0/0	4/0	0/0	1/0	0/0
Chr10 : 29499570-60265404	30,8	185	3	0/0	1/0	0/0	2/0	0/0	0/0	0/0

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613

Chr10 : 78054402-91629054	13,6	89	1	0/0	0/0	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0
Chr11 : 5451875-21393685	15,9	287	6	3/0	0/0	1/0	4/0	0/0	0/0	1/0
Chr11 : 126768090-134835614	8,2	44	3	0/0	1/0	0/0	2/0	0/0	0/0	0/0
Chr12 : 20158160-24098019	3,9	19	0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Chr14 : 72470336-94266671	21,8	156	6	0/0	2/0	0/0	4/0	0/0	0/0	0/0
Chr15 : 93589177-102162555	8,8	55	0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Chr18 : 14090993-23044024	9,0	47	0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Chr21 : 40448889-47874268	7,6	208	6	0/1	1/1	0/0	4/0	0/0	0/0	0/0

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613

Supplementary Table 4. Summary of clinical and brain imaging phenotypes associated with mutations in *KIF5C, KIF2A, TUBG1* and *DYNC1H1* genes. SD: standard deviation; y: year; m: month; N: Normal; N/A: not available; SBH: subcortical band heterotopia; PMG: polymicrogyria; ID: intellectual disability; post: posterior.

Patient		**P20**	**P462**	**P147**	**P367**	**P388**	**P478**
Genetic	**Gene**	***KIF5C***	***KIF2A***	***KIF2A***	***TUBG1***	***TUBG1***	***TUBG1***
	Refseq	NM_004522.2	NM_001098511	NM_001098511	NM_001070	NM_001070	NM_001070
	cDNA	c.710A>T	c.961C>G	c.950G>A	c.1160T>C	c.275A>G	c.991A>C
	Protein	p.E237V	p.H321D	p.S317N	p.L387P	p.Y92C	p.T331P
	Transmission	Maternal mosaicism	*de novo*	*de novo*	*de novo*	*de novo*	Father DNA's unavailable
	Age at last evaluation	1 m	1 y	4 y	21 y	1.5 y	31 y
Clinic	**Head circumference**	Microcephaly (-4SD)	Microcephaly (-4SD)	Microcephaly (-2.5SD)	Microcephaly (-5.5 SD)	Microcephaly (-4SD)	Normocephaly
	Neurodevelopment	Bedridden	Bedridden	Bedridden	Bedridden	Bedridden	Moderate ID
	Neurological examination	Spastic tetraplegia	Spastic tetraplegia	Spastic tetraplegia	Spastic tetraplegia	Spastic tetraplegia	N/A
	Epilepsy	Early onset epilepsy	Early onset epilepsy	Early onset epilepsy	Early onset epilepsy	Infantile spasms	Early onset epilepsy
	Axonal Neuropathy	N	N/A	N/A	N	N	N/A
	Other signs	Arthrogryposis	IntraUterine Growth Retardation	Nystagmus			Cataract
MRI	**Cortex**	Frontal and perisylvian PMG	Frontal SBH and post. Pachygyria, Thick Cortex	Post. Agyria and frontal Pachygyria	Post. Agyria and frontal Pachygyria, Thick Cortex	Post. Agyria and frontal Pachygyria, Thick Cortex	Post. Pachygyria and post. SBH
	Basal ganglia	N	Dysmorphic	N	N	N	N
	Corpus callosum	Thin	Thin	Thin	Thin	Thick and dysmorphic	Thick and dysmorphic
	Brainstem	N	N	N	N	N	N
	Cerebellum	N	N	N	N	N	N

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613

Patient		P144	P582	P122	P217	P398	P535
Genetic	**Gene**	***DYNC1H1***	***DYNC1H1***	***DYNC1H1***	***DYNC1H1***	***DYNC1H1***	***DYNC1H1***
	Refseq	NM_001376	NM_001376	NM_001376	NM_001376	NM_001376	NM_001376
	cDNA	c.del1976-1987	c.386A>T	c.10008G>T	c.10151G>A	c.4700G>A	c.10031G>A
	Protein	p.del659-662	p.K129I	p.K3336N	p.R3384Q	p.R1567Q	p.R3344Q
	Transmission	*De novo*	*de novo*	*de novo*	*de novo*	*de novo*	*de novo*
	Age at last evaluation	15 y	10 y	12 y	10 y	7 y	5 y
Clinic	**Head circumference**	Microcephaly (-2.5 SD)	Normocephaly	Microcephaly (-4 SD)	Microcephaly (-4 SD)	Normocephaly	Normocephaly
	Neurodevelopment	Bedridden	Severe ID	Bedridden	Bedridden	Severe ID	Severe ID - autistic features
	Neurological examination	Spastic tetraplegia	Normal	Spastic tetraplegia	Spastic tetraplegia	Normal	
	Epilepsy	Early onset epilepsy	Late onset epilepsy	Early onset epilepsy	Early onset epilepsy	Absent	Lennox Gastaut
	Axonal Neuropathy	N/A	N/A	Foot deformities	Foot deformities	Foot deformities	N/A
MRI	**Cortex**	Post. Pachygyria	Post. Pachygyria	Post. Pachygyria - Frontal PMG, Nodular Heterotopia	Post. Pachygyria - Frontal PMG	Frontal PMG	Post. Agyria, Nodular Heterotopia
	Basal ganglia	N	N	Dysmorphic	Dysmorphic	N	Dysmorphic
	Corpus callosum	Thin	Thick	Hypoplasic and Dysmorphic	Dysmorphic	N	Hypoplasic and dysmorphic
	Brainstem	N	N	Hypoplasic	Hypoplasic	N	N
	Cerebellum	N	N	Vermian Hypoplasia	Mild vermian Hypoplasia	N	N

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613

Patient		360J	346D-1	346D-2	346D-mother	574C
Genetic	**Gene**	***DYNC1H1***	***DYNC1H1***	***DYNC1H1***	***DYNC1H1***	***DYNC1H1***
	Refseq	NM_001376	NM_001376	NM_001376	NM_001376	NM_001376
	cDNA	c.5884C>T	c.9722A>C	c.9722A>C	c.9722A>C	c.10031G>A
	Protein	p.R1962C	p.K3241T	p.K3241T	p.K3241T	p.R3344Q
	Transmission	*de novo*	Familial	Familial	Familial	*de novo*
	Age at last evaluation	19 y	11 y	8 y	39 y	3 y
Clinic	**Head circumference**	Normocephaly	Normocephaly	Normocephaly	Normocephaly	25%
	Neurodevelopment	Severe ID	Normal	Mild ID	Normal	Moderate ID
	Neurological examination	Awkwardness	Normal	Awkwardness	Normal	Awkwardness
	Epilepsy	Focal seizures from age 2 m to 8 y	Focal seizures since the age of 2 y 5 m	Focal seizures since the age of 1 y 2 m	Focal epilepsy since the age of 10 y	Focal seizures since the age of 5 m
	Axonal Neuropathy	N	N	N	N	N
MRI	**Cortex**	Predominent post. pachygyria	Post. Pachygyria	Post. Pachygyria	Post. Pachygyria	Predominent post. pachygyria
	Basal ganglia	N	N	N	N	N
	Corpus callosum	N	N	N	N	N
	Brainstem	N	N	N	N	N
	Cerebellum	N	N	N	N	Small vermis

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613

Supplementary Table 5. Summary of Grantham, PolyPhen and Sift scores[8-10] for the identified *KIF5C, KIF2A, TUBG1* and *DYNC1H1* mutations.

Gene	refseq	cDNA	protein	Grantham Score		PolyPhen Score		Sift Score	
KIF5C	NM_004522.2	c.710A>T	p.E237V	121	radical	1,000	Probably Damaging	0,00	Affect Function
KIF2A	NM_001098511	c.961C>G	p.H321D	81	nonconservative	0,963	Probably Damaging	0,02	Affect Function
KIF2A	NM_001098511	c.950G>A	p.S317N	46	conservative	0,996	Probably Damaging	0,00	Affect Function
TUBG1	NM_001070	c.1160T>C	p.L387P	98	nonconservative	1,000	Probably Damaging	0,00	Affect Function
TUBG1	NM_001070	c.275A>G	p.Y92C	194	radical	1,000	Probably Damaging	0,01	Affect Function
TUBG1	NM_001070	c.991A>C	p.T331P	38	conservative	0,989	Probably Damaging	0,06	Tolerated
DYNC1H1	NM_001376	c.del1976-1987	p.del659-662	-	radical	-	Probably Damaging	-	-
DYNC1H1	NM_001376	c.386A>T	p.K129I	102	radical	1,000	Probably Damaging	0,13	Tolerated
DYNC1H1	NM_001376	c.10008G>T	p.K3336N	94	nonconservative	0,998	Probably Damaging	0,07	Tolerated
DYNC1H1	NM_001376	c.10151G>A	p.R3384Q	43	conservative	0,994	Probably Damaging	0,22	Tolerated
DYNC1H1	NM_001376	c.4700G>A	p.R1567Q	43	conservative	1,000	Probably Damaging	0,03	Affect Function
DYNC1H1	NM_001376	c.10031G>A	p.R3344Q	43	conservative	0,817	Potentially Damaging	0,45	Tolerated
DYNC1H1	NM_001376	c.5884C>T	p.R1962C	180	radical	1,000	Probably Damaging	0,00	Affect Function
DYNC1H1	NM_001376	c.9722A>C	p.K3241T	78	nonconservative	0,863	Potentially Damaging	0,04	Affect Function
DYNC1H1	NM_001376	c.10031G>A	p.R3344Q	43	conservative	0,817	Potentially Damaging	0,45	Tolerated

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613

Supplementary Table 6. Number, length and dynamics of Bik1p-GFP labeled astral MTs. In this table G1 MTs were visualized with a Bik1p-GFP fusion in diploid cells. Results are average values ± s.e.m. Values in parentheses are the number of events, except for life-time in which the values in parentheses are the number of MTs. Growing, shortening and pause duration are in minutes. *** p<0.001, non parametric Mann and Whitney test comparisons of mutant cells vs. WT cells.

Strain	Growth rate Shortening rate µm / min	Catastrophe frequency Rescue frequency Events / sec	Growing duration Shortening duration Pausing duration	Lifetime sec
WT	0.74 +/- 0.0001 (54) 0.74 +/- 0.0001 (44)	0.023 +/- 0.003 (34) 0.033 +/- 0.003 (30)	0.44 +/- 0.04 (54) 0.28 +/- 0.02 (44) 0.23 +/- 0.02 (18)	73.4 +/- 6.4 (38)
p.W92C	0.77 +/- 0.01 (64) 0.75 +/- 0.1 (52)	0.022 +/- 0.004 (43) 0.023 +/- 0.005 (39)	0.49 +/- 0.05 (64) 0.39 +/- 0.04 (52) 0.21 +/- 0.02 (22)	101.3 +/- 11.7 (37)
p.V387P	0.75 +/- 0.0001 (63) 0.75 +/- 0.0001 (56)	0.025 +/- 0.004 (52) 0.023 +/- 0.004 (43)	0.42 +/- 0.03 (63) 0.34 +/- 0.03 (56) 0.26 +/- 0.03 (38)	121 +/- 12.2 (30) ***

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613

Supplementary Table 7. MT Assembly rate, number and length of Bik1p-GFP labeled astral and spindle microtubules. Astral microtubules were examined in G1 cells. The frequency at which new MTs appeared at the SPBs (wt, n=10 cells; p.W92C, n= 15 cells; p.V387P, n=14 cells) is shown. Number, length and maximal mean were wt, n=38 MTs; W92C, n= 37 MTs; V387P, n=30 MTs). § Number of new MTs (resulting from either nucleation or regrowth) visible in the region of the SPBs per unit time. *** p<0.001, t test comparisons of mutant cells vs. WT cells.

Strain	MTs Assembled§ Per minute	MT number Per cell	MT length µm	Mean Max length µm
WT	1.42 +/- 0.11	2.3 +/- 0.09	2.2 +/- 0.14	3.1 +/- 0.19
p.W92C	0.5 +/- 0.07***	3.4 +/- 0.11***	3.3 +/- 0.25***	4.8 +/- 0.33***
p.V387P	1.15 +/- 0.08	2.5 +/- 0.07	2.4 +/- 0.15	3.3 +/- 0.19

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613

Supplementary Table 8. Summary of patient phenotypes associated with *de novo* mutations in candidate genes encoding proteins with no apparent relation to the centrosome or to MTs. Note that for 4 patients (317, 348, 306 and 351), no relevant mutations were identified, but inherited variants were found in the following genes: *KIF20B, KIF26A, KIF9* (P317); *KIF9, DNAH3* (P348); *DNAH9, MCPH1* (P306); *DNAH5* (P351). ID: intellectual disability; PMG: polymicrogyria**.**

Group	Patient	Cortical Malformation Group	ID	Epilepsy	Other symptoms	Mutated candidate gene	Mutation (cDNA; protein)	Transmission	(Previously reported Associated disorder; OMIM)
A	**P205**	Asymetric PMG	Moderate	No seizure	Spastic Hemiplegy	*ZNF674*	c.601C>T; p.R201X	X-linked gene. Inherited from the mother	Mental retardation, X-linked; 300573
A	**P317**	BiFrontoParietal PMG	Severe Encephalopathy	Early onset seizure	Microcephaly	No			
A	**P348**	Perisylvian PMG	Moderate	No seizure	Spastic diplegia	No			
A	**P378**	Diffuse PMG	Severe Encephalopathy	Early onset seizure		*GRIN1*	c.1975C>T; p.R659W	*de novo*	Mental retardation, autosomal dominant, 138249
						CHRNB2	c.71G>A; p.W24X	*de novo*	Epilepsy, nocturnal frontal lobe; 118507
A	**P386**	Diffuse PMG	Severe Encephalopathy	No seizure	Swallowing difficulties	*TBC1D22B*	c.1297G>T; p.E433X	*de novo*	None
A	**P425**	Gyral simplification	Severe Encephalopathy	No seizure	Microphtalmy	*SOX2*	c.480C>G; p.Y160X	*de novo*	Optic nerve hypoplasia and abnormalities of the central nervous system; 184429
A	**P506**	Perisylvian PMG	Severe	Neonatal seizures		*SCN2A*	c.4782G>T; p.W1594C	*de novo*	Epileptic encephalopathy
						RAI1	c.2564T>C; p.L855P	*de novo*	Syndromic mental retardation (Smith-Magenis syndrome); 182390
B	**P306**	LIS-Post. Agyria	Severe Encephalopathy	Early onset seizure	Foot deformities	No			
B	**P351**	LIS-Post. Agyria	Severe	Early onset seizure		No			

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613

1. Tian, G., Vainberg, I.E., Tap, W.D., Lewis, S.A. & Cowan, N.J. Specificity in chaperonin-mediated protein folding. *Nature* 375, 250-3 (1995).
2. Straight, A.F., Marshall, W.F., Sedat, J.W. & Murray, A.W. Mitosis in living budding yeast: anaphase A but no metaphase plate. *Science* 277, 574-8 (1997).
3. Carminati, J.L. & Stearns, T. Microtubules orient the mitotic spindle in yeast through dynein-dependent interactions with the cell cortex. *J Cell Biol* 138, 629-41 (1997).
4. Lin, H. et al. Polyploids require Bik1 for kinetochore-microtubule attachment. *J Cell Biol* 155, 1173-84 (2001).
5. Yamada, M. et al. LIS1 and NDEL1 coordinate the plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein. *Embo J* 27, 2471-83 (2008).
6. Liu, J.S. et al. Molecular basis for specific regulation of neuronal Kinesin-3 motors by doublecortin family proteins. *Mol Cell* 47, 707-21 (2012).
7. Barkovich, A.J., Guerrini, R., Kuzniecky, R.I., Jackson, G.D. & Dobyns, W.B. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. *Brain : a journal of neurology* 135, 1348-69 (2012).
8. Grantham, R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* 185, 862-4 (1974).
9. Kumar, P., Henikoff, S. & Ng, P.C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* 4, 1073-81 (2009).
10. Ramensky, V., Bork, P. & Sunyaev, S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res* 30, 3894-900 (2002).

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.2613

RESULTATS

Article 2 :

Les mutations dans le gène *KIF2A* responsables de malformations du développement cortical altèrent la ciliogenèse, la migration neuronale et la prolifération des progéniteurs

KIF2A mutations causing malformations of cortical development alter ciliogenesis, neuronal migration and progenitors proliferation

Loïc Broix, Richard Belvindrah, Ekaterina L Ivanova, Peggy Tilly, Nicolas Lebrun, Hélène Jagline, Giuseppe Muraca, Yoann Saillour, Nathalie Drouot, Frédéric Saudou, Laurent Nguyen, Juliette Godin, Fiona Francis, Maria-Victoria Hinckelmann & Jamel Chelly

We recently reported that missense mutations in the *KIF2A* gene are implicated in malformations of cortical development. The protein encoded by this gene is known to be involved in microtubules disassembly, and is associated to cellular structures including spindle poles and primary cilia. Here, using cellular and *in utero* electroporation approaches, we show that the pathogenic *KIF2A* mutations leads to a combination of neurodevelopmental defects. These include the ectopic localization of migrating neurons associated with a reduced migration velocity, an increase in the pool of neurogenic radial glia as a consequence of a delay in cell cycle exit and disrupted ciliogenesis and localization of KIF2A in the primary cilia. Altogether, our data suggest that a delay in mitotic progression and ciliogenesis contribute to the pathogeny of KIF2A-related MCD.

Introduction

The formation of the complex architecture of the mammalian cortex relies on coordinated developmental processes beginning with an intense phase of progenitor's proliferation in the ventricular zone (VZ) and subventricular zone (SVZ). Following this initial phase of corticogenesis, waves of committed post mitotic cells exit the cell cycle to undergo an active phase of migration. Excitatory projection neurons originate from the VZ and SVZ migrate radially along the radial glia fibers to reach their final destination throughout the cortical wall forming the laminar cortex. Neurons finally

differentiate and acquire identities to establish cortical connectivity by axonal and dendritic extensions.

In human, alterations in one of these developmental processes can lead to neurodevelopmental disorders including malformations of cortical development (MCD) that represent frequent causes of intellectual disability, psychomotor delay and severe epilepsy.

Among the genetic causes involved in MCD disorders, the predominance of genes encoding microtubule (MT)-related proteins is increasingly convincing. For example, mutations in *LIS1* and *DCX*, both of which encode proteins involved in MT homeostasis, are associated with a large spectrum of neuronal migration disorders encompassing agyria, pachygyria and laminar heterotopias (Bahi-Buisson et al., 2013; Gleeson et al., 1998; des Portes et al., 1998; Reiner et al., 1993). In addition to *DCX* and *LIS1* genes, the importance of MTs in the development of the cortex is reflected by the finding that mutations in various tubulin genes, including α-tubulin *TUBA1A*, β-tubulin *TUBB2B*, *TUBB3* and *TUBB* and γ-tubulin *TUBG1*, cause a range of MCD syndromes, now referred to as the tubulinopathies (Bahi-Buisson et al., 2014; Breuss et al., 2012; Jaglin and Chelly, 2009; Keays et al., 2007; Poirier et al., 2010, 2013). These tubulin-related cortical dysgeneses are thought to involve a combination of abnormal neuronal proliferation, migration, differentiation and axonal growth (Breuss et al., 2012, 2016; Jaglin and Chelly, 2009; Poirier et al., 2013; Saillour et al., 2014; Tischfield et al., 2011). More recently, we have reported through whole-exome sequencing, mutations in genes encoding MT-dependent motor proteins *DYNC1H1*, *KIF5C* and *KIF2A* in a wide range of cortical and gyral pattern abnormalities associated with microcephaly, reinforcing the idea that MT-dependent mitotic and post-mitotic processes are major contributors to the pathogenesis of MCD (Poirier et al., 2013).

As far as *KIF2A* is concerned, we have reported two *de novo* missense mutations in *KIF2A* gene identified in patients with posterior predominant pachygyria associated

with microcephaly and highlighted the crucial role of *KIF2A* during cortical development (Poirier et al., 2013).

KIF2A belongs to the Kinesin-13 family which regulates MT end dynamics through its ATP dependent MT-depolymerase activity (Desai et al., 1999; Walczak et al., 2013). Kinesin-13 proteins are largely described for their critical roles in the cell cycle (Ems-McClung and Walczak, 2010). KIF2A is mainly localized at spindle poles to control bipolar spindle assembly and anaphase chromosome movements by destabilizing minus-end MT (Ganem et al., 2005; Jang et al., 2008; Kwon et al., 2016; Manning et al., 2007; Uehara et al., 2013). In addition to its role in the regulation of mitotic process, KIF2A is also implicated in various function in the nervous system. KIF2A is enriched in developing neurons and predominantly accumulated in growth cones where it is required for the regulation of axonal collateral branching and plays also a role in axonal pruning (Homma et al., 2003; Maor-Nof et al., 2013; Noda et al., 1995). Recently, KIF2A was shown to be a key regulator of primary cilia disassembly through its MT-depolymerizing activity at the mother centriole and this activity is regulated by the mitotic kinase PLK1 that plays a crucial role in the coupling between cilia disassembly and cell proliferation (Miyamoto et al., 2015).

In order to better understand pathophysiological mechanisms underlying MCD resulting from KIF2A dysfunction, we investigated the consequences of KIF2A mutants on cortical development. Here we provide evidence revealing that KIF2A mutants led neurodevelopmental defects that combine deregulation of neurogenesis and neuronal migration. Importantly, we showed that KIF2A mutations disrupt dynamics of ciliogenesis and neuronal progenitors cell cycle, suggesting a deregulation between mitotic progression and ciliogenesis.

Results

KIF2A is expressed during brain cortical development

In view of our previous observations that mutations in *KIF2A* result in MCD in humans (Poirier et al., 2013), and keeping in mind that these pathologies are tightly associated to cortical development alterations (Bilgüvar et al., 2010), we first sought to examine the expression pattern of KIF2A protein at different stages of brain corticogenesis in mice. KIF2A was detected throughout the cortical wall at different developmental stages (E14, E16 and E18) with an enrichment in the ventricular zone (VZ) and cortical plate (CP), as shown by immunostainings against the endogenous protein in coronal sections of mouse brains (**Fig.1a**). This expression remained ubiquitous but became more homogeneous at postnatal day 2 where we can observe a uniform staining throughout the cortex.

We then focused on embryonic day 16, a developmental stage in which there is active cell proliferation and neuronal migration. Endogenous KIF2A is expressed both in proliferating cells as well in postmitotic neurons. Immunostainings of cortical sections revealed that at this developmental stage KIF2A is present in the cytoplasm of Pax6 positive radial glia in the VZ (**Fig.1b**), suggesting a possible role in cortical proliferation. Furthermore, in the CP and intermediate zone (IZ) KIF2A colocalizes with β-III tubulin (Tuj1), which is known to be expressed specifically in migrating and differentiating postmitotic neurons (**Fig.1b**). Taken together, MCD caused by *KIF2A* mutation along with KIF2A expression profile in developing cortex suggests a possible role in different stages of corticogenesis.

Mutant KIF2A alters cortical neuronal positioning

To investigate the potential role of KIF2A in neuronal development, we introduced different human *KIF2A* constructs or small hairpin RNAs (sh-RNAs) combined with a

Tomato-reporter into neuronal precursors of mice embryos at embryonic day 14.5 (E14.5) using *in utero* electroporation.

First, to validated the efficacy of the sh-RNA, we transfected N2A cells and then performed western blot analysis. We can observe an effective suppression of the endogenous protein expression, as well as a strong downregulation of overexpressed constructs (**Supplementary Fig.1a**). We then electroporated this construct in E14.5 embryos and studied the effect on neuronal positioning at E18.5. The downregulation of endogenous KIF2A leads to a mislocalisation of electroporated cells. Tomato-positive neurons accumulate in the VZ/SVZ and IZ compared to those electroporated with the control sh-RNA (**Fig. 2a**). To rule out off-target effects of the sh-RNA, we also co-electroporated *Kif2a* sh-RNA along with the WT construct. This leads to an expression of the WT protein that resembles to that of the endogenous one (**Supplementary Fig.1a**). In this condition, electroporated neurons localization is similar to the control sh-RNA (**Supplementary Fig. 1b**).

Next, we examined the consequences of the overexpression of KIF2A mutants in neuronal positioning. We could observe that *in utero* electroporation of *KIF2A* leads to an abnormal cellular distribution of the mutant protein compared to the wild type (**Supplementary Fig. 1c**). Whereas the overexpressed wild type protein is mainly diffusely dispersed within the cytoplasm, mutant KIF2A co-localizes with and appears as sequestered to MT. This is in agreement with previous observations described in cell cultures(Poirier et al., 2013). At E18.5 neurons expressing any of the two KIF2A mutants are mainly clustered in the IZ, with very few neurons migrating towards or reaching the cortical plate (**Fig. 2a** and data not shown). On the other hand, neurons expressing the wild type form of KIF2A are dispersed throughout the cortical wall. Indeed, compared to the control empty vector, the overexpression of wild type KIF2A leads to an accumulation of neurons in the intermediate zone. However, this effect is negligible compared to the mutant's almost complete absence of electroporated cells in superficial layers of the developing cortex (**Fig. 2b**).

To explore whether the embryonic phenotype observed persist postnatally, we studied the positioning of neurons electroporated at E14.5, at post-natal day 2 (P2). As shown in **Fig. 2b**, while most of the electroporated neurons that were knocked-down for endogenous KIF2A reach the most superficial cortical layers (IV-II), there is still a significant percentage of cells that remain located in the white matter. On the other hand, as in the control situation, the overexpression of the wild type form of KIF2A, leads to an almost complete absence of ectopic cells in the white matter, although there is a small but significantly lower proportion of electroporated cells reaching layers IV-II. These results suggest that the phenotype observed due to the overexpression or downregulation of KIF2A seems to be mostly transient as, with time, there is a recovery of the phenotype observed in early stages.

Strikingly, in the case of cells expressing mutant KIF2As, abnormally positioned neurons at E18.5 remain arrested in the WM at postnatal stages (**Fig. 2b**). In this case, over 40% of electroporated neurons accumulate in the white matter compared to less than 5% observed in the control. Consistent with this, only 30% of mutant-expressing neurons are located in layers IV-II. Taken together, these results indicate that *KIF2A* has a key role in determining neuronal positioning during cortical development, and the pathogenic *KIF2A* mutation leads to an accumulation of ectopic neurons in the white matter that persists postnatally.

Mutant and wild type KIF2A decreases migration velocity of postmitotic neurons

To better understand the mechanism underlying the presence of ectopic neurons due to the expression of *KIF2A* constructs, we first focused on the migration of pyramidal neurons.

Radial glia fibers act as the scaffold along which post-mitotic neurons migrate, being essential for proper migration (Barry et al., 2014). We therefore studied the organization of glial fibers. We could observe that the neither the knocking-down nor the expression of the pathogenic protein causes radial glia scaffold impairments. When

brains were co-electroporated with *KIF2A* constructs along with radial glia specific promoter driven GFP (BLBP-GFP), we observed no evident alteration of glial scaffolding (**Supplementary Fig. 2**).

To further dissect the neuronal positioning defect, we focused on specifically studying the postmitotic neuronal migration. For this, we *in utero* electroporated constructs that express GFP and the different versions of *KIF2A* under Doublecortin (*DCX*) promoter. *DCX* is a MT-associated protein expressed in postmitotic migrating neurons during development. Therefore, expression of electroporated constructs will be restricted to the pool of newborn neurons that exited the cell cycle and undergo neuronal migration, and is devoided from neural precursors.

At E18.5, the specific expression of both wild type and mutant KIF2A in postmitotic neurons, resulted in an increased fraction of GFP-positive neurons remaining in the IZ with a corresponding depletion of cells reaching the CP compared to the control (**Fig. 3a**). However, two days after birth the phenotype observed at E18.5 is still present for the mutant but highly recovered in the wild type control. When we study the postmitotic effects of mutant KIF2A on neuronal positioning at this stage, we can still observe an accumulation of electroporated cells in the white matter, and a dispersed distribution of migrating neurons throughout the cortical plate. On the other hand, an elevated percentage of electroporated neurons were able to reach the cortical plate and there is a complete absence of ectopic cells present in the white matter (**Fig.3b**) in the wild type control, comparable to the empty vector control. It is noteworthy that electroported cells still express KIF2A two days after birth (**Fig.3c**). Together, these results suggests that mutant KIF2A alters post-mitotic developmental processes that contribute to the abnormal distribution of migrating neurons.

Therefore, we investigated whether KIF2A has a role in neuronal migration. For this aim, we performed videomicroscopy acquisitions of *DCX-KIF2A* expressing neurons in organotypic cultures. Time-lapse acquisitions demonstrated that the dynamics of pyramidal neurons is affected. While control neurons migrate at velocities close to

10μm/sec, the speed of migrating cells is reduced almost to half when the wild type or mutant form of KIF2A are overexpressed (**Supplementary Fig.3**). These results indicate that KIF2A affects migration of post-mitotic neurons, by controlling the speed of neuronal locomotion in the developing cerebral cortex. The decrease in migration velocity and not complete arrest of pyramidal neurons, could explain a delay of KIF2A-overexpressing neurons to reach their final destination in the cortical plate with a consequent abnormal distribution of mutant KIF2A-expressing cell in the cortical wall.

Mutant KIF2A alters neural progenitor proliferation and cell cycle exit

In view of the high expression of KIF2A in proliferative zones (**Fig. 1**) we investigated whether KIF2A regulates the proliferation of apical and basal progenitors. To explore this, we electroporated *KIF2A* constructs, sh-RNAs and their respective controls in E14.5 embryos and analyzed the expression of PH3, Pax6 and Tbr2 in electroporated cells two days later. First, we focused on the regulation of progenitor proliferation. We observed that both Kif2a downregulation and mutant overexpression induce an increased proportion of progenitors in mitosis in the VZ. Indeed, there is a greater number of electroporated progenitors that colocalize with PH3 nuclei, and which is reflected in the higher mitotic index (**Fig. 4a**). Then, we analyzed the regulation of progenitor pool in electroporated neurons to determine the balance between proliferative and neurogenic divisions of radial glia. This revealed an increased percentage of electroporated cells that express independently radial glia marker Pax6 and intermediate progenitor marker Tbr2 in the mutant condition as well as when the endogenous protein is knocked down (**Fig. 4b**). We also examined the apical junctions of radial precursors, known to be involved in symmetric versus asymmetric divisions in these cells (Fietz and Huttner, 2011; Shitamukai and Matsuzaki, 2012). For this, we labeled brain slices with β-catenin antibody, and studied its distribution in the different experimental conditions. There was no apparent change in β-catenin distribution,

suggesting that apical junction integrity was not altered (**Supplementary Fig. 4**). This data indicates that both the presence of the mutant and the absence of Kif2a, but not the overexpression of the wild type protein, leads to an increased number of progenitors.

To further study the basis of this increase in proliferative cells, we analyzed the consequences of *KIF2A* mutation on cell cycle regulations. To investigate this, we electroporated our different constructs at E14.5, followed by a pulse of EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridin, a thymidine analogue) one day after to label progenitors undergoing DNA replication. Brains were collected and stained against the proliferative marker Ki67 at E16.5. Although there were no significant differences in the percentage of electroporated cells that incorporated EdU, we observed a significantly larger population of Ki67+ cells in the knockdown and mutant conditions. This resulted in a reduced number of cells exiting the cell cycle in the absence of KIF2A as well as in the pathogenic condition (**Fig. 4c**). These data show that progenitors expressing the pathogenic mutation or with decreased levels of KIF2A remain longer in cell cycle. It is important to point out that no alteration was observed in the wild type situation.

Mutant KIF2A alters mitotic spindle integrity modifying mitotic progression

In view of the *in utero* consequences of the pathogenic *KIF2A* mutation in the mitotic index, we sought to better understand the cellular mechanisms underlying this alteration in mitotic division. For this, we took advantage of patient-derived fibroblast bearing the mutated gene. We first investigated the distribution of KIF2A in metaphasic cells. As previously described (Ganem and Compton, 2004), KIF2A mainly localizes to spindle poles as seen by its co-localization with γ-tubulin, and is present at the mitotic spindle (**Fig. 5a**). On the other hand, the mutated version of the protein delocalizes from the mitotic spindle and accumulates at the spindle poles, surrounding the centrosomes. We first sought to analyze spindle orientation during mitosis, which is known to regulate the balance between symmetric and asymmetric divisions and

therefore cell fate, which could explain the increased pool of proliferative progenitors. However, no significant differences were observed between the control and mutant fibroblasts (**Fig. 5b**). We then focused on characterizing morphologically mitotic spindles by measuring their length, which is the distance from spindle pole to spindle pole. Then we analyzed the spindle width, considered to be the distance between the upper and lower extremities of the mitotic spindle in the metaphase plate (**Fig. 5b**). As shown by the quantifications, mutant fibroblasts have shorter spindles compared to controls, and we can also observe a reduction in the spindle width. To sum up, mutant KIF2A abnormal localization during mitosis leads to an alteration of mitotic spindle integrity.

To further investigate the functional consequences resulting from this morphological defects, we focused on mitotic progression. In order to asses this, we took advantage of Kyoto cells which express Histone2B tagged with RFP, enabling us to perform time-lapse live imaging to study the dynamics of mitosis. Cells were either transfected with a control empty vector or the mutant version of *KIF2A*, and were imaged for 90 min. Cells expressing the pathologic KIF2A protein, exhibit a delay in mitotic progression. They not only take a longer time to reach to metaphase alignment, but also anaphase was slower (**Fig. 5c**). This delay in mitosis progression could therefore explain the increased percentage of *in utero* electroporated PH3+ cells in the mutant condition.

Mutant KIF2A alters primary cilia

It has been well established that KIF2A localizes to basal body, and is required for regulating primary cilia disassembly. Indeed, KIF2A exhibits MT-depolymerizing activity at the mother centriole to disassemble cilia(Miyamoto et al., 2015). On the other hand, defects in primary cilia structure and function have been associated to numerous genetic diseases (Hildebrandt et al., 2011). Therefore, we assessed the impact of mutant KIF2A on primary cilia in patient's fibroblasts. As previously observed), we found that wild type KIF2A localizes to the centrosomes as seen by its localization in

the basal part of the primary cilia (**Fig. 6a**). On the other hand, the mutant version of the protein is less accumulated in the basal body and dispersed into the primary cilia, as shown by its colocalization with acetylated-tubulin.

In view of the delocalization of mutant KIF2A to basal body and its abnormal localization into primary cilia, we assessed the impact of the mutation on ciliogenesis. For this purpose, we analyzed cilia formation in serum-deprived patient's and control fibroblasts. We found an increase of over 10% in number of ciliated cells in fibroblasts carrying the mutation (**Fig. 6b**). Additionally, the length of this organelle is reduced from 4μm to 3μm in the pathological condition. Together, our data suggest a defective regulation of ciliogenesis in mutant cells, due to the abnormal distribution of the mutant protein.

Discussion

Two *de novo* missense mutations in *KIF2A* (c.961C>G, p.His321Asp and c.950G>A, p.Ser317Asn) have been recently identified as being the causative mutations of MCD cases, that presented cortical gyration abnormalities (Poirier et al., 2013). Here, we performed a combination of *in vivo* and *in cellulo* studies, to better understand the mechanisms underlying the pathogenesis of these mutations thought to be different from KIF2A loss-of-function related cortical development defects previously reported (Homma et al., 2003). Indeed, *Kif2a* knock-out mice (*kif2a-/-*) presented multiple brain alterations including laminary defects as a result of a faulty migration of newborn neurons, indicating that KIF2A is involved during brain development. Here, we demonstrate that *KIF2A* pathogenic mutation are stable and leads to an abnormal localization of neurons within the white matter during development and that persists after birth. Although the developmental phenotype observed due to the expression of the mutant protein resembles that of the downregulation and the knock-out animal model, the molecular mechanisms involved seem to be different. Firstly, it is worth mentioning that all mutations identified so far in genes related to MCD correspond to heterozygous missense mutations but not loss-of-function mutations, which is consistent with a dominant negative effect of the MCD causing mutations. Indeed, our previous data showed that KIF2A is mainly misslocalized along microtubules in heterozygous fibroblasts bearing the p.His321Asp mutation and this present study expand this phenotype to migrating neurons overexpressing KIF2A mutant. Given that KIF2A functions as a dimer (Moores and Milligan, 2006), these observations suggest that mutant KIF2A could sequester the wild type protein to MTs, probably blocking its function. Moreover, contrary to the improvement in the localization of migrating neurons observed by the expression of the wild type protein in the knockdown situation, there is no such improvement for the mutant. Therefore, we cannot exclude that a gain of function could contribute to functional defects of MCD-related to KIF2A.

Here, we provide evidences showing that the misslocalization of neurons is likely to result from the combination of migration and proliferation defects. We found that mutant KIF2A engenders a locomotion default in migrating projection neurons. Cytoskeleton remodeling is essential for this, as it ensures the dynamic cell-shape changes required for the proper migration of pyramidal neurons during development. Indeed, the formation and extension of the leading process, the movement of the centrosome in the leading process as well as the nucleokinesis are highly dependent on microtubules (Heng et al., 2010; Jiang and Nardelli, 2016; Kriegstein and Noctor; Tsai and Gleeson, 2005). In line with this, the downregulation of the MT-associated proteins Lis1 and DCX, also known to be implicated in MCDs, have severe consequences in neuronal migration (Bai et al., 2003; Tsai et al., 2007). Unlike conventional kinesins, KIF2A remodels MT network through its MT-depolymerizing activity (Walczak et al., 2013). The abnormal subcellular localization of mutant KIF2A, could modify its activity disrupting any of these processes. In agreement, we have observed that mutant KIF2A alters MT dynamics with a resulting increase in polymerization (data not shown). On the other hand, KIF2A mutations not only alter migration of pyramidal neurons, but also tangential interneuron migration. We observed a reduction in migration velocity as well as a change in interneuron's typical morphology (preliminary data). During cortical development, interneurons migrate tangentially form the ganglionic eminences to the cerebral cortex to reach their appropriate location in the cerebral cortex. This suggests a possible contribution of tangential migration in the pathogenesis of MCDs, opening in this way an exciting new field of investigation.

Interestingly, we found that mutant KIF2A is associated to cell cycle defects. Indeed, we observe a higher mitotic index and an increase in the number of apical and basal progenitors. Here, we propose that this is not due to an increase in proliferation *per se*, but rather to a delay in cell cycle progression with a longer duration of mitosis that

could be reflected by a higher percentage of PH3 positive cells observed *in vivo*. This idea is supported by a set of evidence. First, our video-microscopy analysis shows a delay in mitotic progression, as a result of a defect during chromosome alignment in metaphase. Indeed, it has been shown that KIF2A regulates mitotic spindle formation and disassembly and that the consequences of KIF2A downregulation is consistent with our observations (Jang et al., 2008). Second, the increased amount of progenitors seems not to be due to an imbalance between symmetric and asymmetric divisions. This process is known to regulate cell fate and highly depends on mitotic spindle orientation. However, we did not observe any alteration in spindle angle during mitosis in cultured cells. Although this need to be further assessed in vivo, these results imply that the increase in progenitors pool could be due to a prolonged cell cycle. Finally, there is a decrease in cell cycle exit *in vivo,* consistent with the proposed hypothesis. It is well established that the date of birth of neurons is crucial in defining their identity and positioning within the cerebral cortex (Greig et al., 2013). The delay in cell cycle exit observed in the mutant condition would therefore modify the fate of newly formed neurons as well as influence in their positioning in the cerebral cortex, contributing in the layering abnormalities observed in the pathology.

On the other hand, it is interesting to note that miss-positioned neurons, could also alter progenitors proliferation. This regulatory feedback has been suggested by the observation that TUBB3, a post-mitotic neuronal specific tubulin, affects intermediate progenitors proliferation through an indirect mechanisms that depends on the positioning of migrating neurons (Saillour et al., 2014). The exact mechanism by which this occurs is still to be elucidated. However, it is well established that neuronal proliferation is controlled not only by cell autonomous mechanisms but depends as well on extracellular signals (Paridaen and Huttner, 2014).

Our study also raises the possibility of an implication of the primary clia in the pathogenesis of the observed defects. Primary cilia are known for its important role in signal transduction from extracellular stimuli (Louvi and Grove, 2011). KIF2A has been

reported to localize to the basal body of primary cilia, promoting cilia disassembly through its MT-depolymerizing activity (Miyamoto et al., 2015). Here, we show that mutant KIF2A is delocalized from the basal body to the cilium. Additionally, we observed that there is an increase in the number of ciliated cells in human fibroblast bearing KIF2A p.His321Asp mutation. The de-localization of KIF2A from basal body could result in a defective in cilia disassembly, increasing the number of ciliated cells. On the other hand, primary cilia is dynamically regulated during cell cycle, (Izawa et al., 2015). This could suggest that the defects in cell cycle progression are secondary to ciliogenesis alterations. Although further studies need to be carried out better understand the association between these alterations, deregulation in ciliogenesis could contribute to the pathogenesis of KIF2A-associated MCD.

Bilbliography

Bahi-Buisson, N., Souville, I., Fourniol, F.J., Toussaint, A., Moores, C.A., Houdusse, A., Lemaitre, J.Y., Poirier, K., Khalaf-Nazzal, R., Hully, M., et al. (2013). New insights into genotype-phenotype correlations for the doublecortin-related lissencephaly spectrum. Brain *136*, 223–244.

Bahi-Buisson, N., Poirier, K., Fourniol, F., Saillour, Y., Valence, S., Lebrun, N., Hully, M., Bianco, C.F., Boddaert, N., Elie, C., et al. (2014). The wide spectrum of tubulinopathies: what are the key features for the diagnosis? Brain *137*, 1676–1700.

Bai, J., Ramos, R.L., Ackman, J.B., Thomas, A.M., Lee, R. V, and LoTurco, J.J. (2003). RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. Nat. Neurosci. *6*, 1277–1283.

Barry, D.S., Pakan, J.M.P., and McDermott, K.W. (2014). Radial glial cells: key organisers in CNS development. Int. J. Biochem. Cell Biol. *46*, 76–79.

Bilgüvar, K., Oztürk, A.K., Louvi, A., Kwan, K.Y., Choi, M., Tatli, B., Yalnizoğlu, D., Tüysüz, B., Cağlayan, A.O., Gökben, S., et al. (2010). Whole-exome sequencing identifies recessive WDR62 mutations in severe brain malformations. Nature *467*, 207–210.

Breuss, M., Heng, J.I.-T., Poirier, K., Tian, G., Jaglin, X.H., Qu, Z., Braun, A., Gstrein, T., Ngo, L., Haas, M., et al. (2012). Mutations in the β-tubulin gene TUBB5 cause microcephaly with structural brain abnormalities. Cell Rep. *2*, 1554–1562.

Breuss, M., Fritz, T., Gstrein, T., Chan, K., Ushakova, L., Yu, N., Vonberg, F.W., Werner, B., Elling, U., and Keays, D.A. (2016). Mutations in the murine homologue of TUBB5 cause microcephaly by perturbing cell cycle progression and inducing p53-associated apoptosis. Development *143*, 1126–1133.

Desai, A., Verma, S., Mitchison, T.J., and Walczak, C.E. (1999). Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes. Cell *96*, 69–78.

Ems-McClung, S.C., and Walczak, C.E. (2010). Kinesin-13s in mitosis: Key players in the spatial and temporal organization of spindle microtubules. Semin. Cell Dev. Biol. *21*, 276–282.

Fietz, S.A., and Huttner, W.B. (2011). Cortical progenitor expansion, self-renewal and neurogenesis-a polarized perspective. Curr. Opin. Neurobiol. *21*, 23–35.

Ganem, N.J., and Compton, D.A. (2004). The KinI kinesin Kif2a is required for bipolar spindle

assembly through a functional relationship with MCAK. J. Cell Biol. *166*, 473–478.

Ganem, N.J., Upton, K., and Compton, D.A. (2005). Efficient mitosis in human cells lacking poleward microtubule flux. Curr. Biol. *15*, 1827–1832.

Gleeson, J.G., Allen, K.M., Fox, J.W., Lamperti, E.D., Berkovic, S., Scheffer, I., Cooper, E.C., Dobyns, W.B., Minnerath, S.R., Ross, M.E., et al. (1998).
Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. Cell *92*, 63–72.

Greig, L.C., Woodworth, M.B., Galazo, M.J., Padmanabhan, H., and Macklis, J.D. (2013). Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. Nat. Rev. Neurosci. *14*, 755–769.

Heng, J.I.-T., Chariot, A., and Nguyen, L. (2010). Molecular layers underlying cytoskeletal remodelling during cortical development. Trends Neurosci. *33*, 38–47.
Hildebrandt, F., Benzing, T., and Katsanis, N. (2011). Ciliopathies. N. Engl. J. Med. *364*, 1533–1543.

Homma, N., Takei, Y., Tanaka, Y., Nakata, T., Terada, S., Kikkawa, M., Noda, Y., and Hirokawa, N. (2003). Kinesin superfamily protein 2A (KIF2A) functions in suppression of collateral branch extension. Cell *114*, 229–239.

Izawa, I., Goto, H., Kasahara, K., Inagaki, M., Singla, V., Reiter, J., Nigg, E., Raff, J., Goetz, S., Anderson, K., et al. (2015). Current topics of functional links between primary cilia and cell cycle. Cilia *4*, 12.

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

Jang, C.-Y., Wong, J., Coppinger, J.A., Seki, A., Yates, J.R., and Fang, G. (2008). DDA3 recruits microtubule depolymerase Kif2a to spindle poles and controls spindle dynamics and mitotic chromosome movement. J. Cell Biol. *181*, 255–267.

Jiang, X., and Nardelli, J. (2016). Cellular and molecular introduction to brain development. Neurobiol. Dis. *92*, 3–17.

Keays, D.A., Tian, G., Poirier, K., Huang, G.-J., Siebold, C., Cleak, J., Oliver, P.L., Fray, M., Harvey, R.J., Molnár, Z., et al. (2007). Mutations in alpha-tubulin cause abnormal neuronal migration in mice and lissencephaly in humans. Cell *128*, 45–57.

Kriegstein, A.R., and Noctor, S.C. Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex.

Kwon, H.J., Park, J.E., Song, H., and Jang, C.-Y. (2016). DDA3 and Mdp3 modulate Kif2a recruitment onto the mitotic spindle to control minus-end spindle dynamics. J. Cell Sci. *129*, 2719–2725.

Louvi, A., and Grove, E.A. (2011). Cilia in the CNS: The Quiet Organelle Claims Center Stage. Neuron *69*, 1046–1060.

Manning, A.L., Ganem, N.J., Bakhoum, S.F., Wagenbach, M., Wordeman, L., and Compton, D.A. (2007). The kinesin-13 proteins Kif2a, Kif2b, and Kif2c/MCAK have distinct roles during mitosis in human cells. Mol. Biol. Cell *18*, 2970–2979.

Maor-Nof, M., Homma, N., Raanan, C., Nof, A., Hirokawa, N., and Yaron, A. (2013). Axonal pruning is actively regulated by the microtubule-destabilizing protein kinesin superfamily protein 2A. Cell Rep. *3*, 971–977.

Miyamoto, T., Hosoba, K., Ochiai, H., Royba, E., Izumi, H., Sakuma, T., Yamamoto, T., Dynlacht, B.D., and Matsuura, S. (2015). The Microtubule-Depolymerizing Activity of a Mitotic Kinesin Protein KIF2A Drives Primary Cilia Disassembly Coupled with Cell Proliferation. Cell Rep.

Moores, C.A., and Milligan, R.A. (2006). Lucky 13-microtubule depolymerisation by kinesin-13 motors. J. Cell Sci. *119*, 3905–3913.

Noda, Y., Sato-Yoshitake, R., Kondo, S., Nangaku, M., and Hirokawa, N. (1995). KIF2 is a new microtubule-based anterograde motor that transports membranous organelles distinct from those carried by kinesin heavy chain or KIF3A/B. J. Cell Biol. *129*, 157–167.

Paridaen, J.T.M.L., and Huttner, W.B. (2014). Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. EMBO Rep. *15*, 351–364.

Poirier, K., Saillour, Y., Bahi-Buisson, N., Jaglin, X.H., Fallet-Bianco, C., Nabbout, R., Castelnau-Ptakhine, L., Roubertie, A., Attie-Bitach, T., Desguerre, I., et al. (2010). Mutations in the neuronal ß-tubulin subunit TUBB3 result in malformation of cortical development and neuronal migration defects. Hum. Mol. Genet. *19*, 4462–4473.

Poirier, K., Lebrun, N., Broix, L., Tian, G., Saillour, Y., Boscheron, C., Parrini, E., Valence, S., Pierre, B. Saint, Oger, M., et al. (2013). Mutations in TUBG1,

DYNC1H1, KIF5C and KIF2A cause malformations of cortical development and microcephaly. Nat. Genet. *45*, 639–647.

des Portes, V., Francis, F., Pinard, J.M., Desguerre, I., Moutard, M.L., Snoeck, I., Meiners, L.C., Capron, F., Cusmai, R., Ricci, S., et al. (1998). doublecortin is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia (SCLH). Hum. Mol. Genet. *7*, 1063–1070.

Reiner, O., Carrozzo, R., Shen, Y., Wehnert, M., Faustinella, F., Dobyns, W.B., Caskey, C.T., and Ledbetter, D.H. (1993). Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. Nature *364*, 717–721.

Saillour, Y., Broix, L., Bruel-Jungerman, E., Lebrun, N., Muraca, G., Rucci, J., Poirier, K., Belvindrah, R., Francis, F., and Chelly, J. (2014). Beta tubulin isoforms are not interchangeable for rescuing impaired radial migration due to Tubb3 knockdown. Hum. Mol. Genet. *23*, 1516–1526.

Shitamukai, A., and Matsuzaki, F. (2012). Control of asymmetric cell division of mammalian neural progenitors. Dev. Growth Differ. *54*, 277–286.

Tischfield, M.A., Cederquist, G.Y., Gupta, M.L., and Engle, E.C. (2011). Phenotypic spectrum of the tubulin-related disorders and functional implications of disease-causing mutations. Curr. Opin. Genet. Dev. *21*, 286–294.

Tsai, L.-H., and Gleeson, J.G. (2005). Minireview Nucleokinesis in Neuronal Migration. Neuron *46*, 383–388.

Tsai, J.-W., Bremner, K.H., and Vallee, R.B. (2007). Dual subcellular roles for LIS1 and dynein in radial neuronal migration in live brain tissue. Nat. Neurosci. *10*, 970–979.

Uehara, R., Tsukada, Y., Kamasaki, T., Poser, I., Yoda, K., Gerlich, D.W., and Goshima, G. (2013). Aurora B and Kif2A control microtubule length for assembly of a functional central spindle during anaphase. J. Cell Biol. *202*, 623–636.

Walczak, C.E., Gayek, S., and Ohi, R. (2013). Microtubule-depolymerizing kinesins. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *29*, 417–441.

Methods

Western blot

Cells were lysed in RIPA buffer (Tris HCl 1M, pH 7.7; NaCl 5M; EDTA 0.5M; Triton X-100) supplemented with protease inhibitors (Roche) and phosphatases inhibitors (Sigma Aldrich). Protein concentration was measured using Bio-Rad protein assay reagent (Biorad Laboratories, CA). Samples were denatured at 95°C for 10 min in loading buffer then resolved in SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were then blocked in 5% non-fat milk in TBS buffer, 0.1% Tween and then immunoblotted using anti-Kif2A (ab37005, rabbit, Abcam, 1:10000), anti-Actin (mouse, IGBMC, 1:1000) antibodies.

In utero electroporation.

In utero electroporation was performed as described previously (Poirier et al., 2013) using Swiss mice (Janvier). Animal experimentations were performed at the IGBMC animal facilities. The study has the Animal Experimentation Research Ethics Committee approval (N° 2014-059). Timed pregnant mice (E14.5) were anesthetized with isoflurane (2 l per min of oxygen, 4% isoflurane during sleep and 2% isoflurane during surgery operation; Minerve). The uterine horns were exposed, and a lateral ventricle of each embryo was injected using pulled glass capillaries with Fast Green (2µg/ml; Sigma) combined with 1µg/µl of DNA constructs. Plasmids were further electroporated into the neuronal progenitors adjacent to the ventricle by discharging five electric pulses at 45V for 50ms at 950ms intervals using a CUY21EDIT electroporator (Sonidel Ltd). After electroporation, embryos were placed back in the abdominal cavity and development was allowed to continue until E16, E18 or P2. Embryos or pups brains were dissected and fixed in 4% PFA in PBS overnight.

Immunohistochemistry.

Fixed mouse brains were placed in a solution of 4% low melting agarose (Bio-Rad) and cut in coronal sections (80µm) using a vibrating blade microtome (Leica VT1000S, Leica Microsystems).Sections were blocked in PBS with 0.3% Triton-X100 and 2% of the appropriate serum at room temperature for 30 min. All primary antibodies were incubated overnight at 4°C with PBS, 0.3% Triton-X100 and 2% of serum. The following antibodies were used : anti-phospho Histone H3 (06-570, rabbit, 1:500, Millipore), anti-Tbr2 (14-4875-80, rat, 1:200, eBiosciences), anti-Pax6 (PRB-278P, rabbit, 1:200, Covance), anti-Kif2a (ab37005, rabbit, 1:6000, abcam), anti-GFP (A10262, chicken, 1:6000, ThermoFisher), anti-Cux1 (sc-13024, rabbit, 1:100, Santa Cruz),anti-Ki67 (IHC-00375, rabbit, 1:250, Bethyl Laboratories, Inc), anti-NeuN (MAB377, mouse, 1:100, Millipore), anti-βcatenin (610153, mouse, 1:500, BD Transduction Laboratories), anti-Arl13b (17711-1-AP, rabbit, 1:500, Proteintech), anti-RFP (5F8, rat, 1:1000, Chromotek. After washes in 1X PBS, sections were incubated with corresponding Alexa Fluor conjugated secondary antibodies (Life Technologies) in a 1:500 dilution in 1X PBS for 1h30 at room temperature. After washes, sections were mounted with DAPI Fluoromount-G mounting medium (Interchim). Microscopy was performed on a TCS SP8 or a TCS SP5 II confocal microscopes (Leica Microsystems) and positioning analysis was achieved using ImageJ software (NIH) and proliferation and primary cilium analysis with LAS AF software (Leica Microsystems). Graphs were made in GraphPad Prism 6 (GraphPad Software) and images were assembled with Adobe Photoshop 13.0.1 (Adobe Systems).

EdU incorporation.

For cell-cycle exit experiments, E14.5 electroporated pregnant mice were intraperitoneally injected 24h later with EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine solution, Invitrogen) diluted in sterile normal salineat the dose of 40 mg EdU/kg of body weight

and embryos were harvested and fixed at E16.5. Edu staining was conducted using Click-iTEdU Alexa Fluor 647 Imaging Kit (Invitrogen) according to manufacturer's protocol.

Expression constructs.

Commercially available Human untagged *KIF2A cDNA* (NM_004520) cloned in pCMV6-XL5 vector (SC117315) were purchased from Origene. Mutation (p.His321Asp) was introduced by site directed mutagenesis using QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). WT and mutated cDNA encoding human KIF2A were then inserted in the multiple cloning site of psiSTRIKE vector under the CAG promoter and between the DCX promoter and IRES-EGFP sequences in DCX-IRES-GFP vector kindly provided by U. Mueller (TSRI, CA, USA). BLBP-GFP plasmid was kindly provided by N. Heintz (The Rockefeller university, NY, USA). pDEST47-Arl13b-GFP was purchased from Addgene (#40872). For short hairpin *Kif2a* silencing constructs, a 29-mer sequence targeting the 3'UTR of the mouse *Kif2a*transcript and a HuSH 29-mer non-effective shRNA scrambled cassette, both commercially designed and provided by Origene in the p-GFP-V-RS vector (TG505433), were then subcloned in the psiSTRIKE vector under the U6 promoter. Plasmid DNAs used in this study were prepared using the EndoFree plasmid purification kit (Macherey Nagel).

Cell culture, transfections and immunofluorescence.

Control and patient's derived fibroblasts carrying the *KIF2A* pHis321Asp mutation were maintained in DMEM supplemented with 10% foetal bovine serum at 37ºC. Kyoto cells were grown in DMEM supplemented with 10%foetal bovine serum, 2mM Glutamine, 0.5mg/ml of G418 and puromycin at 0.5µg/ml. Transfection of plasmids was done using Lipofectamine 2000 (Lifetechnologies) following manufacturer's instructions. For cilia analysis, fibroblasts at 70% confluence were serum starved for 24h before fixation.

Immunofluorescence images were performed by fixing cells with 4% paraformaldehyde solution for 20 minutes. Slides were blocked by a 30 minutes incubation with 0.3% Triton-X100 and 2% of the appropriate serum in PBS. Primary antibodies were incubated overnight in blocking solution in the following concentrations: acetylated-tubulin (32-2700, mouse, 1:500, Thermofisher), α-tubulin (ab6160, rat, 1:1000, Abcam), γ-tubulin (T6557, mouse, 1:500, Sigma Aldrich). Following, slides were incubated with the corresponding Alexa Fluor conjugated secondary antibodies (Life Technologies) in a 1:500 dilution in 1X PBS for 30 minutes at room temperature. Slides were mounted with a Dapi containing Fluoromount-G mounting medium (Interchim). Images were acquired using TCS SP8 or a TCS SP5 II confocal microscopes (Leica Microsystems).

Videomicroscopy

For cell cycle progression studies, Kyoto cells stably expressing H2B-RFP and α-tubulin-GFP, were cultured in 35 mm diameter bottom glass petri-dishes (MatTek). 48h after transfection, mitosis progression was imaged using a TCSSP8 confocal microscope kept at 37ºC with 5% CO2. Acquisitions were every 3 min for 12 hours. For time-lapse analysis of migrating neurons, electroporated E16.5 mouse embryos brains were embedded in 3% agarose and sliced (300μm) with a vibratome (VR1000S, Leica, Wetzlar, Germany). Brain slices were cultured up to 24 hours in semi-dry conditions (Millicell inserts, Merck Millipore), in a humidified incubator at 37°C in a 5% CO2 atmosphere in wells containing Neurobasal medium supplemented with 1% B27, 1% N2, and 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Life Technologies, Ghent, Belgium). Slice cultures were placed in a humidified and thermo-regulated chamber maintained at 37°C on the stage of an inverted confocal microscope. Time-lapse confocal microscopy was performed with a Nikon A1 Eclipse Ti laser scanning confocal microscope. Images were taken with a 40X objective and 25 successive “z” optical

plans spanning 50 µm every 30 minutes during 10 hours. Sequences were analyzed using Image J.

Spindle parameters assays

To increase the proportion of cells in mitosis, fibroblasts were synchronized by incubating cells with 9µM RO-3306 (Roche) for 18 hours. Cells were released from inhibition by incubating with fresh media for 35 min before fixation. Spindle parameters were calculated using imageJ. The spindle angle was considered to be the one formed by between pole-pole axis and the substratum plane. Spindle length was measured as the distance between the two spindle poles. Spindle width is the desistance between the upper and lower extremities of the mitotic spindle in the metaphase plate.

Statistics.

All statistics were calculated with GraphPad Prism 6 (GraphPad Software). Final counts are presented as the mean percentages ± standard error of the mean. One-way ANOVA was performed for multiple comparisons (Empty vector, KIF2A WT and KIF2A p.His321Asp) followed by Dunnett's post hoc tests, whereas unpaired two-tailed Student's *t*-test was used for dual comparisons (Scramble-RNA vs. sh-RNA). $P < 0.05$ was considered significant with $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$. Based on previous *in utero* electroporation experiments performed in our laboratory, we considered that at least 3 embryos per conditions would be necessary. After histological examination, only brains with comparative electroporated regions and efficiencies were conserved for quantification. Data distribution was not tested but assumed to be normal. The investigator was not blinded for data collection and analysis.

Figure legends

Figure 1: KIF2A expression pattern during development. (**a**) Coronal sections of brain cortices at different developmental stages (E14, E16, E18, P2) showing KIF2A protein expression in brain cortical wall. (**b**) Brain sections at E16 showing colocalization of KIF2A with radial glia (Pax6) and post-mitotic neurons (Tuj1). CP, cortical plate; IZ, intermediate zone; VZ, ventricular zone; Ctx, cortex; WM, white matter.

Figure 2: Kif2A downregulation and overexpression affects neuronal positioning. (**a**) Coronal sections of cerebral cortex electroporated at E14.5 and analyzed at E18.5. Histograms show the distribution of tomato-positive cells expressing different constructs in the ventricular/subventricular zone (VZ/SVZ), intermediate zone (IZ) and the cortical plate (CP). Data are shown as mean +/- s.e.m. (**b)** Representative images of brain cortices electroporated at E14.5 and analyzed at P2. Sections were stained for a neuronal marker, NeuN, and an upper-layer maker, Cux1, and were counterstained with DAPI) to determine neuronal positioning. Histograms show the quantification of the distribution of electroporated cells in the white matter (WM), and different cortical layers (II-VI). Data are shown as mean +/- s.e.m.

Figure 3: Postmitotic effects of wild type and mutant KIF2A (**a**) Distribution of postmitotic GFP-positive neurons expressing different *KIF2A* contructs under DCX promoter in mouse brain cortex. Brains were electroporated at E14.5 and analyzed at E18.5. Histograms represent the percentage of electroporated neurons that reside in the IZ and CP of developing cortex. Data are shown as mean +/- s.e.m. (**b**) Immunolabeling of brain sections of P2 mice electroporated at E14.5 with mutant, wild

type or control empty vector under DCX promoter. Quantification of represent the distribution of GFP+ cells in the white matter and different cortical layers (II-VI).

Figure 4: Effect of KIF2A in progenitors proliferation (**a**) Confocal images of E16.5 brain cortices electroporated two days before, showing electroporated cells and co-labeled with PH3. Quantifications represent the percentage of electroporated cells that co-express PH3 (Mitotic index). Data are shown as mean +/- s.e.m. (**b**) Distribution of Pax6/GFP+ cells and Tbr2/GFP+ cells on E16.5 coronal sections from brains electroporated at E14.5 (left panels). Right panels represent the localization of electroporated cells that colocalize with Pax-6 (red dots), Tbr-2 (gray dots) or both (yellow dots). Dotted line delimits the area of quantification. Histograms show the percentage of electroporated cells that express the different markers. Data are expressed as mean +/- s.e.m. (**c**) Coronal sections of E16.5 cortices, *in utero* electroporated at E14.5, followed by EdU injection at E15.5 and immunolabeled against Ki67and EdU (left panels). Right panels represent the distribution of electroporated cells expressing Ki67 (red dots), EdU (gray dots) or both (yellow dots). Quantifications represent the percentage of electroporated cells that incorporated EdU (upper left), that were positive for Ki67 (upper right) and that exit the cell cycle (GFP+EdU+Ki67-/ GFP+EdU+) (bottom). Data are represented as mean +/- s.e.m.

Figure 5: Mutant KIF2A alters mitotic spindle in patients fibroblasts (**a**) Immunofluorescent images of metaphasic fibroblasts expressing wild type or mutant KIF2A and stained against KIF2A (red), γ-tubulin (blue) and α-tubulin (green). (**b**) Representative image depicting spindle width, length (upper panel) and spindle angle measurements (lower panel). Quantification of spindle orientation (upper left), length (upper right) and width (bottom) in metaphasic fibroblasts. Data are represented as mean +/- SD. (**c**) Representative time-lapse sequence of Kyoto cells expressing H2B-RFP and transfected with empty vector or mutant *KIF2A* construct.

Figure 6: Mislocalisation of mutant KIF2A in primary cilia. (**a**) Immunofluorescent staining of KIF2A (green) and acetylated-tubulin labeling primary cilia (red) in *KIF2A* p.His321Asp patient-derived and control fibroblasts. (**b**) Quantification of the percentage of ciliated cells and cilia length in control and patient's fibroblasts.

Supplementary Figure 1: Constructs and overexpression validation. (**a**) Western blot of N2A protein extracts, showing KIF2A expression after transfection with Scramble-Sh, sh-Kif2a, KIF2A WT, KIF2A p.His321Asp or control empty vector. (**b**) Brain slices of E18.5 embryos, showing the distribution of Tomato+ cells, electroporated at E14.5. Histogram represents the distribution of electroporated neurons in the venticular zone/ subventricular zone (VZ/SVZ), intermediate zone (IZ) and cortical plate (CP). (**c**) Coronal section of mouse embryos showing the subcellular distribution of *in utero* electroporated wild type and mutant KIF2A (red) and GFP (green) and counterstained with DAPI (blue).

Supplementary Figure 2: KIF2A does not affect radial glia fibers. Coronal sections of E16.5 mouse cortices electroporated two days before with BLBP-GFP together with KIF2A constructs.

Supplementary Figure 3: Migration velocity of postmitotic neurons. Quantification of migration velocity of neurons electroporated with different DCX constructs, and analyzed by time-lapse video-microscopy in organotypic slice culture.

Supplementary Figure 4: KIF2A does not affect apical junctions of radial glia. β-catenin staining in E16.5 brain sections of *in utero* electroporated mice.

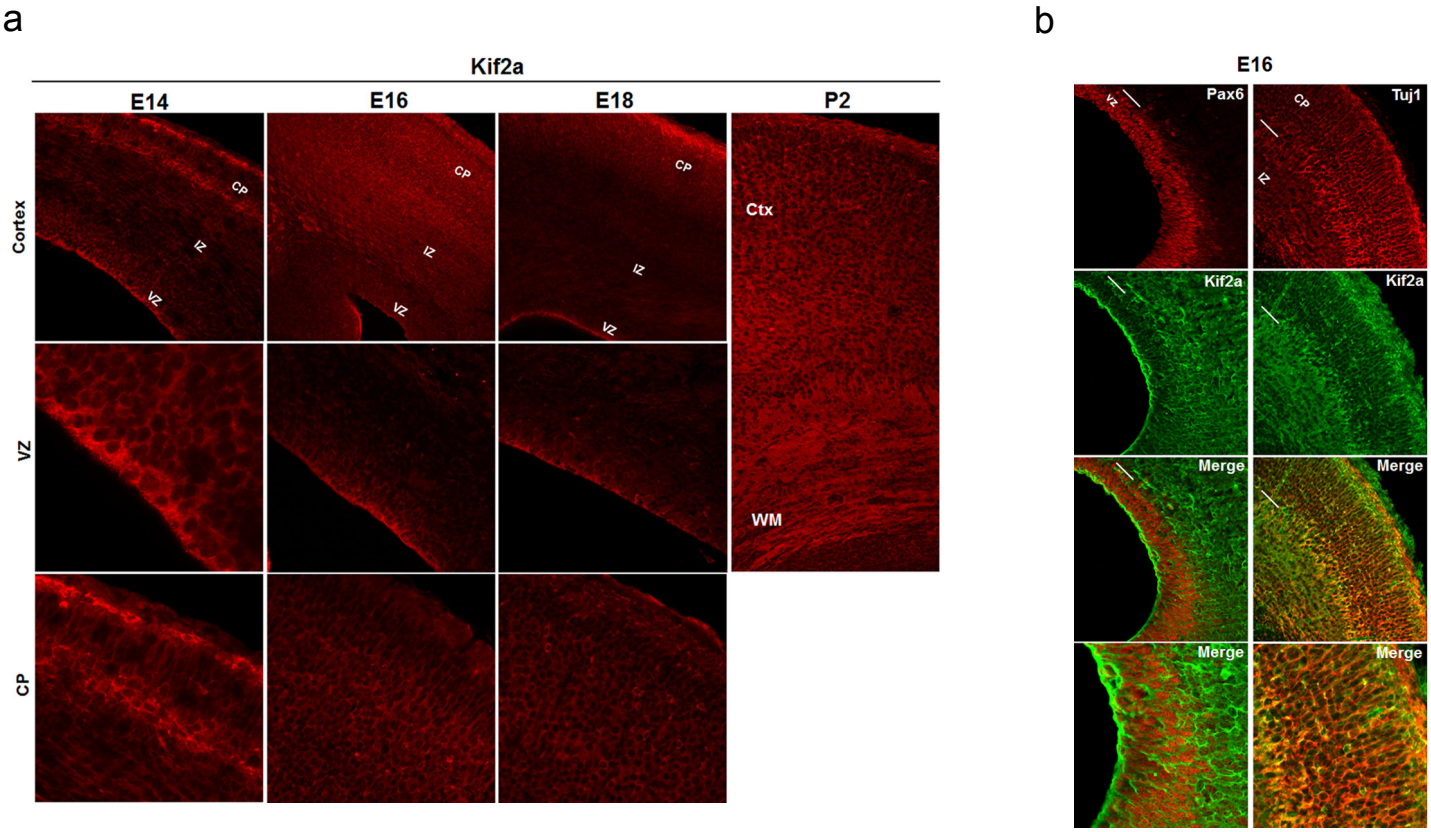
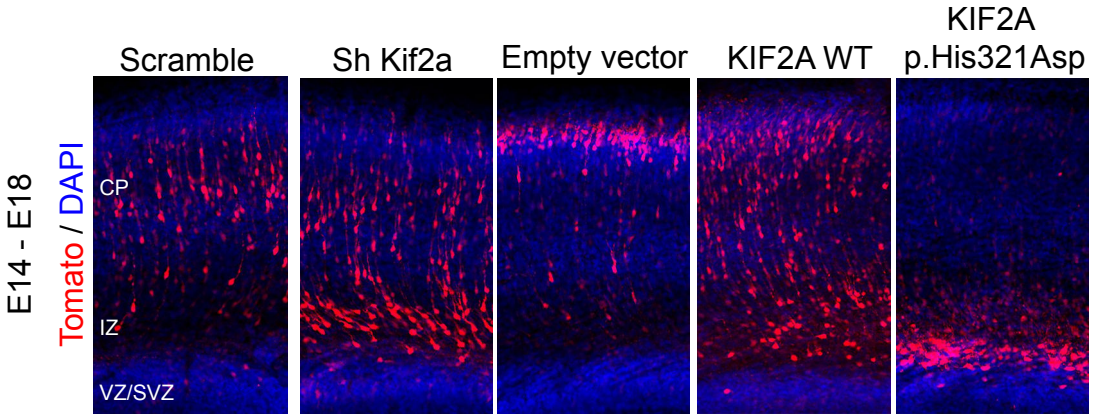
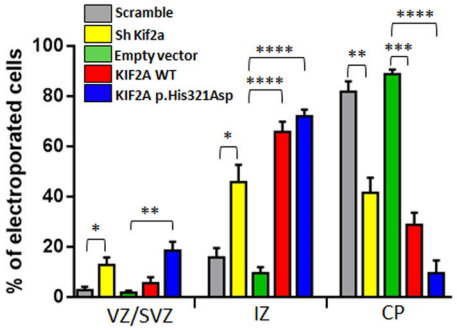

a
Kif2a
E14
E16
E18
P2
Cortex
VZ
CP
CP
IZ
VZ
Ctx
WM
b
E16
Pax6
Tuj1
Kif2a
Merge

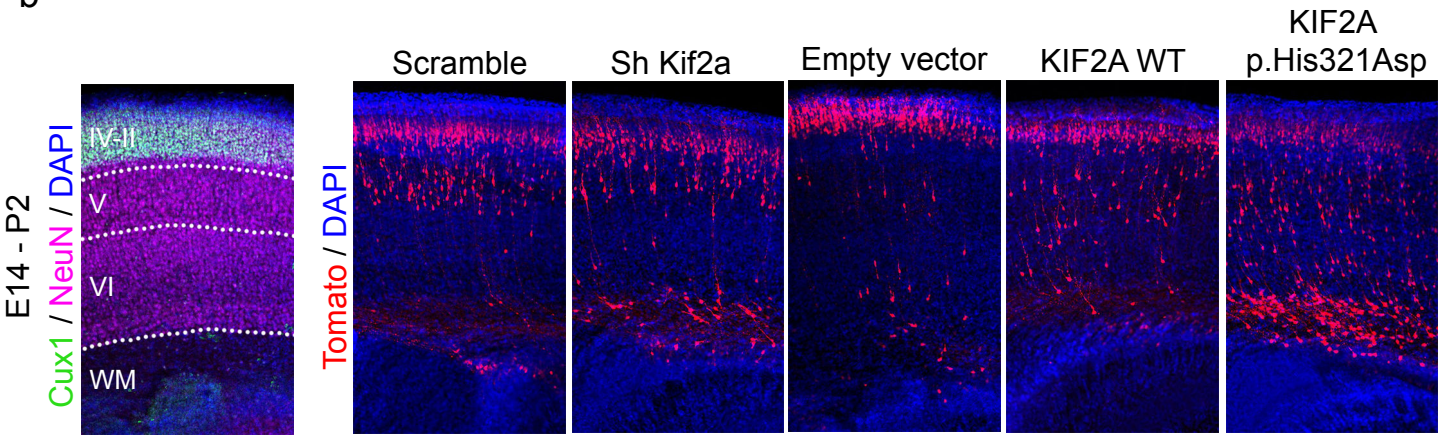
Figure 1

a


Scramble
Sh Kif2a
Empty vector
KIF2A WT
KIF2A p.His321Asp
E14 - E18
Tomato / DAPI
CP
IZ
VZ/SVZ


Scramble
Sh Kif2a
Empty vector
KIF2A WT
KIF2A p.His321Asp
% of electroporated cells
100
80
60
40
20
0
VZ/SVZ
IZ
CP
*
**
*
****
****
**
***
****

b


Scramble
Sh Kif2a
Empty vector
KIF2A WT
KIF2A p.His321Asp
E14 - P2
Cux1 / NeuN / DAPI
IV-II
V
VI
WM
Tomato / DAPI

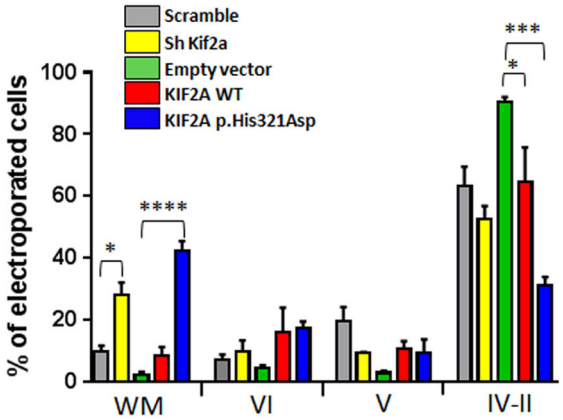
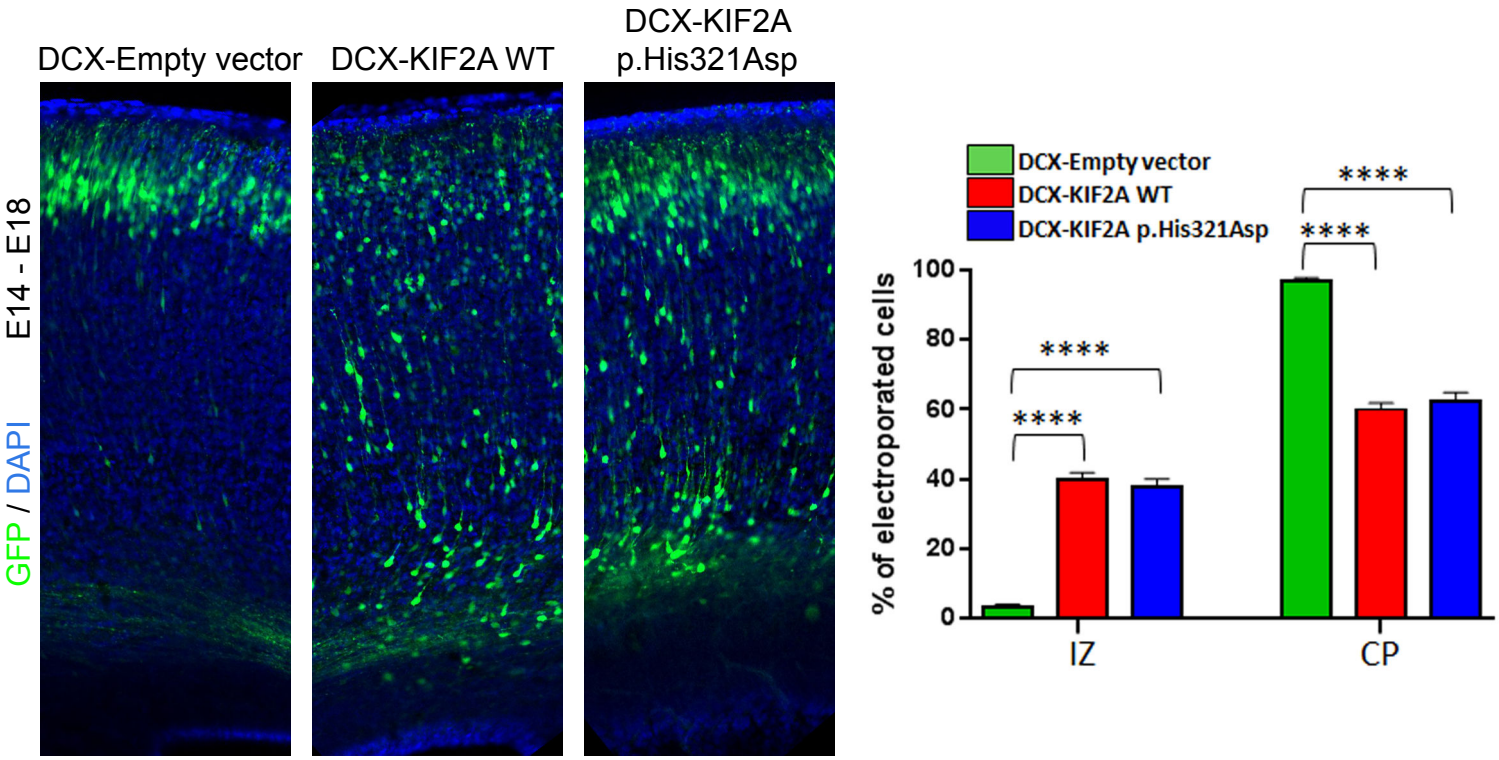
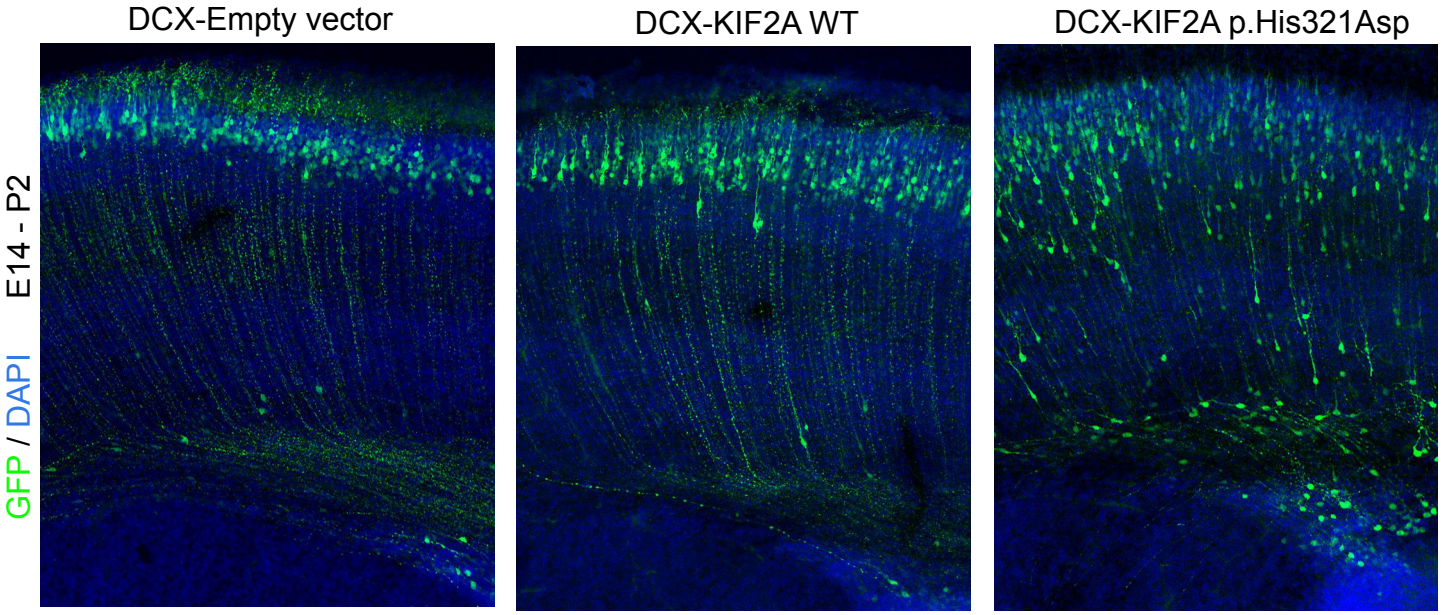

Scramble
Sh Kif2a
Empty vector
KIF2A WT
KIF2A p.His321Asp
% of electroporated cells
100
80
60
40
20
0
WM
VI
V
IV-II
*
****
***
*

Figure 2

a


DCX-Empty vector
DCX-KIF2A WT
DCX-KIF2A p.His321Asp
E14 - E18
GFP / DAPI
DCX-Empty vector
DCX-KIF2A WT
DCX-KIF2A p.His321Asp
% of electroporated cells
100
80
60
40
20
0
****
****
****
****
IZ
CP

b


DCX-Empty vector
DCX-KIF2A WT
DCX-KIF2A p.His321Asp
E14 - P2
GFP / DAPI

c

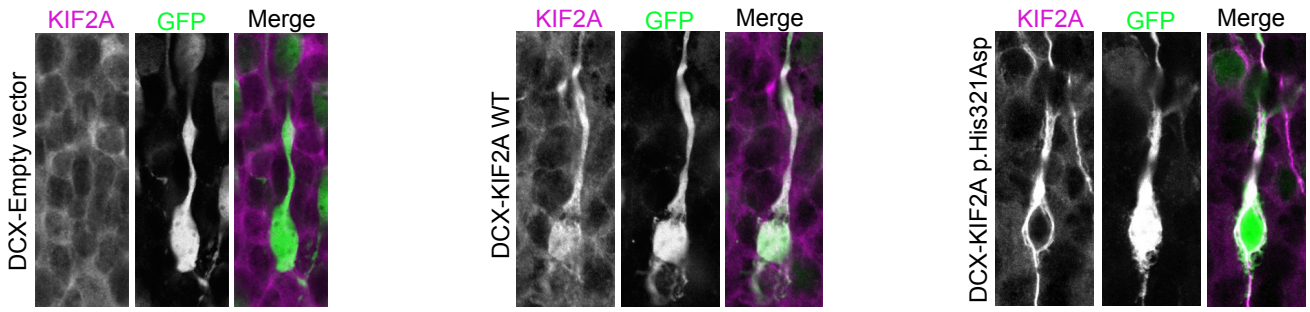

KIF2A
GFP
Merge
DCX-Empty vector
KIF2A
GFP
Merge
DCX-KIF2A WT
KIF2A
GFP
Merge
DCX-KIF2A p.His321Asp

Figure 3

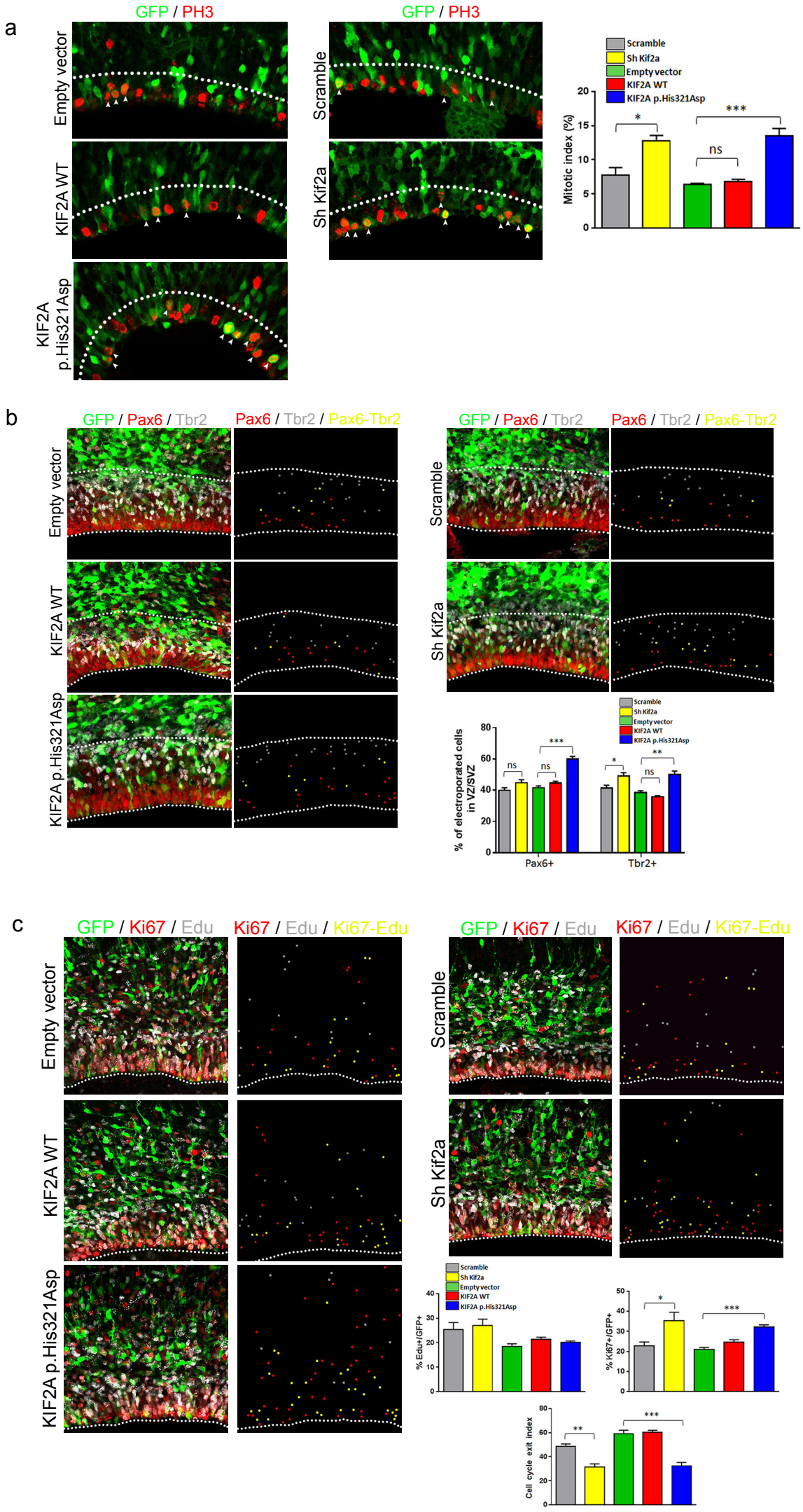
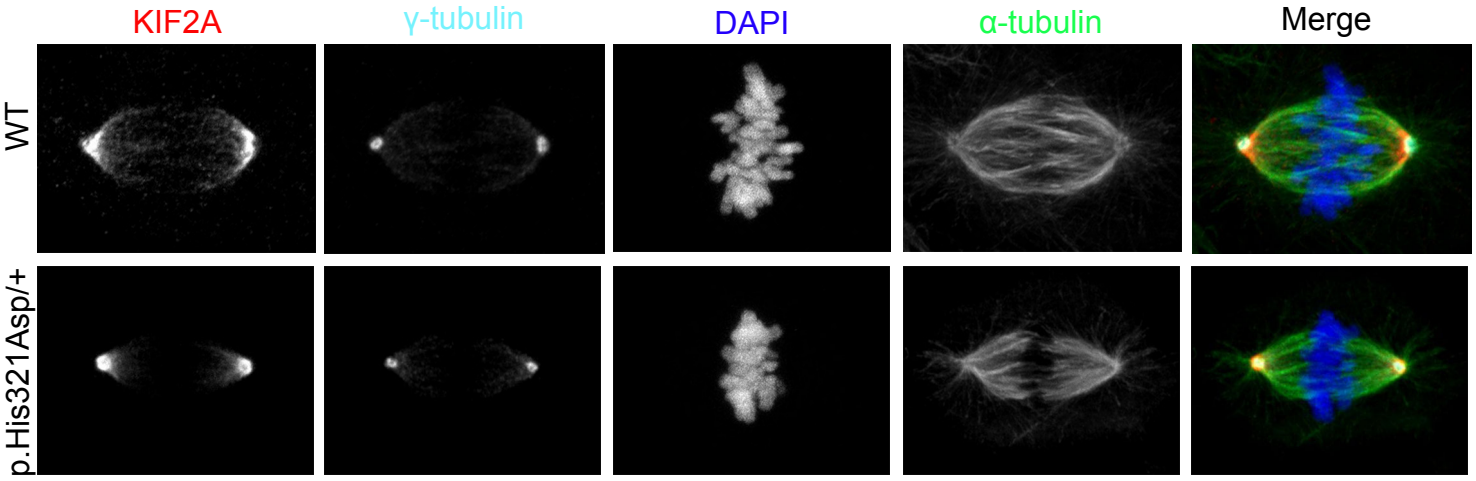
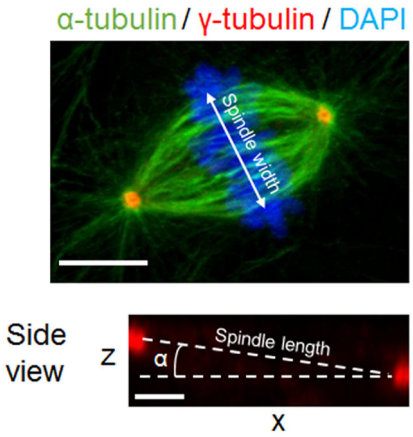

a
GFP / PH3
Empty vector
KIF2A WT
KIF2A p.His321Asp
Scramble
Sh Kif2a
Mitotic index (%)
Scramble
Sh Kif2a
Empty vector
KIF2A WT
KIF2A p.His321Asp
ns
b
GFP / Pax6 / Tbr2
Pax6 / Tbr2 / Pax6-Tbr2
% of electroporated cells in VZ/SVZ
Pax6+
Tbr2+
c
GFP / Ki67 / Edu
Ki67 / Edu / Ki67-Edu
% Edu+/GFP+
% Ki67+/GFP+
Cell cycle exit index

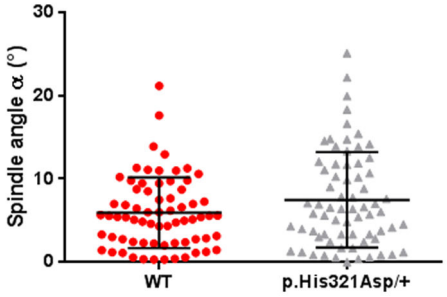
Figure 4

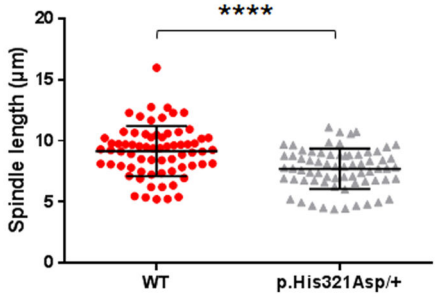
a

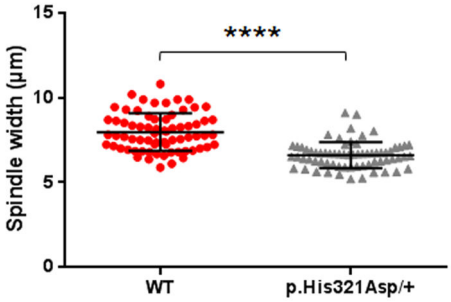

KIF2A
γ-tubulin
DAPI
α-tubulin
Merge
WT
p.His321Asp/+

b


α-tubulin / γ-tubulin / DAPI
Spindle width
Side view
z
α
Spindle length
x


Spindle angle α (°)
30
20
10
0
WT
p.His321Asp/+


Spindle length (µm)
20
15
10
5
0
****
WT
p.His321Asp/+


Spindle width (µm)
15
10
5
0
****
WT
p.His321Asp/+

c

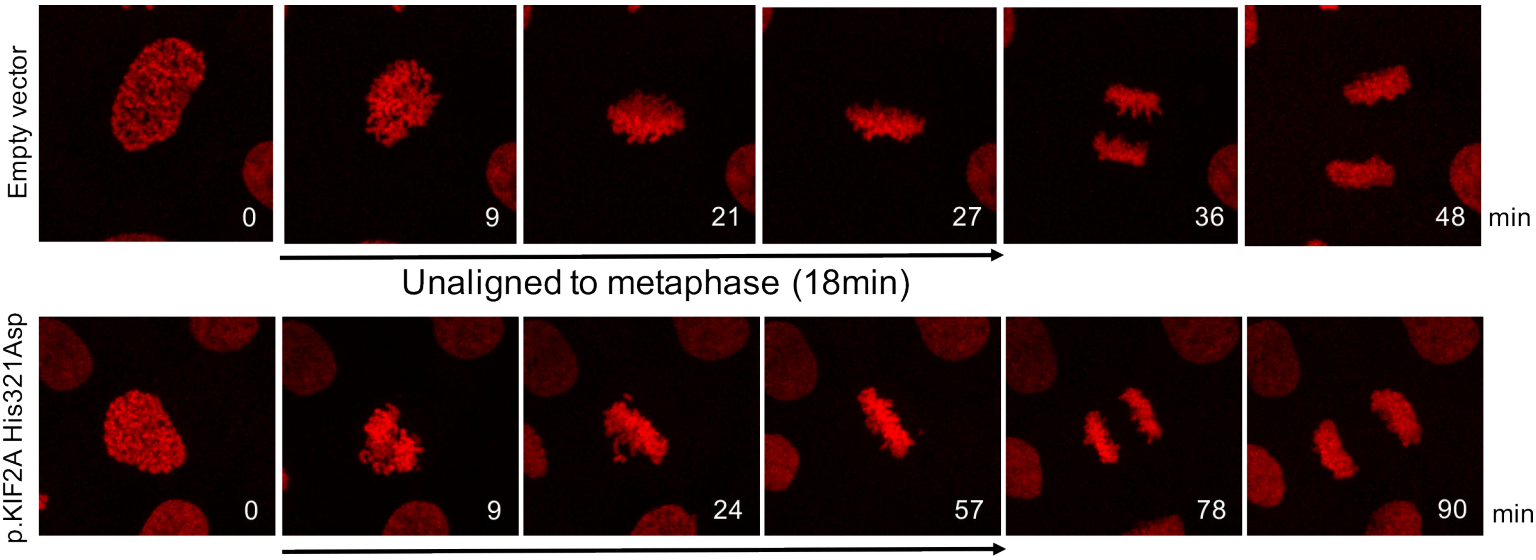
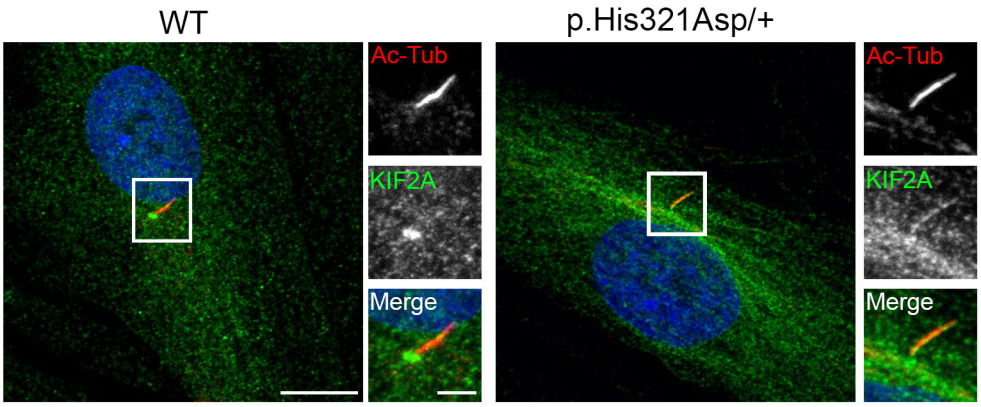
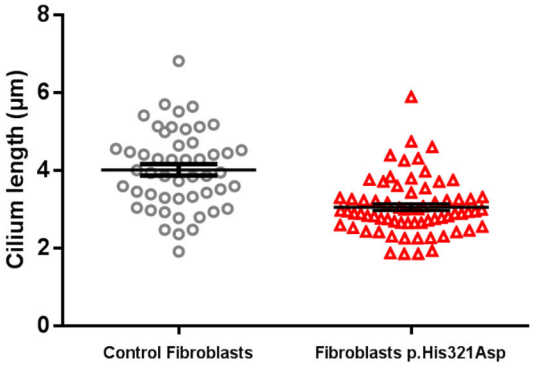

Empty vector
0
9
21
27
36
48
min
Unaligned to metaphase (18min)
p.KIF2A His321Asp
0
9
24
57
78
90
min

Figure 5

a



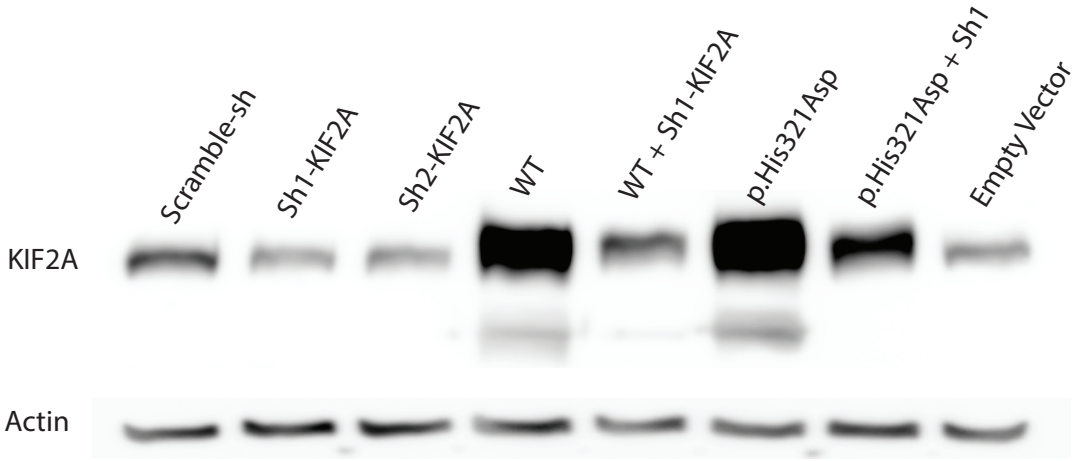
b



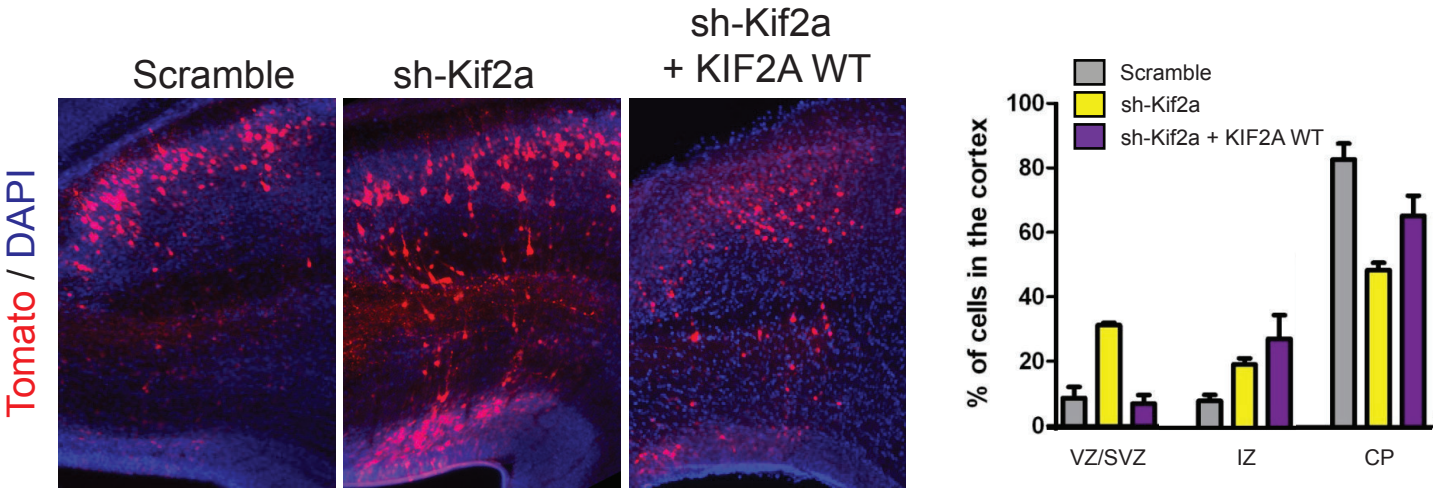
Average length -> Control : 4µm
p.His321Asp : 3 µm

Figure 6

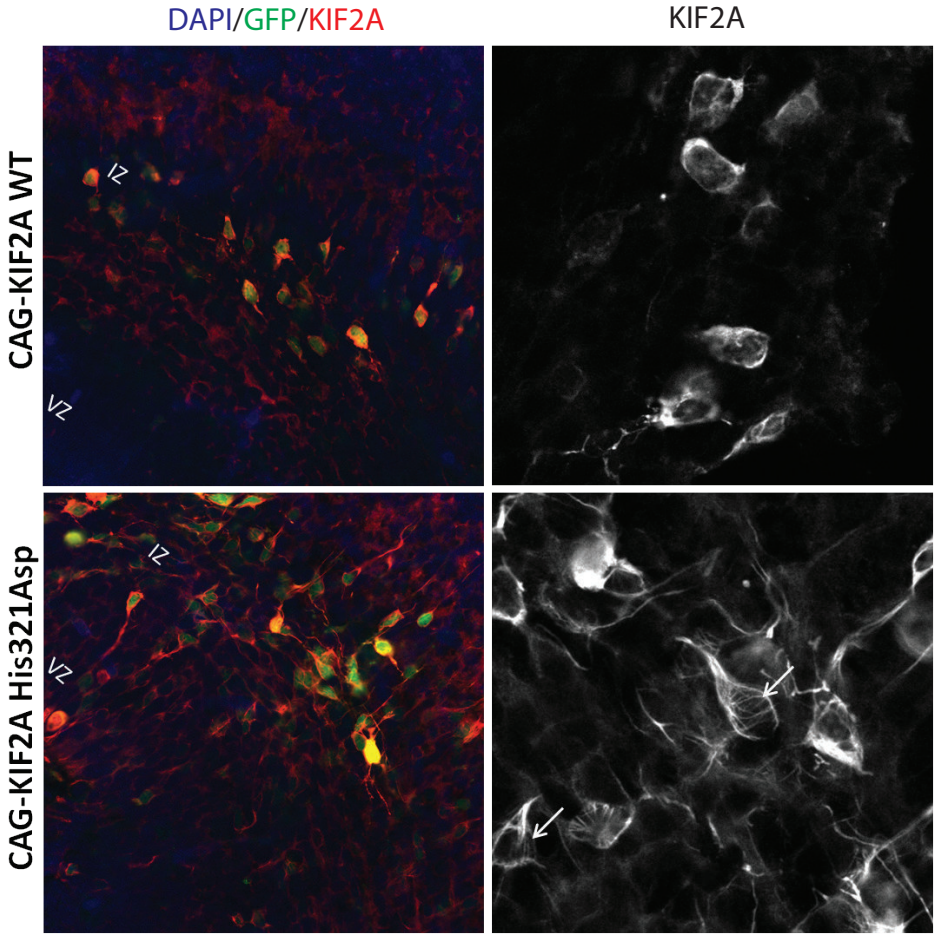
a



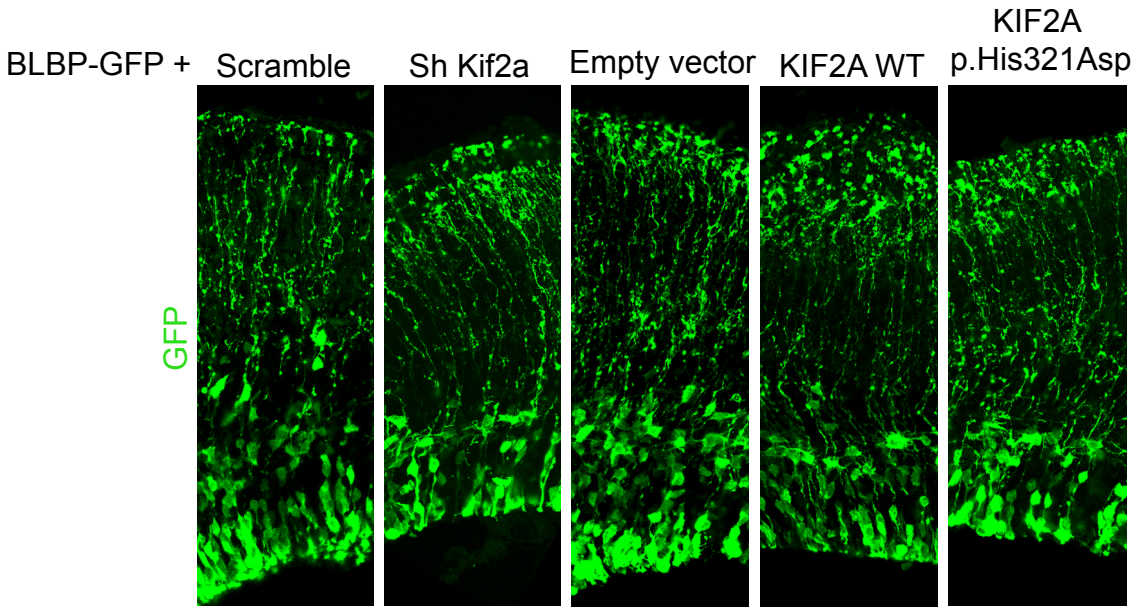
b



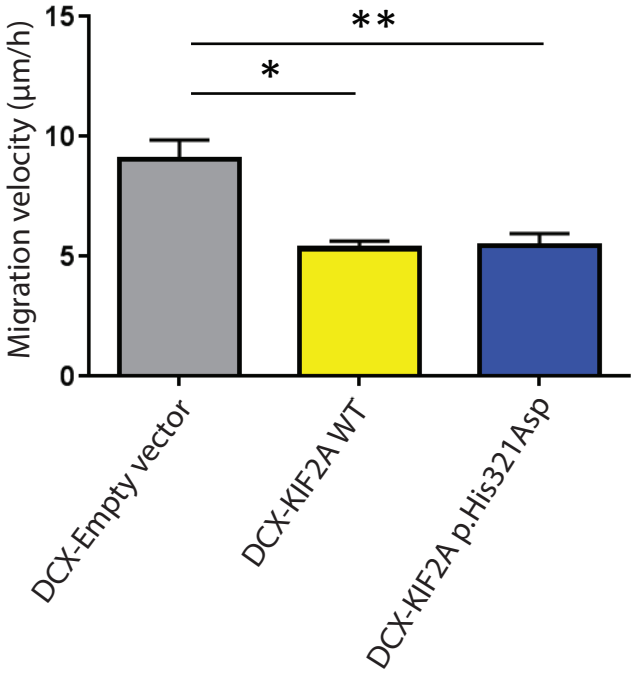
c



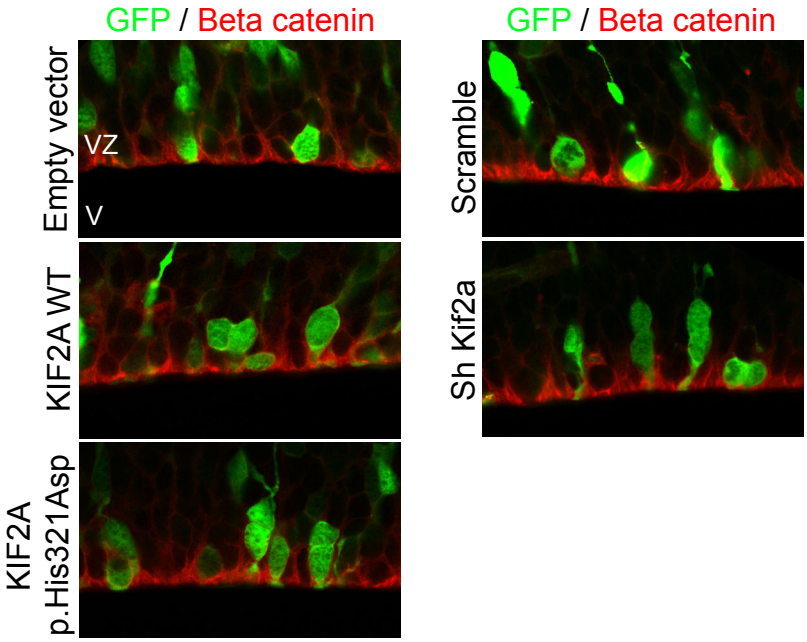
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4

RESULTATS

Article 3 :

Des mutations dans le domaine HECT de NEDD4L mènent à des dérégulations des voies AKT-mTOR et sont responsables d'hétérotopies nodulaires périventriculaires

nature genetics

Mutations in the HECT domain of *NEDD4L* lead to AKT–mTOR pathway deregulation and cause periventricular nodular heterotopia

Loïc Broix[1–5,22], Hélène Jagline[1–4,22], Ekaterina L Ivanova[1–4], Stéphane Schmucker[1–4], Nathalie Drouot[1–4], Jill Clayton-Smith[6], Alistair T Pagnamenta[7], Kay A Metcalfe[6], Bertrand Isidor[8], Ulrike Walther Louvier[9], Annapurna Poduri[10], Jenny C Taylor[7], Peggy Tilly[1–4], Karine Poirier[5], Yoann Saillour[5], Nicolas Lebrun[5], Tristan Stemmelen[1–4], Gabrielle Rudolf[1–4], Giuseppe Muraca[5], Benjamin Saintpierre[5], Adrienne Elmorjani[5], Deciphering Developmental Disorders study[11], Martin Moïse[12], Nathalie Bednarek Weirauch[13], Renzo Guerrini[14], Anne Boland[15], Robert Olaso[15], Cecile Masson[16], Ratna Tripathy[17], David Keays[17], Cherif Beldjord[18], Laurent Nguyen[12], Juliette Godin[1–4], Usha Kini[19], Patrick Nischké[16], Jean-François Deleuze[15], Nadia Bahi-Buisson[20], Izabela Sumara[1–4], Maria-Victoria Hinckelmann[1–4] & Jamel Chelly[1–4,21]

© 2016 Nature America, Inc. All rights reserved.

Neurodevelopmental disorders with periventricular nodular heterotopia (PNH) are etiologically heterogeneous, and their genetic causes remain in many cases unknown. Here we show that missense mutations in *NEDD4L* mapping to the HECT domain of the encoded E3 ubiquitin ligase lead to PNH associated with toe syndactyly, cleft palate and neurodevelopmental delay. Cellular and expression data showed sensitivity of PNH-associated mutants to proteasome degradation. Moreover, an *in utero* electroporation approach showed that PNH-related mutants and excess wild-type NEDD4L affect neurogenesis, neuronal positioning and terminal translocation. Further investigations, including rapamycin-based experiments, found differential deregulation of pathways involved. Excess wild-type NEDD4L leads to disruption of Dab1 and mTORC1 pathways, while PNH-related mutations are associated with deregulation of mTORC1 and AKT activities. Altogether, these data provide insights into the critical role of NEDD4L in the regulation of mTOR pathways and their contributions in cortical development.

Development of the human cerebral cortex requires coordinated spatial and temporal regulation of interdependent developmental processes that include proliferation, migration and layering, as well as differentiation of distinct neuronal populations[1,2]. Disruption of any of these processes can result in a wide range of developmental disorders. Many of these disorders are classified within the group of malformations of cortical development (MCD) that includes lissencephaly, pachygyria, polymicrogyria (PMG), microcephaly and PNH[3–5]. MCD are often associated with severe intellectual disability and epilepsy, and their evolving classification is based on the developmental process thought to be affected first in combination with the underlying disrupted genes and biological pathways[3].

Within the group of MCD associated with neuronal migration abnormalities, PNH represents about 31% of MCD (R.G., unpublished data). Anatomically, PNH is characterized by bilateral ectopic nodules of gray matter lining the lateral ventricles. Clinical presentations in patients with PNH are heterogeneous, although seizures and learning difficulties are the most common clinical features[5].

So far, mutations in the X-linked *FLNA* gene (filamin A)[6], encoding a widely expressed 280-kDa actin-binding phosphoprotein, account

[1]Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France. [2]CNRS U7104, Illkirch, France. [3]INSERM U964, Illkirch, France. [4]Université de Strasbourg, Illkirch, France. [5]Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS U8104, Paris Descartes University, Paris, France. [6]Manchester Centre for Genomic Medicine, Central Manchester University Hospitals NHS Trust, Manchester Academic Health Science Centre, Manchester, UK. [7]NIHR Biomedical Research Centre, Wellcome Trust Centre for Human Genetics, University of Oxford, Oxford, UK. [8]Service de Génétique Médicale, University Hospital of Nantes, Nantes, France. [9]Unité de Neuropédiatrie et d'Epileptologie Infantile, University Hospital of Montpellier, Montpellier, France. [10]Epilepsy Genetics Program, Division of Epilepsy and Clinical Neurophysiology, Department of Neurology, Boston Children's Hospital, Boston, Massachusetts, USA. [11]A list of members and affiliations appears at http://dx.doi.org/10.1101/049056. [12]Grappe Interdisciplinaire de Génoprotéomique Appliquée-Neurosciences, University of Liège, Liège, Belgium. [13]Hôpital Maison Blanche, University Hospital of Reims, Reims, France. [14]Paediatric Neurology Unit, A. Meyer Children's Hospital, University of Florence, Florence, Italy. [15]Centre National de Génotypage, Institut de Génomique, CEA, Evry, France. [16]Institut Imagine, Bioinformatics Platform, Paris Descartes University, Paris, France. [17]Institute of Molecular Pathology, Vienna, Austria. [18]Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire, Hôpital Cochin, Paris, France. [19]Department of Clinical Genetics, Oxford University Hospitals NHS Trust, Oxford, UK. [20]Institut Imagine, INSERM U1163, Paris Descartes University, Hôpital Necker–Enfants Malades, Paris, France. [21]Service de Diagnostic Génétique, Hôpital Civil de Strasbourg, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France. [22]These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to J.C. (chelly@igbmc.fr).

Received 1 April; accepted 24 August; published online 3 October 2016; doi:10.1038/ng.3676

for about 50% of bilateral PNH and the associated Ehler–Danlos conditions affecting mostly females[7]. Compelling studies suggested that *FLNA*-related PNH results from the combination of defects affecting the polarized radial glia scaffold and its adhesion to the neuroependymal membrane, neural progenitor proliferation and neuronal migration[8–10]. Other mechanisms contributing to PNH development were proposed following the identification of rare familial forms of PNH associated with recessive mutations in *ARFGEF2*, which encodes the ADP–ribosylation factor guanine exchange factor 2 (GEF2)[11]. Finally, other genetic forms of PNH have been mapped through array comparative genomic hybridization (aCGH) studies, but only one potential causal gene, *C6orf70* (*ERMARD*) located at 6q27, has been identified[12].

Here we provide evidence implicating the E3 ubiquitin ligase gene *NEDD4L* in the development of PNH. We report the identification of missense mutations in *NEDD4L* in patients with PNH, bilateral syndactyly, cleft palate and neurodevelopmental delay. We further show that PNH-related NEDD4L mutants disrupt neurodevelopmental processes, likely through dysregulation of the mTOR and AKT signaling pathways.

RESULTS

Patients with PNH analyzed by whole-exome sequencing and mutations in *NEDD4L*

We used clinical and brain magnetic resonance imaging (MRI) data from patients with MCD referred for genetic investigations and selected 15 patient–parent trios for analysis by whole-exome sequencing. All families had a single affected patient with bilateral PNH. For the whole-exome sequencing approach, we applied a previously described experimental workflow to detect and prioritize sequence variants and validate significant findings[13,14]. We then analyzed filtered exome data and searched for recurrence of *de novo* mutations in the same gene in unrelated patients. We identified *de novo* missense changes in *NEDD4L* in two patients with bilateral contiguous PNH, bilateral syndactyly of the second and third toes, and neurodevelopmental delay (P158 and BRC217; **Fig. 1a**,**b**, **Table 1** and **Supplementary Note**). After validation of the mutations by Sanger sequencing (**Supplementary Fig. 1a**,**b**), we screened *NEDD4L* (coding exons and their flanking sequences) in a cohort of 96 patients with MCD and identified the c.2677G>A mutation (already detected in BRC217) in one additional patient (P347; **Fig. 1c**, **Table 1** and **Supplementary Fig. 1c**). Interestingly, the phenotype of this patient was also characterized by bilateral PNH, bilateral syndactyly of the second and third toes, and neurodevelopmental delay (**Table 1** and **Supplementary Note**). As the family of patient P347 consisted of two affected children (P347 and her brother), a healthy girl and healthy parents (**Supplementary Fig. 1c**), we tested the segregation of the variant in all members of the family. We found the variant to be present in a heterozygous state in the affected brother but absent from the DNA of the healthy sister and father. For the mother, however, sequencing traces consistently showed an imbalance in the height of the peaks corresponding to normal and variant alleles (**Supplementary Fig. 1c**). Altogether, these results were suggestive of germline and somatic mosaicism of a *NEDD4L* variant in the mother. To confirm this and evaluate the level of somatic mosaicism, we analyzed the mother's DNA by digital droplet PCR and found that the frequency of the

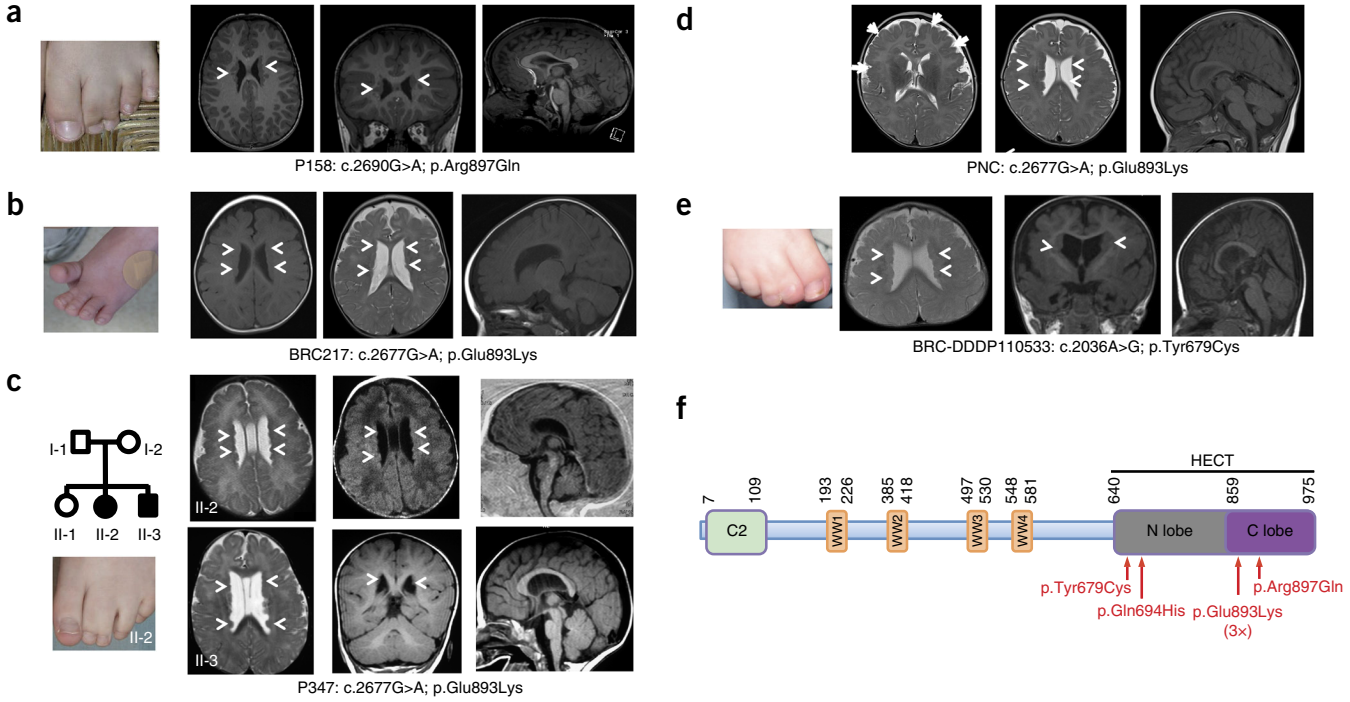


Figure 1 Mutations in *NEDD4L* cause PNH and syndactyly. (**a**–**e**) Photographs and representative sections of brain MRIs for affected individuals illustrating frequent toe syndactyly and constant PNH. For each patient, two axial sections, or one axial and one coronal section, show confluent nodules of heterotopia lining the lateral ventricles (arrowheads). Sagittal sections show thin (**c**) or dysmorphic (**a** and **c**, II-3) corpus callosum. In **d**, in addition to PNH (arrowheads), the MRI section shows frontal PMG (white arrows). MRIs were performed at the age of 8 years (**a**), 12 months (**b**), 9 and 12 months (**c**), 7 months (**d**) and 8 months (**e**). MRIs were not available for patient Pnh31124 with the c.2082G>T; p.Gln694His mutation. Written consent was obtained to publish patient photographs. (**f**) Linear representation of the NEDD4L polypeptide showing the positions in the HECT domain of the heterozygous PNH-associated mutations. NEDD4L protein is characterized by an N-terminal C2 domain known to bind Ca^{2+} and phospholipids[17], two to four WW protein–protein interaction domains[16] responsible for recognition of the substrate, and the C-terminal catalytic HECT domain[18].

© 2016 Nature America, Inc. All rights reserved.

Table 1 Summary of clinical and neuroimaging features of patients harboring *NEDD4L* mutations

Patients with PNH	P158 c.2690G>A p. Arg897Gln	P347 c.2677G>A p.Glu893Lys P347-II.2	P347-II.3	BRC217 c.2677G>A p.Glu893Lys	PNC c.2677G>A p.Glu893Lys	Pnh31124 c.2082G>T p.Gln694His	DDDP110533 c.2036A>G Tyr679Cys
Inheritance	*De novo*	Maternal mosaicism	Maternal mosaicism	*De novo*	*De novo*	*De novo*	*De novo*
Sex	M	F	M	F	F	F	M
Birth (GW)	40	41	41	41	38	Full term	40
Birth weight	3,750	3,160	NA	3,120	3,360	NA	3,000
Syndactyly	+	+	+	+	–	+	+
Hypotonia	+ (at birth)	NA	NA	++ (at 2 months)	+ (axial hypotonia at 34 months)	+	+ (unable to sit or walk at 6 years)
Cleft palate	–	+	Bifid uvula	+	+	+	+ (with micrognathia)
Age at last examination	6 years	12 years	2 years	4 months	4 years	8 months	6.2 years
HC (cm)	54 (+1.5 s.d.)	50 (–2.4 s.d.)	49.8 (+0.7 s.d.)	39 (–1.2 s.d.)	48 (–1.2 s.d.)	43 (–1 s.d.)	49.7(–2.32 s.d.)
Height (cm)	1.08 (–1.5 s.d.)	125 (–3.5 s.d.)	88 (+0.8 s.d.)	61 (M)	100 (+2 s.d.)	68 (–0.5 s.d.)	NA
Weight (kg)	16.5 (–1.5 s.d.)	25 (–2.5 s.d.)	10.9 (+0.7 s.d.)	5.29 (–1.1 s.d.)	14 (–0.8 s.d.)	7.6 (–2 s.d.)	20 (–0.51 s.d.)
Developmental delay	+	+ (severe)	+ (severe)	+	+	+	+ (severe)
Seizures	–	+ (late onset)	+	–	–	+ (IS at 5 months)	+
Brain MRI findings	At 8 years	At 9 months	At 2 months	At 12 months	At 7 months	At 8 months	At 8 months
PNH	+ (bilateral)	+ (bilateral)	+ (bilateral)	+ (bilateral)	+ (bilateral)	+ (bilateral)	+ (bilateral)
CC anomalies	–	–	–	Dysmorphic	Dysmorphic	–	–
Cortex anomalies	–	Cerebral atrophy	–	Frontal cortical dysplasia	PMG	–	–
Cerebellum anomalies	–	–	–	–	–	–	–
Other	Myopia	Optic atrophy Hearing impairment	Convergent Strabismus cryptorchidism	Hearing impairment,	Dysmorphic features	Abnormal visual evoked potentials, optic nerve pallor	Arthrogyposis, cryptorchidism, ptosis, complex strabismus

PNH, periventricular nodular heterotopia; PMG, polymycrogyria; CC, corpus callosum; GW, gestational week; HC, head circumference; IS, infantile spasm; NA, not available; +, present; –, absent. Transcript NM_001144967.2 (ENST00000400345) and protein Q96PU5 were used for annotation of nucleotide and protein changes, respectively.

mutated allele was around 16% (**Supplementary Table 1**). In view of these molecular data, the mother was reexamined and neurological, cognitive and behavioral evaluations were found to be normal.

Shortly after these initial findings, we reinforced the implication of *NEDD4L* by the identification of additional *de novo* mutations in three unrelated patients with PNH (**Table 1**). The first patient (PNC: **Fig. 1d**, **Table 1** and **Supplementary Fig. 1d**) was identified through targeted screening of an MCD-related panel of genes in which we included *NEDD4L*. The second and third patients—DDDP110533 (**Fig. 1e**, **Table 1** and **Supplementary Fig. 1e**) and Pnh31124 (**Table 1** and **Supplementary Fig. 1f**)—were identified through data sharing of trios exome sequenced and analyzed as part of the Deciphering Developmental Disorders and Epi4K Consortium studies. For all three patients, brain MRI results also showed the presence of PNH associated with syndactyly and neurodevelopmental delay (**Fig. 1d**,**e**, **Table 1** and **Supplementary Note**).

NEDD4L[15] (also known as *NEDD4-2*) encodes a member of the NEDD4 family of HECT-type E3 ubiquitin ligases known to regulate the turnover and function of a number of proteins involved in fundamental cellular pathways and processes[16–19]. Interestingly, all mutations associated with PNH mapped to the HECT domain (**Fig. 1f**), and relevance of their pathogenic effect was suggested by the high degree of conservation of the affected residues (**Supplementary Fig. 2a**), bioinformatics predictions (from the MutationTester tool) and structural modeling of the HECT domain (**Supplementary Fig. 2b–j**).

Functional effects of wild-type *NEDD4L* and *NEDD4L* mutants

We first analyzed the expression of *Nedd4l* during mouse brain development. As illustrated in **Supplementary Figure 3a** (*in situ* hybridization at embryonic day (E) 15), *Nedd4l* transcripts were homogenously distributed in the cortical plate, ventricular zone and ganglionic eminences. Moreover, analysis of *Nedd4l* expression by real-time qPCR in developing mouse cortex from E12.5 to E18.5 showed a peak of expression at E16.5 (**Supplementary Fig. 3b**), a developmental stage characterized by both proliferation and migration.

To assess the cellular consequences of PNH-related mutations, we transfected N2A cells with cDNA constructs for wild-type NEDD4L and three different mutants and compared expression levels and localization by immunofluorescence (**Fig. 2**). We found that wild-type NEDD4L was highly expressed (**Fig. 2a** and **Supplementary Fig. 4**), and its localization was in line with what was previously reported[20]. In contrast, PNH-related mutant proteins were hardly detectable. Indeed, 48 h after transfection, we only detected a faint signal, comparable to the background signal of cells transfected with control empty vector (**Fig. 2a**). Similar results were observed upon transfection of primary cultured mouse neurons (**Supplementary Fig. 4**). We also confirmed the lack of mutant NEDD4L expression by immunoblotting using protein extracts from transfected N2A cells (**Fig. 2b**). In view of these results, we hypothesized that PNH-associated mutants are unstable and examined NEDD4L protein expression in transfected cells treated with the proteasome inhibitor MG132. We observed by immunofluorescence and immunoblot experiments high levels of expression of PNH-related NEDD4L mutants (**Fig. 2a**,**b**).

To further ascertain that the instability of NEDD4L mutant proteins represents a disease-relevant phenotype, we tested the expression of three control variants reported in the ClinVar and/or Exome Aggregation Consortium (ExAC) databases. Referring to NM_001144967, these variants are c.698C>T, p.Ser233Leu; c.535T>A, p.Ser179Thr and c.2614G>A, p.Gly872Ser (located in the HECT domain). Cellular localization and expression levels for the different control versions of NEDD4L constructs were similar to those of wild-type NEDD4L (**Supplementary Fig. 5a**,**b**).

To strengthen the implication of a post-transcriptional mechanism, we analyzed the expression of *NEDD4L* transcripts by qRT–PCR using

© 2016 Nature America, Inc. All rights reserved.

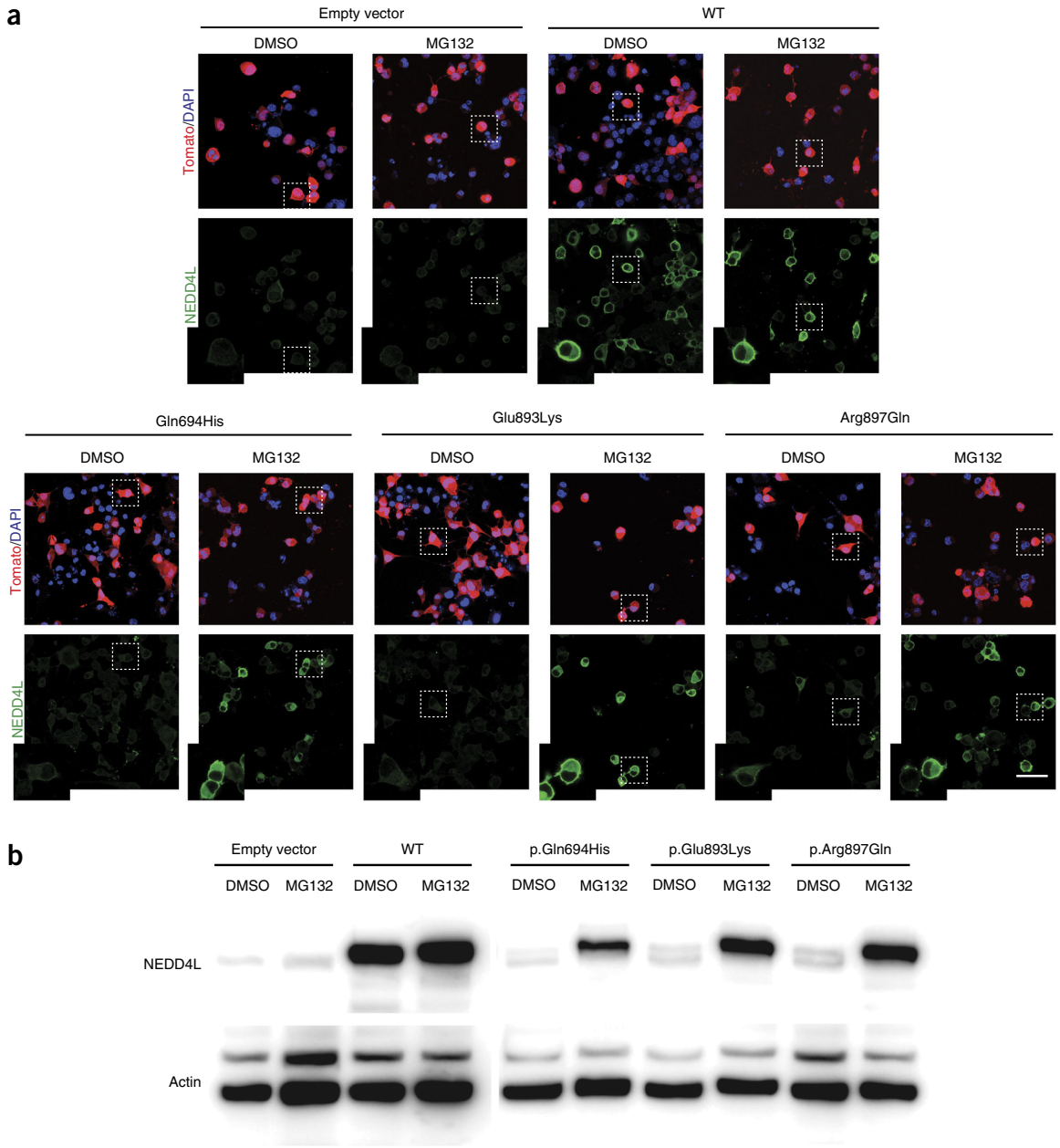


Figure 2 Expression and cellular localization of wild-type and mutant NEDD4L. (**a**) Tomato/DAPI and NEDD4L detection in N2A cells transfected with empty vector or cDNA constructs encoding wild-type (WT) or mutant NEDD4L. For each construct, cultured cells were treated with either DMSO or MG132. NEDD4L immunostaining shows a cytoplasmic distribution with enrichment in the periphery of N2A cells for wild-type NEDD4L, whereas the Gln694His, Glu893Lys and Arg897Gln mutants are not detectable. Scale bar, 50 μm. (**b**) Immunoblots using protein extracts from N2A cells transfected with constructs encoding wild-type and mutant NEDD4L and cultured in the presence of either DMSO or MG132. Blots show lack of expression of PNH-associated mutants, while transfection for wild-type NEDD4L led to a high level of expression for NEDD4L protein. Note that PNH-associated NEDD4L mutants become detectable upon treatment of N2A cells with MG132.

© 2016 Nature America, Inc. All rights reserved.

cotransfected reporter GFP as a normalizer. We found that wild-type *NEDD4L* transcript levels were approximately 1.5- to 2-fold higher than mutant levels (**Supplementary Fig. 6**), a range of difference that does not explain the almost complete absence of the mutant proteins.

Because all the mutations map to the catalytic HECT domain of the NEDD4L E3 ligase and lead to protein instability, we sought to assess the consequences of disease-causing variants for enzymatic activity and self-ubiquitination. To this end, we focused on the Arg897Gln mutant and compared by two different approaches the ubiquitination ability of wild-type NEDD4L and the mutant.

First, to test specifically for NEDD4L ubiquitination, we transfected N2A cells with cDNA constructs encoding N-terminally V5-tagged NEDD4L, immunoprecipitated NEDD4L from lysates using antibody to V5 and immunoblotted with an antibody to ubiquitin to detect conjugation of ubiquitin. Long exposure times for the immunoblots showed a high-molecular-mass smear mainly representing self-ubiquitinated wild-type and mutant NEDD4L. Interestingly, despite the instability of the V5-tagged mutant protein and its low amount, the intensity of the smear detected by antibody to ubiquitin was comparable to that for the wild-type protein (**Supplementary Fig. 7a**).

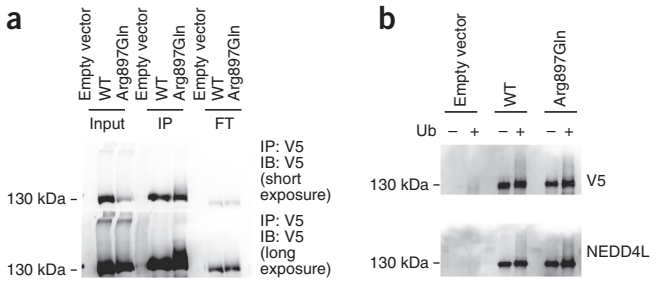


Figure 3 Ubiquitination activity of mutant NEDD4L. (**a**) Immunoprecipitation assay (IP; using antibody to V5 to precipitate tagged NEDD4L), with precipitates analyzed by immunoblot (IB) using antibodies to ubiquitin and V5 to detect ubiquitinated NEDD4L (FT, flow through). (**b**) Analysis of NEDD4L ubiquitination activity in an *in vitro* assay using wild-type and mutant NEDD4L immunopurified from the lysates of transfected N2A cells and incubated with ATP, E1 enzyme and E2 (UbcH7) enzyme with (+) or without (–) ubiquitin (Ub). Reaction mixtures were analyzed by immunoblotting with antibodies to V5 and NEDD4L. Note that, because of the instability of mutant NEDD4L and the resulting imbalance in the amounts of wild-type and mutant NEDD4L and corresponding immunoblot signals, as shown in **Supplementary Figure 7**, immunoblot analysis was performed using four times less reaction mixture for wild-type NEDD4L than for mutant NEDD4L.

Second, we compared the ubiquitination ability of immunopurified V5-tagged NEDD4L (wild type and mutant) in an *in vitro* assay using recombinant E1 and E2 (UbcH7) enzymes with or without ubiquitin. In the presence of ubiquitin, both wild-type and mutant NEDD4L exhibited ubiquitination activity as illustrated by the high-molecular-mass smear detected by antibody to NEDD4L (**Supplementary Fig. 7b**).

To further confirm and better visualize the ubiquitination activity of the NEDD4L mutant, we performed another series of immunoprecipitation and *in vitro* assays and immunoblot analysis in which we loaded four times less protein products to the assay with wild-type NEDD4L than to the one with mutant NEDD4L (**Fig. 3**). Although accurate comparison of wild-type and mutant NEDD4L ubiquitination activities is difficult, both immunoprecipitation (**Fig. 3a**) and *in vitro* ubiquitination (**Fig. 3b**) approaches showed that mutant NEDD4L induced a high-molecular-mass smear detected with antibodies to V5 and NEDD4L.

These results suggest that the ubiquitination activity of mutant NEDD4L is preserved and possibly enhanced if we take into account the substantial level of ubiquitination activity despite the instability of the protein.

At first sight, the fact that PNH-related NEDD4L mutants are unstable led us to consider a haploinsufficiency mechanism. However, previously reported findings and our data made this hypothesis questionable. For instance, postmitotic neurons deficient for both *Nedd4-1* and *Nedd4l* (analyzed in conditional double-knockout mice) migrate properly to the cortical plate[21]. Also, neuronal migration disorders and PNH are not among the features associated with haploinsufficiency resulting from heterozygous copy number variations (CNVs) reported in DECIPHER databases. Moreover, one stop-gain and three frameshift mutations were reported in the ExAC data set from which individuals affected by severe pediatric disease have been excluded. Finally, we used an *in utero* RNA interference

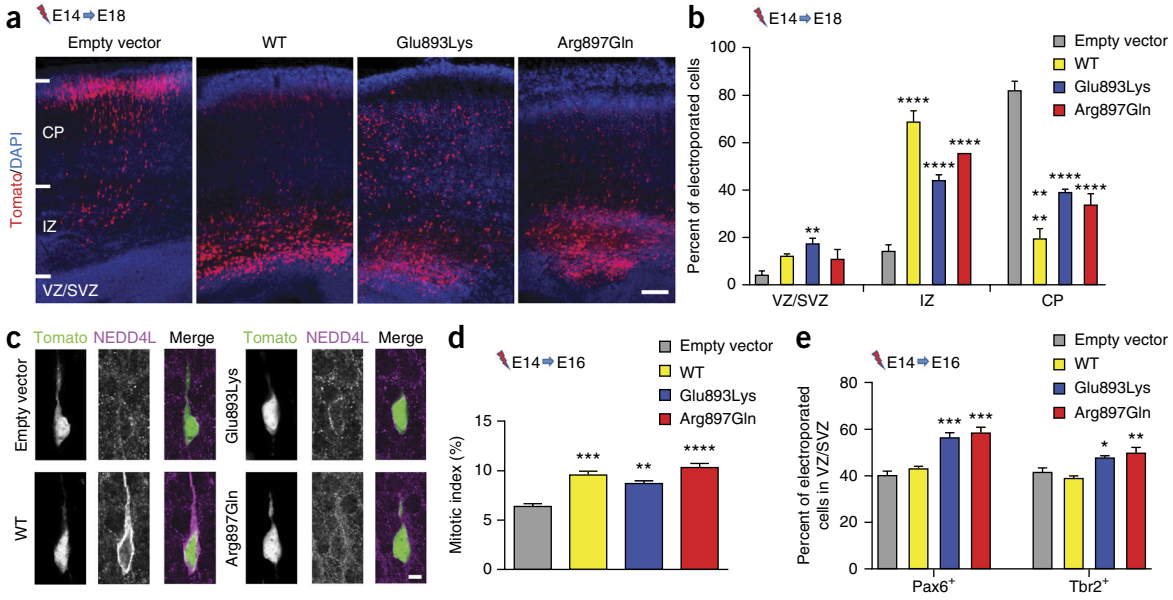


Figure 4 Effect of wild-type and mutant NEDD4L on neuronal position and progenitor proliferation. (**a**) Coronal sections of mouse brains at E18.5, 4 d after IUEP with empty vector, wild-type NEDD4L or mutant NEDD4L constructs in combination with a Tomato reporter construct. CP, cortical plate; IZ, intermediate zone; VZ/SVZ, ventricular zone/subventricular zone. Scale bar, 100 μm. (**b**) Fluorescent neurons were quantified in the regions highlighted in **a**: VZ/SVZ: empty vector (EV) vs. Glu893Lys, $P = 0.0078$; IZ: EV vs. WT, $P < 0.0001$, EV vs. Glu893Lys, $P < 0.0001$, EV vs. Arg897Gln, $P < 0.0001$; CP: EV vs. WT, $P < 0.0001$, EV vs. Glu893Lys, $P < 0.0001$, EV vs. Arg897Gln, $P < 0.0001$. Bars represent the means of fluorescent neurons ± s.e.m. of independent brains (EV, $n = 4$; WT, $n = 3$; Glu893Lys, $n = 4$; Arg897Gln, $n = 3$). (**c**) Immunofluorescence staining of NEDD4L in Tomato-positive neurons in the intermediate zone of E18.5 brains electroporated at E14.5 with NEDD4L constructs. Scale bar, 5 μm. (**d**) Percentage of electroporated neurons positive for the PH3 marker against all electroporated cells (mitotic index) in the ventricular zone as in **a** (**Supplementary Fig. 9d**): EV vs. WT, $P < 0.0001$, EV vs. Glu893Lys, $P = 0.0021$, EV vs. Arg897Gln, $P = 0.0001$. Numbers of analyzed brains are as follows: EV, $n = 4$; WT, $n = 3$; Glu893Lys, $n = 4$; Arg897Gln, $n = 3$). Error bars, s.e.m. (**e**) Quantification of Pax6$^+$Tomato$^+$ and Tbr2$^+$Tomato$^+$ cells in the ventricular zone/subventricular zone as in **a** (**Supplementary Fig. 9e**) 2 d after electroporation at E14.5: Pax6: EV vs. Glu893Lys, $P = 0.0003$, EV vs. Arg897Gln, $P = 0.0001$; Tbr2: EV vs. Glu893Lys, $P = 0.0147$, EV vs. Arg897Gln, $P = 0.0014$ (EV, $n = 4$; WT, $n = 3$; Glu893Lys, $n = 4$; Arg897Gln, $n = 3$). Error bars, s.e.m. $^*P \leq 0.05$, $^{**}P \leq 0.01$, $^{***}P \leq 0.001$, $^{****}P \leq 0.0001$.

© 2016 Nature America, Inc. All rights reserved.

approach to analyze the consequences of *Nedd4l* downregulation on cortical neuronal migration in mice and found no significant difference between embryo brains transfected with short hairpin RNA (shRNA) targeting *Nedd4l* and scrambled shRNA control (**Supplementary Fig. 8a**,**b**).

In view of these convergent arguments, we then sought to study the consequences of PNH-related mutations for neurodevelopmental processes. We used an *in utero* electroporation (IUEP) approach and compared the consequences of expression of wild-type NEDD4L and mutants (Glu893Lys and Arg897Gln) for neuronal positioning, neuronal progenitor proliferation and terminal translocation. To assess effects on projection neuron positioning, we electroporated *NEDD4L* constructs in combination with Tomato reporter construct into progenitor cells located in the ventricular zone of E14.5 mouse neocortices and analyzed embryo brains 4 d later (E18.5). In E18.5 brain sections, we observed that neurons electroporated with the empty vector reached the cortical plate (**Fig. 4a**,**b**). However, IUEP of wild-type NEDD4L and PNH-related mutants induced significant arrest of cells within the ventricular zone and subventricular zone and intermediate zone with corresponding depletion in the cortical plate (**Fig. 4a**,**b**). We also assessed the effect on neuron positioning at postnatal day (P) 2 and highlighted differences that paralleled those observed at E18.5. Whereas neurons electroporated with empty vector were mainly located in superficial layers II–IV of the cortical plate, we found that neurons electroporated with constructs for wild-type NEDD4L and PNH-related mutants were abnormally distributed in the white matter and in layers V and VI of the cortical plate (**Supplementary Fig. 9a**,**b**).

As our cellular data suggested that PNH-related NEDD4L mutants are unstable, we also assessed whether the same effect could be observed *in vivo* in electroporated migrating neuronal cells. We found that cells electroporated with construct for wild-type NEDD4L exhibited strong cytoplasmic immunolabeling (**Fig. 4c** and **Supplementary Fig. 9c**), consistent with a high level of NEDD4L expression. However, in neurons electroporated with mutant constructs, we only detected a faint signal that could correspond to endogenously expressed NEDD4L (**Fig. 4c** and **Supplementary Fig. 9c**).

To study terminal translocation[22–25], we conducted IUEP of the different constructs at E14.5 and collected brains 6 d later (P2) from the pups. We then assessed the distribution of electroporated neurons with a leading process adhering to the extracellular matrix (ECM) in the region previously defined as the primitive cortical zone (PCZ)[24], and in the upper and lower Cux1 regions corresponding to two equal parts of the remaining Cux1-positive layer (**Supplementary Fig. 10**). We found that expression of wild-type and mutant NEDD4L led to an abnormal distribution of neuronal cells with a deviating enrichment in the lower Cux1 region (**Supplementary Fig. 10**), suggesting that terminal translocation was disrupted.

To test the consequences of the *NEDD4L* mutations on apical and basal progenitor proliferation, we performed IUEP at E14.5 and collected embryos 48 h later for immunohistochemistry using antibodies against PH3, Pax6, Tbr2 and Ki67. We found a significantly higher percentage of Tomato-positive and PH3-positive co-labeled cells expressing wild-type protein or HECT-domain mutants in the ventricular zone when compared to Tomato-positive cells expressing the control empty vector (**Fig. 4d** and **Supplementary Fig. 9d**). These results suggested an increased mitotic index of apical progenitors electroporated with wild-type NEDD4L and PNH-related mutants. We also quantified electroporated Pax6-positive and Tbr2-positive cells in the ventricular zone and subventricular zone and found an increased number of these cell populations only in brains electroporated with PNH-related mutant constructs (**Fig. 4e** and **Supplementary Fig. 9e**).

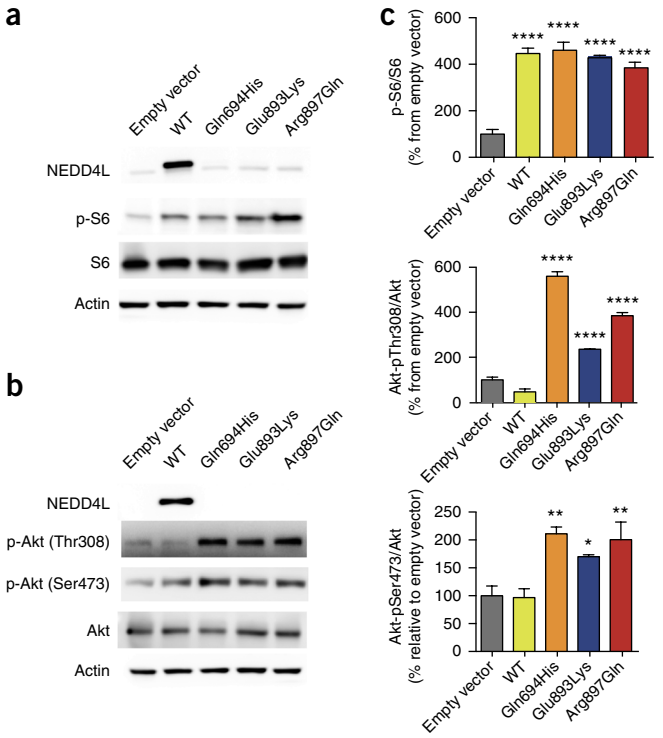


Figure 5 Wild-type NEDD4L and PNH-related mutants induce deregulation of mTORC1 and AKT activities. (**a**,**b**) Representative immunoblots using protein extracts from N2A cells transfected with empty vector or constructs for wild-type and mutant NEDD4L, showing the effect of wild-type and mutant NEDD4L on the levels of phosphorylated S6 (p-S6; reflecting mTORC1 activity) (**a**) and phosphorylated Akt (p-Akt; Thr308/Ser473) (**b**). (**c**) Histograms of densitometric measurements illustrating S6 and Akt phosphorylation. Data represent means ± s.e.m. from three independent experiments (Online Methods and **Supplementary Table 2**). $^{*}P \leq 0.05$, $^{**}P \leq 0.01$, $^{***}P \leq 0.001$, $^{****}P \leq 0.0001$.

To assess the pool of proliferating cells, we evaluated cells positive for both Tomato and Ki67 in the ventricular zone and subventricular zone; in both regions, we did not observe any differences following electroporation with control empty vector and cDNA constructs encoding wild-type and mutant NEDD4L (**Supplementary Fig. 9f**,**g**).

We also performed immunohistochemistry against the Cux1 marker at E18.5 and observed that arrested neurons electroporated with wild-type NEDD4L or PNH-related mutants expressed Cux1, indicating that misplaced neurons in deep layers of the cortex are differentiated and fated for upper layers (**Supplementary Fig. 9h**).

Finally, we labeled brain slices (E16.5 and E18.5) with antibody to cleaved caspase-3 to evaluate cell death rate and found no difference following electroporation with the different constructs (data not shown).

Pathways disrupted by wild-type and mutant NEDD4L causing PNH

Although the best known target of NEDD4L is the epithelial sodium channel (ENaC), shown to be involved in Liddle syndrome, a hereditary hypertension caused by elevated ENaC activity[26], compelling evidence demonstrating crucial regulatory roles of NEDD4L in developmental processes has recently emerged[19,27]. In this study, we sought to investigate the consequences of wild-type and mutant NEDD4L on mTOR-dependent pathways for the following main reasons.

© 2016 Nature America, Inc. All rights reserved.

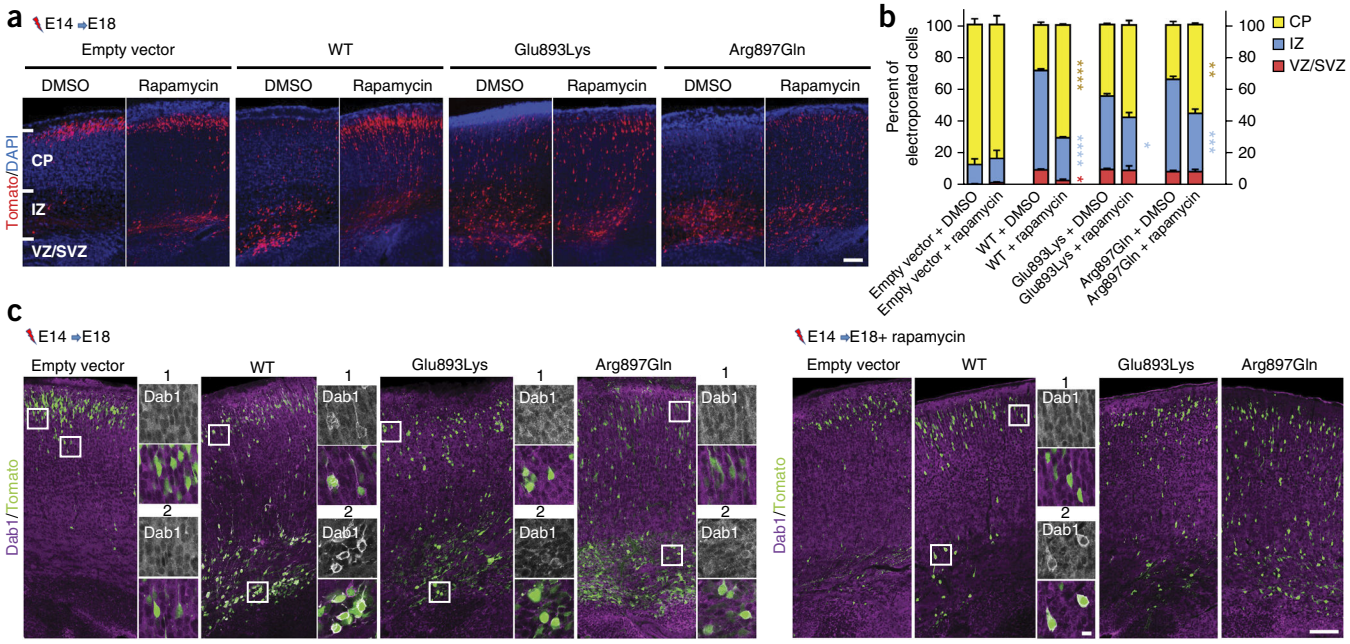


Figure 6 Effect of rapamycin treatment on neuronal positioning and Dab1 localization. (**a**) Confocal microscopy images of coronal sections from E18.5 brains electroporated at E14.5 with empty vector or constructs for wild-type and mutant NEDD4L together with a Tomato reporter vector. After IUEP, pregnant mice were treated with either vehicle (DMSO) or rapamycin (0.5 mg/kg/d). Scale bar, 100 μm. (**b**) Electroporated neurons were quantified in the regions indicated in **a**: VZ/SVZ: WT DMSO vs. WT rapamycin, $P = 0.012$, IZ: WT DMSO vs. WT rapamycin, $P < 0.0001$, Glu893Lys DMSO vs. Glu893Lys rapamycin, $P = 0.0377$, Arg897Gln DMSO vs. Arg897Gln rapamycin, $P = 0.0004$; CP: WT DMSO vs. WT rapamycin, $P < 0.0001$, Arg897Gln DMSO vs. Arg897Gln rapamycin, $P = 0.0013$. Bars represent the means of electroporated neurons in each region ± s.e.m. from three independent brains. (**c**) Immunolabeling of Dab1 on cortical slices at E18.5 from the brains of embryos subjected to DMSO or rapamycin treatment. Panels to the right of each coronal section are higher-magnification views of the regions enclosed in white boxes in the cortical plate (1) and intermediate zone (2) showing the distribution of Dab1. In arrested neurons electroporated with construct for wild-type NEDD4L from non-treated mice, note the specific pattern of Dab1 distribution and its enrichment in the periphery of the cytoplasm (mainly in arrested neurons of the intermediate zone and, to a lesser extent, neurons of the cortical plate). Scale bars, 100 μm and 10 μm (higher-magnification images). $^{*}P \leq 0.05$, $^{**}P \leq 0.01$, $^{***}P \leq 0.001$, $^{****}P \leq 0.0001$.

© 2016 Nature America, Inc. All rights reserved.

First, in view of the association of MCD and distal-limb abnormalities observed in patients described in this study, we wondered whether these developmental abnormalities represent a particular condition in the wide range of developmental brain and body disorders caused by dysfunctions of the interdependent phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)–AKT–mTOR pathways[5,14]. Second, among the many identified signaling pathways that modulate neuronal migration, the recently reported insights linking neuronal migration deficit in tuberous sclerosis complex (TSC) pathology with a cascade involving mTOR signaling, E3 ubiquitin ligase Cul5 expression and Dab1 expression[28] also led us to consider a potential effect of NEDD4L on mTOR and Dab1 signaling pathways. Third, NEDD4L was recently identified as a critical player in regulation of the crosstalk between PI3K–mTORC2 and TGF-β–activin–Smad2–Smad3 (Smad2/3) signaling pathways[29,30].

Therefore, we first tested by cellular and immunoblot assays the effect of wild-type and mutant NEDD4L on mTORC1, Akt and Smad2/3 signaling activities. Following transfection of N2A cells with constructs for wild-type NEDD4L and PNH-associated mutants, we observed an increased level of phosphorylated S6 (Ser240/Ser244) that reflects elevated mTORC1 signaling activity (**Fig. 5a,c**). In contrast, for Akt, only PNH-associated NEDD4L mutants were associated with significantly increased levels of Akt forms phosphorylated at Thr308 and Ser473 (**Fig. 5b,c**).

To reinforce the relevance and specificity of NEDD4L mutant expression to the above highlighted findings, we tested the effect of the three control variants on S6 and Akt phosphorylation and found that overexpression of the three NEDD4L variants was associated with a phosphorylation pattern that was similar to the one with wild-type NEDD4L (**Supplementary Fig. 5b**).

For Smad2/3 activity, we tested the effect of wild-type and Arg897Gln NEDD4L under the basal condition and upon activation of the TGF-β pathway by activin A on the expression levels of Smad2 phosphorylated at Ser465/Ser467, Smad3 phosphorylated at Ser423/Ser425 and Akt phosphorylated at Ser473. Under the basal condition, we found that overexpression of wild-type NEDD4L had no effect on the activation level of Smad2/3, whereas expression of mutant NEDD4L was associated with a substantial increase in the levels of phosphorylated Smad2/3 (**Supplementary Fig. 11**). Upon activation by activin A of the TGF-β pathway, we found that overexpression of wild-type NEDD4L was associated with an increase in the levels of phosphorylated Akt and Smad2/3, whereas expression of the NEDD4L mutant was associated with a substantial decrease in the levels of phosphorylated Akt and stable levels of phosphorylated Smad2/3 (**Supplementary Fig. 11**). Collectively, these results suggested that expression of the NEDD4L mutant leads to disruption of the regulated crosstalk between Akt and Smad2/3 signaling in activin–TGF-β pathways.

To assess the *in vivo* contributions of these pathways to the developmental defects described above, we used an IUEP approach in combination with treatment with rapamycin (a well-known mTORC1 inhibitor) on pregnant mice and analyzed the effect on projection neuron positioning. Interestingly, in E18.5 brain sections from embryos electroporated at E14.5 with wild-type NEDD4L and subjected to

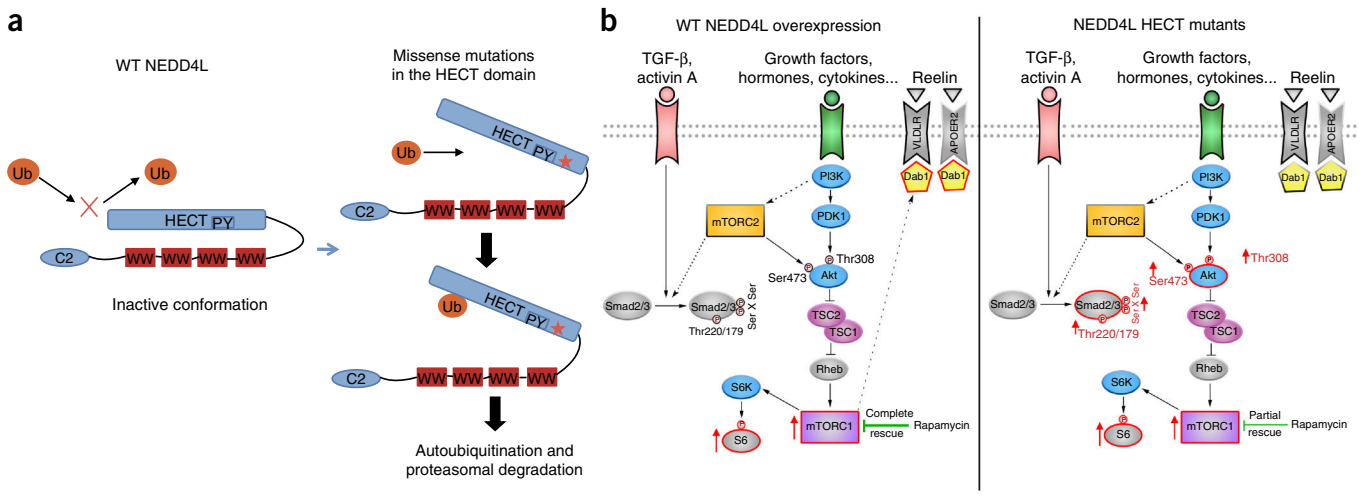


Figure 7 Models depicting the consequences of PNH-related mutations for NEDD4L stability and PI3K–Akt–mTOR and TGF-β–Smad pathways. (**a**) Wild-type NEDD4L (left) is shown in its closed and inactive conformation, and mutant NEDD4L (right) is shown with an alteration in the HECT domain predicted to lead to conformational changes that favor transition from the inactive state to the open, active state and trigger autoubiquitination and degradation. (**b**) Overview of observed deregulations under basal conditions resulting from an excess of wild-type NEDD4L (left) and expression of PNH-related NEDD4L mutants (right). Red contours indicate deregulated proteins, and dotted arrows depict indirect and poorly understood relationships between components of signaling pathways.

© 2016 Nature America, Inc. All rights reserved.

rapamycin treatment, we found clear rescue of the neuronal positioning defect with a distribution of electroporated cells across the cortex similar to what was observed in embryos electroporated with control empty vector (**Fig. 6a**,**b**). For this latter condition, the distribution of neuronal cells with or without rapamycin treatment was similar (**Fig. 6a**,**b**). However, rapamycin treatment induced only a partial rescue of the neuronal position defect resulting from IUEP with constructs for PNH-related mutants (**Fig. 6a**,**b**). We found that the number of Tomato-positive neurons with delayed migration was reduced in the intermediate zone, while the number of neurons that reached the cortical plate was significantly increased (**Fig. 6a**,**b**). We also analyzed the expression of NEDD4L in neuronal cells that reached the cortical plate after rapamycin treatment and found an absence of NEDD4L expression in neurons electroporated with constructs for PNH-associated mutants (data not shown), whereas neurons electroporated with construct for wild-type NEDD4L still expressed a high level of NEDD4L (**Supplementary Fig. 12**).

We then analyzed brain sections by immunohistochemistry using antibodies against Dab1 and assessed whether rapamycin-rescued neuronal position correlates with relevant changes in Dab1 expression and distribution in electroporated neurons. In arrested neuronal cells electroporated with construct for wild-type NEDD4L, we found striking labeling suggesting enrichment and nearly exclusive localization of Dab1 in the periphery of the cytoplasm, a distribution that is easily distinguishable from the diffuse pattern found in neurons electroporated with empty vector or mutant constructs (**Fig. 6c**). Interestingly, following rapamycin treatment, in the predominant pool of neurons that reached the cortical plate and that still expressed a high level of wild-type NEDD4L, we found restoration of the diffuse pattern of Dab1 localization (**Fig. 6c**). However, in neurons electroporated with constructs for PNH-associated mutants, no significant change in Dab1 cellular localization was observed, either in misplaced neurons or in the rescued neurons that reached the cortical plate (**Fig. 6c**).

DISCUSSION

Our findings demonstrate the critical role of NEDD4L in the regulation of processes involved in cortex development and implicate mutations in the HECT domain of *NEDD4L* in PNH. We report the identification of one transmitted and five *de novo* mutations in seven patients (two siblings and five unrelated patients) with a common distinguishable phenotype characterized by PNH, intellectual disability, cleft palate and syndactyly (in six of seven patients). All mutations associated with this phenotype are located in the region of *NEDD4L* encoding the HECT domain of the E3 ubiquitin ligase NEDD4L, and one of these mutations, c.2677G>A, p.Glu893Lys, is a recurrent mutation that was found in three unrelated families (**Table 1**).

One of the intriguing effects of the PNH-related mutations was the likely increase in sensitivity of the corresponding mutants to proteasome degradation. To explain this sensitivity, we propose the hypothesis illustrated by the model in **Figure 7a**. Mutations causing amino acid changes in the HECT domain could lead to conformation changes and constitutive activation of catalytic function, which in turn could trigger autoubiquitination of NEDD4L mutant variants and their degradation. This hypothesis is based on previously reported studies suggesting that catalytic activity, including autoubiquitination of HECT E3 ligases, is dependent on NEDD4L conformation[31–34].

With the model of constitutive activation due to mutations in the HECT domain, one could expect not only autoubiquitination but also aberrant ubiquitination of other NEDD4L substrates, whereas a conventional loss-of-function mechanism is expected to lead to a deficit in ubiquitination activity. Moreover, despite autoubiquitination and degradation, the predicted state of constitutive activation for NEDD4L mutants could mimic the increased activity resulting from the overexpression of wild-type NEDD4L. This model could therefore reconcile, at least partially, the apparent discrepancy regarding the observed similar neurodevelopmental defects resulting from IUEP of stable wild-type NEDD4L and the unstable NEDD4L mutants.

Another finding that was observed with wild-type and mutant NEDD4L corresponds to a positioning defect of postmitotic neuronal cells. In the misplaced neuronal cells overexpressing wild-type NEDD4L, we observed a distinct pattern of Dab1 distribution. It is worth mentioning that this finding is in line with previously reported studies that demonstrated association between excess nucleocytoplasmic Dab1 in the cytoplasm of postmitotic neurons and its inhibitory

effect on neuronal migration[35]. In arrested neuronal cells electroporated with NEDD4L mutants, the unchanged distribution of Dab1 suggests that the neuronal migration defect caused by NEDD4L mutants could be mediated by a mechanism divergent from the one disrupted by overexpression of wild-type NEDD4L. In favor of this view is evidence suggesting that excess wild-type NEDD4L is associated with the disruption of signaling pathways regulated by mTORC1 and Dab1. In contrast, PNH-related mutants might act through deregulation of mTORC1, Akt, mTORC2 and TGF-β–Smad2/3 pathway activities (**Fig. 7b**). Although further investigations are required to define the exact mechanisms by which NEDD4L overexpression and variants affect these pathways, these hypotheses are supported by a recent study showing that NEDD4L catalyzes ubiquitination of PIK3CA and regulates PI3K–AKT signaling[35] and by our rapamycin-based experiments. Indeed, the consistent rescue of the neuronal position defect and restoration of the cellular distribution of Dab1 by rapamycin treatment suggest that the migration and positioning defects induced by overexpression of wild-type NEDD4L could be mediated by mTORC1 pathway deregulation.

For PNH-related mutants, in addition to the increased activity of mTORC1, the deregulation of Akt and Smad2/3 activities under basal conditions and upon TGF-β activation provides an interesting entry point to understand further the role of NEDD4L in the regulation of neurodevelopmental processes underlying cortical development and the established implication of PI3K–AKT signaling pathways in a large spectrum of neurodevelopmental syndromes caused by activating mutations in *AKT3*, *PIK3R2* and *PIK3C*, some of which are associated with phenotypic features of MCD[5,14,36,37].

As a whole and to the best of our knowledge, we have for the first time shown that mutations in *NEDD4L* altering the HECT domain are associated with PNH and that excess NEDD4L is likely to be deleterious for brain development and functioning. This latter finding therefore provides a basis for a better understanding of phenotypes associated with duplications encompassing *NEDD4L*. In this study, we also reported evidence highlighting the disruptive consequences of *NEDD4L* mutations on the AKT–mTOR and TGF-β–Smad2/3 signaling pathways. Moreover, our study identified a potential novel disease-causing molecular mechanism, in which missense mutations might lead to a constitutively active state and loss of the mutant protein, but with functional consequences that are different from constitutive haploinsufficiency.

URLs. Exome Aggregation Consortium (ExAC), http://exac.broadinstitute.org/; MutationTester, http://www.mutationtaster.org/; DECIPHER, https://decipher.sanger.ac.uk/; Epi4K Consortium, http://www.epgp.org/; Deciphering Developmental Disorders Study, http://www.ddduk.org/; SubRVIS, http://www.subrvis.org/; Phyre web portal, http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/.

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper.

Accession codes. Human *NEDD4L* (NM_001144967), mouse *Nedd4l* (NM_001114386). ClinVar accessions: SCV000267106–SCV000267109.

Note: Any Supplementary Information and Source Data files are available in the online version of the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the patients and their families for their participation. We thank D. Rotin and C. Jiang (The Hospital for Sick Children) for kindly providing humanV5-tagged Nedd4-2 constructs (pcDNA3.1-nV5 wild type, CS and Y971A constructs) and L. Lindner, M. Ruff, M. Macias and F. Francis for their thoughtful comments and help. We thank investigators from the Epi4K Consortium and the Epilepsy Phenome/Genome Project for contributing *NEDD4L*-related genotype and phenotype data. This work was supported by funding from Strasbourg University and grant ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State Fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame program Investissements d'Avenir ANR-10-IDEX-0002-02, the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM funding within the framework of the program Equipe FRM; J.C–DEQ20130326477), the Fondation Maladies Rares, the Fondation NRJ–Institut de France, Agence National de Recherche (ANR Blanc 1103 01, project R11039KK; ANR E-Rare-012-01, project E10107KP; ANR-13-BSV-0009-01) and European Union FP7 project GENECODYS (grant 241995) and DESIRE (grant agreement 602531), and funding provided from the National Institute of Neurological Disorders and Stroke to the Epi4k Consortium and the Epilepsy Phenome/Genome Project (NS053998, NS077364, NS077274, NS077303 and NS077276). This study was also supported in part by the NIHR Biomedical Research Centre Oxford with funding from the UK Department of Health's NIHR Biomedical Research Centre funding scheme. The views expressed in this publication are those of the authors and not necessarily those of the UK Department of Health.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

L.B., H.J., E.L.I. and M.-V.H. conceived and designed the experiments, performed the experiments, performed statistical analysis and analyzed the data related to cellular, IUEP and functional studies. S.S. provided technical assistance and performed ubiquitination experiments. N.D. provided technical assistance, performed expression and genetic studies, and prepared reagents. J.C.-S., K.A.M., B.I., U.W.L., A.P., N.B.W., R.G., D.K., C.B., the DDD study, U.K. and N.B.-B. contributed clinical and imaging data and follow-up of patients and families. P.T. and G.M. provided assistance for IUEP studies. A.T.P., J.C.T., K.P., Y.S., N.L., G.R., B.S., A.E. and R.T. contributed to genetic studies and analysis of variants in candidate genes and screened DNA from subjects. M.M. and J.G. performed expression studies during brain development. L.N. and J.G. contributed reagents and material, as well as critical suggestions for functional studies. T.S., the DDD study, A.B., R.O., C.M., P.N. and J.-F.D. contributed to the generation of whole-exome sequencing, bioinformatics tools and analysis of sequencing data. I.S. conceived and designed ubiquitination experiments. J.C. conceived, coordinated and supervised the study, designed experiments, analyzed data and wrote the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permissions information is available online at http://www.nature.com/reprints/index.html.

1. Caviness, V.S. Jr., Takahashi, T. & Nowakowski, R.S. Numbers, time and neocortical neuronogenesis: a general developmental and evolutionary model. *Trends Neurosci.* **18**, 379–383 (1995).
2. Rakic, P. & Caviness, V.S. Jr. Cortical development: view from neurological mutants two decades later. *Neuron* **14**, 1101–1104 (1995).
3. Barkovich, A.J., Guerrini, R., Kuzniecky, R.I., Jackson, G.D. & Dobyns, W.B. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. *Brain* **135**, 1348–1369 (2012).
4. Francis, F. *et al.* Human disorders of cortical development: from past to present. *Eur. J. Neurosci.* **23**, 877–893 (2006).
5. Guerrini, R. & Dobyns, W.B. Malformations of cortical development: clinical features and genetic causes. *Lancet Neurol.* **13**, 710–726 (2014).
6. Fox, J.W. *et al.* Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron* **21**, 1315–1325 (1998).
7. Parrini, E. *et al.* Periventricular heterotopia: phenotypic heterogeneity and correlation with filamin A mutations. *Brain* **129**, 1892–1906 (2006).
8. Ferland, R.J. *et al.* Disruption of neural progenitors along the ventricular and subventricular zones in periventricular heterotopia. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 497–516 (2009).
9. Carabalona, A. *et al.* A glial origin for periventricular nodular heterotopia caused by impaired expression of filamin-A. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 1004–1017 (2012).
10. Lian, G. *et al.* Filamin A regulates neural progenitor proliferation and cortical size through Wee1-dependent Cdk1 phosphorylation. *J. Neurosci.* **32**, 7672–7684 (2012).
11. Sheen, V.L. *et al.* Mutations in *ARFGEF2* implicate vesicle trafficking in neural progenitor proliferation and migration in the human cerebral cortex. *Nat. Genet.* **36**, 69–76 (2004).
12. Conti, V. *et al.* Periventricular heterotopia in 6q terminal deletion syndrome: role of the *C6orf70* gene. *Brain* **136**, 3378–3394 (2013).
13. Poirier, K. *et al.* Mutations in *TUBG1*, *DYNC1H1*, *KIF5C* and *KIF2A* cause malformations of cortical development and microcephaly. *Nat. Genet.* **45**, 639–647 (2013).

© 2016 Nature America, Inc. All rights reserved.

14. Mirzaa, G.M. *et al.* Characterisation of mutations of the phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit, *PIK3R2*, in perisylvian polymicrogyria: a next-generation sequencing study. *Lancet Neurol.* **14**, 1182–1195 (2015).
15. Kumar, S., Tomooka, Y. & Noda, M. Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**, 1155–1161 (1992).
16. Sudol, M., Chen, H.I., Bougeret, C., Einbond, A. & Bork, P. Characterization of a novel protein-binding module—the WW domain. *FEBS Lett.* **369**, 67–71 (1995).
17. Rizo, J. & Südhof, T.C. C2-domains, structure and function of a universal Ca^{2+}-binding domain. *J. Biol. Chem.* **273**, 15879–15882 (1998).
18. Huang, L. *et al.* Structure of an E6AP–UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2–E3 enzyme cascade. *Science* **286**, 1321–1326 (1999).
19. Goel, P., Manning, J.A. & Kumar, S. NEDD4-2 (NEDD4L): the ubiquitin ligase for multiple membrane proteins. *Gene* **557**, 1–10 (2015).
20. Garrone, N.F., Blazer-Yost, B.L., Weiss, R.B., Lalouel, J.M. & Rohrwasser, A. A human polymorphism affects NEDD4L subcellular targeting by leading to two isoforms that contain or lack a C2 domain. *BMC Cell Biol.* **10**, 26 (2009).
21. Hsia, H.E. *et al.* Ubiquitin E3 ligase Nedd4-1 acts as a downstream target of PI3K/PTEN–mTORC1 signaling to promote neurite growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 13205–13210 (2014).
22. Franco, S.J., Martinez-Garay, I., Gil-Sanz, C., Harkins-Perry, S.R. & Müller, U. Reelin regulates cadherin function via Dab1/Rap1 to control neuronal migration and lamination in the neocortex. *Neuron* **69**, 482–497 (2011).
23. Olson, E.C., Kim, S. & Walsh, C.A. Impaired neuronal positioning and dendritogenesis in the neocortex after cell-autonomous Dab1 suppression. *J. Neurosci.* **26**, 1767–1775 (2006).
24. Sekine, K., Honda, T., Kawauchi, T., Kubo, K. & Nakajima, K. The outermost region of the developing cortical plate is crucial for both the switch of the radial migration mode and the Dab1-dependent "inside-out" lamination in the neocortex. *J. Neurosci.* **31**, 9426–9439 (2011).
25. Sekine, K. *et al.* Reelin controls neuronal positioning by promoting cell-matrix adhesion via inside-out activation of integrin α5β1. *Neuron* **76**, 353–369 (2012).
26. Lifton, R.P., Gharavi, A.G. & Geller, D.S. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* **104**, 545–556 (2001).
27. Boase, N.A. & Kumar, S. NEDD4: the founding member of a family of ubiquitin–protein ligases. *Gene* **557**, 113–122 (2015).
28. Moon, U.Y. *et al.* Impaired reelin-Dab1 signaling contributes to neuronal migration deficits of tuberous sclerosis complex. *Cell Rep.* **12**, 965–978 (2015).
29. Gao, S. *et al.* Ubiquitin ligase Nedd4L targets activated Smad2/3 to limit TGF-β signaling. *Mol. Cell* **36**, 457–468 (2009).
30. Yu, J.S. *et al.* PI3K/mTORC2 regulates TGF-β/activin signalling by modulating Smad2/3 activity via linker phosphorylation. *Nat. Commun.* **6**, 7212 (2015).
31. Wiesner, S. *et al.* Autoinhibition of the HECT-type ubiquitin ligase Smurf2 through its C2 domain. *Cell* **130**, 651–662 (2007).
32. Bruce, M.C. *et al.* Regulation of Nedd4-2 self-ubiquitination and stability by a PY motif located within its HECT-domain. *Biochem. J.* **415**, 155–163 (2008).
33. Wang, J. *et al.* Calcium activates Nedd4 E3 ubiquitin ligases by releasing the C2 domain–mediated auto-inhibition. *J. Biol. Chem.* **285**, 12279–12288 (2010).
34. Escobedo, A. *et al.* Structural basis of the activation and degradation mechanisms of the E3 ubiquitin ligase Nedd4L. *Structure* **22**, 1446–1457 (2014).
35. Honda, T. & Nakajima, K. Proper level of cytosolic disabled-1, which is regulated by dual nuclear translocation pathways, is important for cortical neuronal migration. *Cereb. Cortex* **26**, 3219–3236 (2016).
36. Rivière, J.B. *et al.* *De novo* germline and postzygotic mutations in *AKT3*, *PIK3R2* and *PIK3CA* cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat. Genet.* **44**, 934–940 (2012).
37. Jansen, L.A. *et al.* PI3K/AKT pathway mutations cause a spectrum of brain malformations from megalencephaly to focal cortical dysplasia. *Brain* **138**, 1613–1628 (2015).

© 2016 Nature America, Inc. All rights reserved.

ONLINE METHODS

Subjects, whole-exome sequencing and variant validation. Blood or DNA samples from affected individuals and their parents and informed consent were obtained from all participants in accordance with site-specific institutional review boards. Written consent was obtained to publish patient photographs. For the selected 15 patients with PNH in association with developmental delay and/or epilepsy, 3 of the 15 patients also had PMG. For all patients, mutations in known PNH-related genes (*FLNA*, *ARFGEF2* and *C6orf70*) and pathogenic copy number variations (CNVs) had previously been excluded. DNA processing, library generation, exome enrichment and whole-exome sequencing in trios comprising affected subjects and their parents were performed and data were analyzed at the French National Centre for Genotyping (CNG, Evry, France), the Paris Descartes Bioinformatics platform and the Sanger Sequencing Centre as previously described[13,14,38]. Available genomic databases (dbSNP, 1000 Genomes Project, Exome Variant Server, Exome Aggregation Consortium and a local Paris Descartes Bioinformatics platform database) were used to filter exome variants and exclude variants with a frequency greater than 1%. *De novo* variants were analyzed by PCR and direct Sanger sequencing using DNA from patients and their parents. In the family with two affected siblings and suspected maternal somatic mosaicism, confirmation and estimation of the percentage of cells bearing the variant was performed by the droplet digital PCR approach (QX100 Droplet Digital PCR System, Bio-Rad Life Science Research) using DNA extracted from the peripheral blood of all members of the family (the two patients, the parents and the unaffected individual) and primers specific to the variant and wild-type sequences. Data were analyzed with QuantaSoft v.1.4 software (Bio-Rad Life Science Research).

Protein modeling. Amino acid substitutions were plotted onto the solved protein structure for the catalytic domain of the human NEDD4-like E3 ligase using the Phyre web portal. Models were built by homology modeling using Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (PDB) code 2ONI. The images in **Supplementary Figure 2** were rendered using Chimera.

Cloning and plasmid constructs. Human untagged *NEDD4L* cDNA (NM_001144967.1) cloned into pCMV6-Entry vector (SC326303) was purchased from Origene. Mutations were introduced by site-directed mutagenesis using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies). Wild-type and mutated cDNAs encoding human NEDD4L were then inserted into the multiple-cloning site of psiSTRIKE vector under the control of the CAG promoter, pCDNA3-nV5. For IUEP experiments, psiSTRIKE-*NEDD4L* vectors were electroporated in combination with a pCAGGS-IRES-Tomato vector to visualize electroporated cells.

For RNA interference (RNAi) experiments, a 29-mer sequence targeting mouse *Nedd4l* mRNA and a HuSH 29-mer non-effective shRNA scrambled cassette, both commercially designed and provided by Origene in the p-GFP-V-RS vector (TG505433), were inserted into psiSTRIKE vector under the control of the U6 promoter. The *Nedd4l* shRNA directed against the coding sequence was checked for specificity in sequence databases. Because of the very low level of expression of NEDD4L, efficiency experiments were conducted using cotransfection with wild-type human *NEDD4L* cDNA and shRNA constructs in N2A cells and immunoblot analysis.

***In situ* hybridization.** Mouse *Nedd4l* sense and antisense probes (nucleotides 462 to 1,470 of transcript NM_001114386) were synthesized using T7 RNA polymerase (Roche) from pJET2.1-*Nedd4l* (nucleotides 462 to 1,470) and pJET2.1-*Nedd4l* (nucleotides 1,470 to 462) plasmids. Non-radioactive RNA *in situ* hybridization on frozen brain sections was performed as previously described[39].

qRT–PCR. Total RNA was prepared from the brains of mouse embryos at different time points of development and from cultured transfected cells with TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific), and cDNA samples were synthetized with SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). qRT–PCR was performed in a LightCycler PCR instrument (Roche) using SYBR Green Master Mix (Roche). For transfection-based experiments, we used GFP as a normalizer (that is, systematically cotransfected as a reporter). For qRT–PCR of transcripts expressed from transfected cDNA constructs, RNA samples were treated with Turbo DNase (Ambion, Life Technology) to avoid amplification from plasmid DNA. Also, to ensure that we amplified transcripts expressed from transfected constructs, for each sample real-time qPCR (in triplicate) was performed using the cDNA reaction products obtained with or without reverse transcriptase and primers specific to *NEDD4L* and *GFP*.

Cell culture, transfections and immunofluorescence. Mouse neuroblastoma N2A cells were cultured in DMEM (Gibco) supplemented with 5% FCS and transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). MG132 (Calbiochem) was dissolved in DMSO solution buffer. DMSO was used as a control vehicle. Cells were treated with MG132 at a 10 μM concentration for 15 h before the end of culture. Expression of transfected genes was analyzed 48 h after transfection by immunocytochemistry and immunoblotting.

For primary cultures of neuronal cells, embryonic mouse cortical neurons (E17) were electroporated using the Amaxa mouse Nucleofector kit (Lonza) and maintained in Neurobasal medium supplemented with 2% B27, 1% glutamine and 1% penicillin-streptomycin. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde 96 h after electroporation. Immunocytochemistry was performed according to standard procedures using antibody to Nedd4l (13690-1-AP, rabbit, Proteintech; 1:200 dilution) as the primary antibody and donkey anti-rabbit IgG 647 (A-21208, Life Technologies; 1:800 dilution) as the secondary antibody. Results were observed and photographed using a TCS SP5 confocal microscope (Leica Microsystems).

Immunoblotting. Cells were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.7, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA and 1% Triton X-100) supplemented with protease inhibitors (Roche) and phosphatases inhibitors (Sigma-Aldrich). Protein concentration was measured using Bio-Rad protein assay reagent. Samples were denatured at 95 °C for 10 min in loading buffer and then resolved by SDS–PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked in 5% nonfat milk in TBS buffer with 0.1% Tween and then immunoblotted using the following primary antibodies at the specified concentrations: Nedd4l (13690-1-AP, rabbit, Proteintech; 1:1,000 dilution), actin (mouse, IGBMC; 1:1,000 dilution), Akt-pSer473 (4060, rabbit, Cell Signaling Technology; 1:1,000 dilution), Akt-pThr308 (2965, rabbit, Cell Signaling Technology; 1:1,000 dilution), Akt (pan) (4691, rabbit, Cell Signaling Technology; 1:1,000 dilution), S6-pSer236/236 (2211, rabbit, Cell Signaling Technology; 1:1,000 dilution), S6 (2217, rabbit, Cell Signaling Technology; 1:1,000 dilution), ubiquitin (sc-8017, mouse, Santa Cruz Biotechnology; 1:250 dilution) and V5 (R96025, mouse, Invitrogen; 1:5,000 dilution). All immunoblot experiments consisted of at least three independent replicates.

Immunohistochemistry. Mouse embryo brains were fixed by incubation overnight at 4 °C in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Brains were placed in a solution of 4% low-melting agarose (Bio-Rad) and cut into coronal sections (80 μm) using a vibrating-blade microtome (Leica VT1000S, Leica Microsystems). Sections were maintained in 0.01% azide in PBS buffer. For immunodetection, sections were blocked with 1× PBS with 2% normal donkey serum (Dominique Dutscher) and 0.3% Triton X-100 (PBS-T-NGS) for 30 min at room temperature. Primary antibodies were diluted in PBS-T-NGS and incubated with sections overnight at 4 °C. The following primary antibodies were used: Dab1 (AB5840, rabbit, Millipore; 1:500 dilution), Cux1 (sc-13024, rabbit, Santa Cruz Biotechnology; 1:100 dilution), Ki67 (IHC-00375, rabbit, Bethyl Laboratories; 1:250 dilution), NEDD4L (13690-1-AP, rabbit, Proteintech; 1:300 dilution), NeuN (MAB377, mouse, Millipore; 1:100 dilution), Pax6 (PRB-278P, rabbit, Covance; 1:200 dilution), PH3 (06-570, rabbit, Millipore; 1:500 dilution) and TBR2 (14-4875, rat, eBioscience; 1:200 dilution). After washes in 1× PBS, sections were incubated with Alexa Fluor–conjugated secondary antibodies (A-31573, donkey anti-rabbit IgG 647; A-21208, donkey anti-rat IgG 488; A-21206, donkey anti-rabbit IgG 488; A-31571, donkey anti-mouse IgG 647; all from Life Technologies) diluted 1:500 in PBS-T for 1.5 h at room temperature. Sections were washed and then mounted with Fluoromount-G mounting medium (Interchim). All images were acquired using a TCS SP8 confocal microscope (Leica Microsystems), and positioning analysis was achieved with ImageJ software (NIH) and proliferation analysis was performed with LAS AF software (Leica Microsystems). Graphs

© 2016 Nature America, Inc. All rights reserved.

were generated in GraphPad Prism 6 (GraphPad), and images were assembled with Adobe Photoshop 13.0.1 (Adobe Systems).

Ubiquitination assays. For immunoprecipitation assays, transfected cells were lysed with RIPA buffer supplemented with protease inhibitors (Roche), MG132 (25 μM) and PR-619 (20 mM) and protein extracts were incubated with anti-V5 agarose beads (A7345, Sigma) for 2 h at 4 °C under constant rotation in RIPA buffer. Immunoprecipitated proteins were eluted in Laemmli SDS buffer at 95 °C and subjected to SDS–PAGE. For *in vitro* ubiquitination assays, immunopurified NEDD4L from transfected N2A cells was incubated in reaction mixtures containing 200 nM E1 ubiquitin-activating enzyme (BostonBiochem), 400 nM E2 ubiquitin-conjugating enzyme (UbcH7; BostonBiochem), 400 μM ubiquitin (Sigma) and 2 mM ATP in reaction buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 0.1 μM DTT and 4 mM $MgCl_2$). Reactions were incubated for 1 h at 30 °C and analyzed by immunoblotting with antibodies to ubiquitin, V5 and NEDD4L.

***In utero* electroporation.** *In utero* electroporation was performed as described previously[13,40] using Swiss mice (Janvier). Animal experimentations were performed at the IGBMC animal facilities. The study has Animal Experimentation Research Ethics Committee approval (2014-059). Briefly, timed pregnant mice (E14.5) were anaesthetized with isoflurane (2 l per min of oxygen, 4% isoflurane during sleep and 2% isoflurane during surgery; Minerve). The uterine horns were exposed, and a lateral ventricle of each embryo was injected using pulled-glass capillaries with Fast Green (2 μg/ml; Sigma) combined with a final concentration of 1 μg/μl of DNA constructs prepared with the EndoFree plasmid purification kit (Macherey Nagel). The expression vector pCAGGS-Tomato was systematically co-electroporated, and fluorescent Tomato protein was used to visualize electroporated cells. Plasmids were further electroporated into the neuronal progenitors adjacent to the ventricle by delivering five electric pulses at 50 V for 50 ms at 950-ms intervals using a CUY21EDIT electroporator (Sonidel). After electroporation, embryos were placed back in the abdominal cavity and development was allowed to continue until E16, E18 or P2. Embryo or pup brains were dissected and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS overnight.

Rapamycin treatment. Rapamycin Ready-Made Solution (2.5 mg/ml in DMSO; Sigma) was previously diluted in PBS and then injected intraperitoneally at a concentration of 0.5 mg/kg daily from E15.5 to E17.5 into pregnant females electroporated at E14.5. Embryos were collected at E18.5 for analysis.

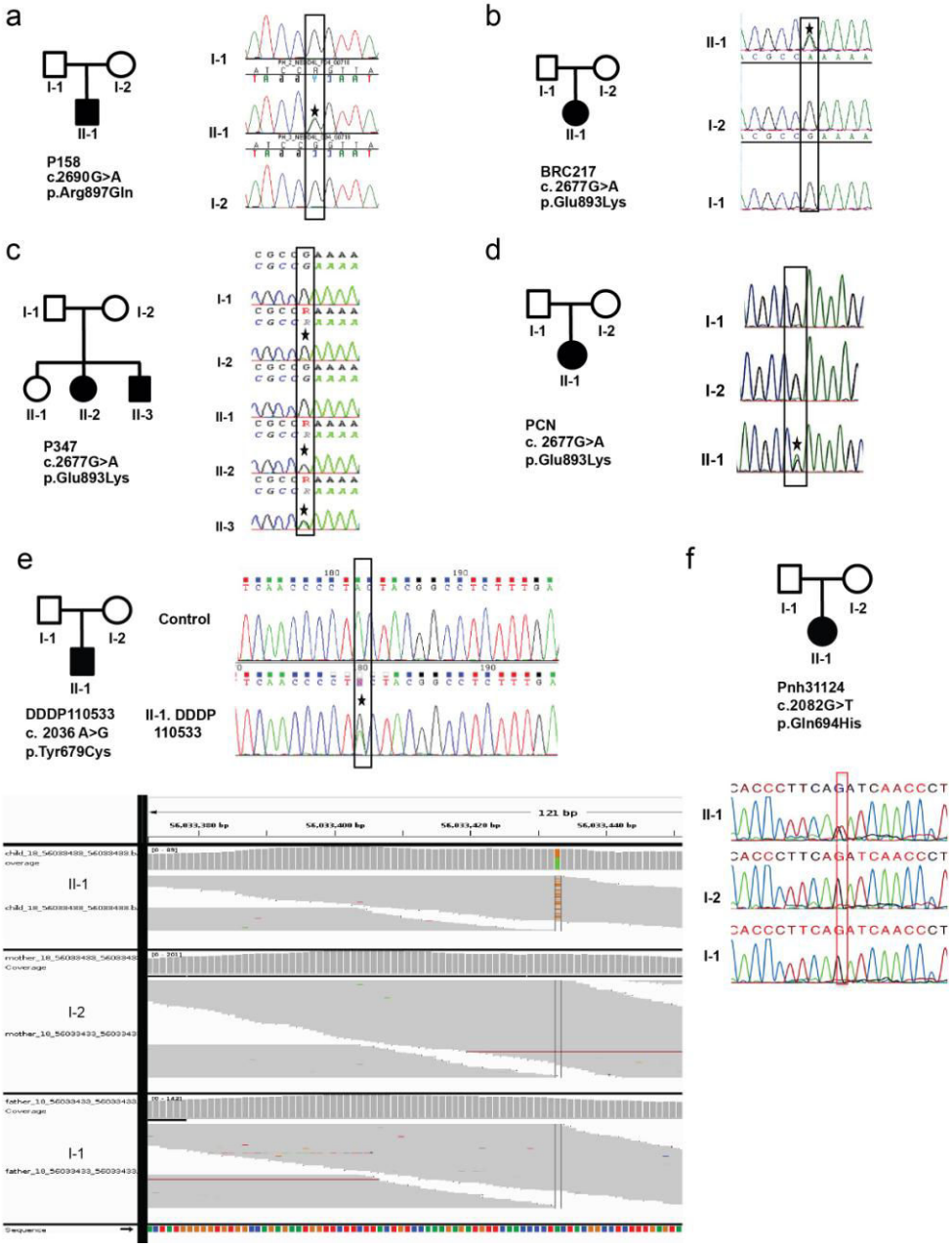
Statistics. All statistics were calculated with GraphPad Prism 6. Final counts are presented as the mean percentages ± s.e.m. One- or two-way ANOVA was performed for multiple comparisons followed by Dunnett's or Sidak's *post-hoc* tests, respectively, whereas unpaired two-tailed Student's *t* tests were used for dual comparisons. $P < 0.05$ was considered significant: $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$. On the basis of previous IUEP experiments performed in our laboratory, we considered that at least three embryos per condition would be necessary. After histological examination, only brains with comparable electroporated regions and efficiencies were retained for quantification. Data distribution was not tested but was assumed to be normal. Blinding was not applied for data collection and analysis. Statistical details are included in **Supplementary Table 2**.

Exome sequencing data deposition. Exome sequencing data have been deposited in the database of Genotypes and Phenotypes (dbGaP) under study accession phs000653.v1.p1 for the Pnh31124 trio (proband EPGP012746) and the European Genome-phenome Archive (EGA) under accession EGAD00001001848 for the DDDP110533 trios. For the other patients analyzed by the whole-exome sequencing approach, no consent was obtained from the patients to deposit the data in a repository.

38. Wright, C.F. *et al.* Genetic diagnosis of developmental disorders in the DDD study: a scalable analysis of genome-wide research data. *Lancet* **385**, 1305–1314 (2015).
39. Cau, E., Gradwohl, G., Fode, C. & Guillemot, F. Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors. *Development* **124**, 1611–1621 (1997).
40. Kielar, M. *et al.* Mutations in *Eml1* lead to ectopic progenitors and neuronal heterotopia in mouse and human. *Nat. Neurosci.* **17**, 923–933 (2014).

© 2016 Nature America, Inc. All rights reserved.

doi:10.1038/ng.3676

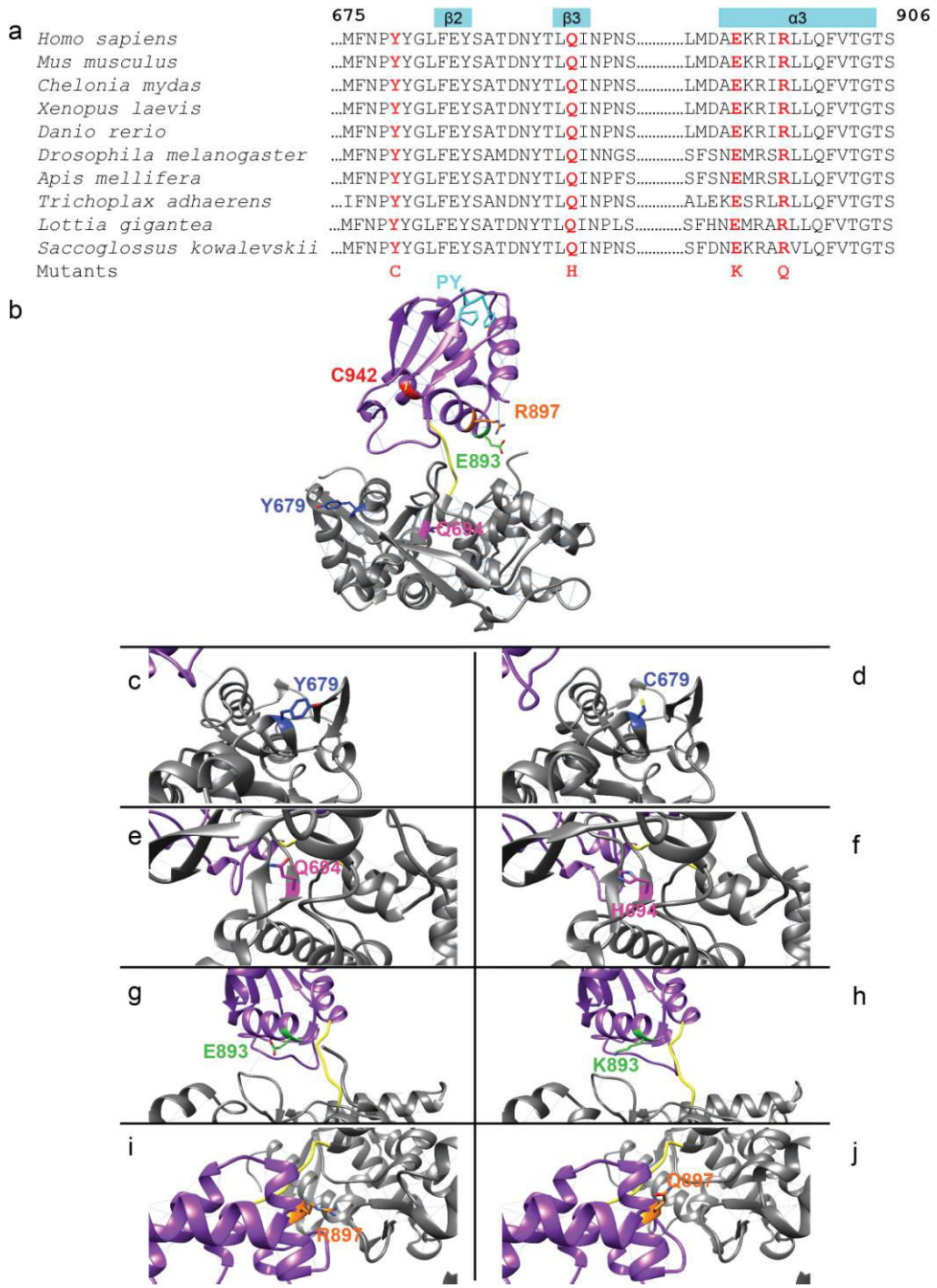


Supplementary Figure 1

Pedigrees and Sanger sequencing traces of *NEDD4L* mutations.

(**a**–**f**) Chromatograms for family members showing normal and mutated sequences of *NEDD4L*. For family P347, note the mother's chromatogram showing a small peak corresponding to the mutated allele and suggesting somatic mosaicism. For family DDDP110533, the Sanger sequence trace for the patient and the IGV screenshot confirm the mutation and show the high sequencing coverage (>70×) in the trio and the absence of the mutation in the sequencing reads of the parents. None of these validated variants was reported in the available genomic databases, and to strengthen their relevance we reviewed trio data sets corresponding to the 3,287 individuals with developmental disorders highlighted in the recent report of the Deciphering Developmental Disorders study (http://dx.doi.org/10.1101/049056). Except the *de novo* mutation located in the N-terminal part of the protein, p.Pro294Arg, in a patient with infantile spasm (IS) and without PNH (Allen, 2013 #91), no other *de novo* mutation affecting the HECT domain was reported. These data are in line with the fact that the *NEDD4L* HECT domain is the most intolerant to mutations across the gene as assessed by subRVIS (http://www.subrvis.org/).

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.3676



Supplementary Figure 2

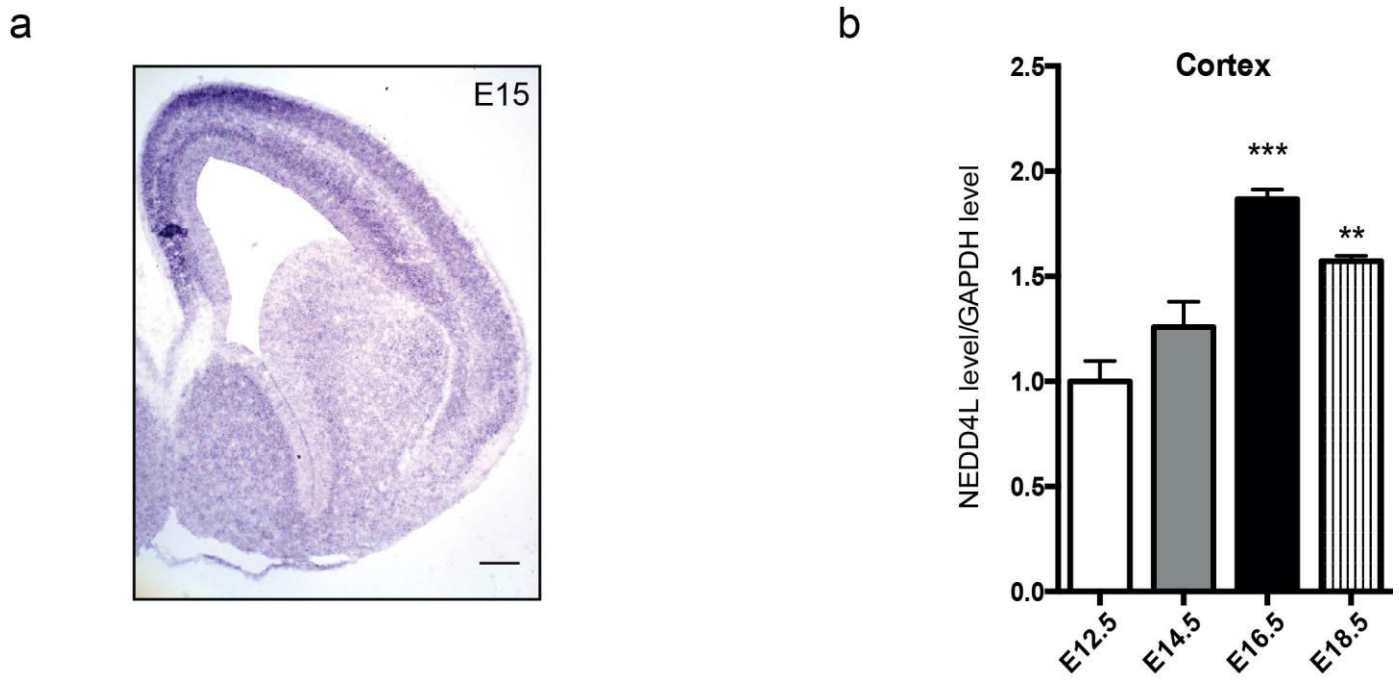
Illustration of the structure of the NEDD4L HECT domain and the position of PNH-associated alterations.

(**a**) Multiple-sequence alignment showing the high conservation of the HECT domain regions containing the Tyr679, Gln694, Glu893 and Arg897 residues. (**b**,**c**,**e**,**g**,**i**) Representation (visualized with Chimera) of the N-lobe and C-lobe of the HECT domain (PDB 2ONI) that are shown in gray and magenta, respectively, the flexible hinge in yellow, the cysteine residue of the catalytic site in red, the PY motif in mint and the position of the different changed residues. (**d**,**f**,**h**,**j**) Models of the HECT domain constructed with the Phyre web portal and based on PDB model 2ONI and the sequence of the HECT domain from the human NEDD4L protein Q96PU5 with altered residues Cys679, His694, Lys893 and Gln897. Inspection of the protein structure shows that the Glu893 and Arg897 residues are

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.3676

located on the surface of the α3 helix of the C-lobe that contains the active-site cysteine that forms the thioester with ubiquitin, the Tyr679 residue is located between the α2 helix and β2 sheet of the N-lobe, and the Gln694 residue is located within the β3 sheet of the N-lobe. Because of the physicochemical property changes (i.e., from acidic to basic for p.Glu893Lys or from basic to uncharged for p.Arg897Gln), NEDD4L function could be disrupted through the effects of the mutations on stability, interference with functional properties of the HECT domain or deregulation of interactions with substrates.

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.3676

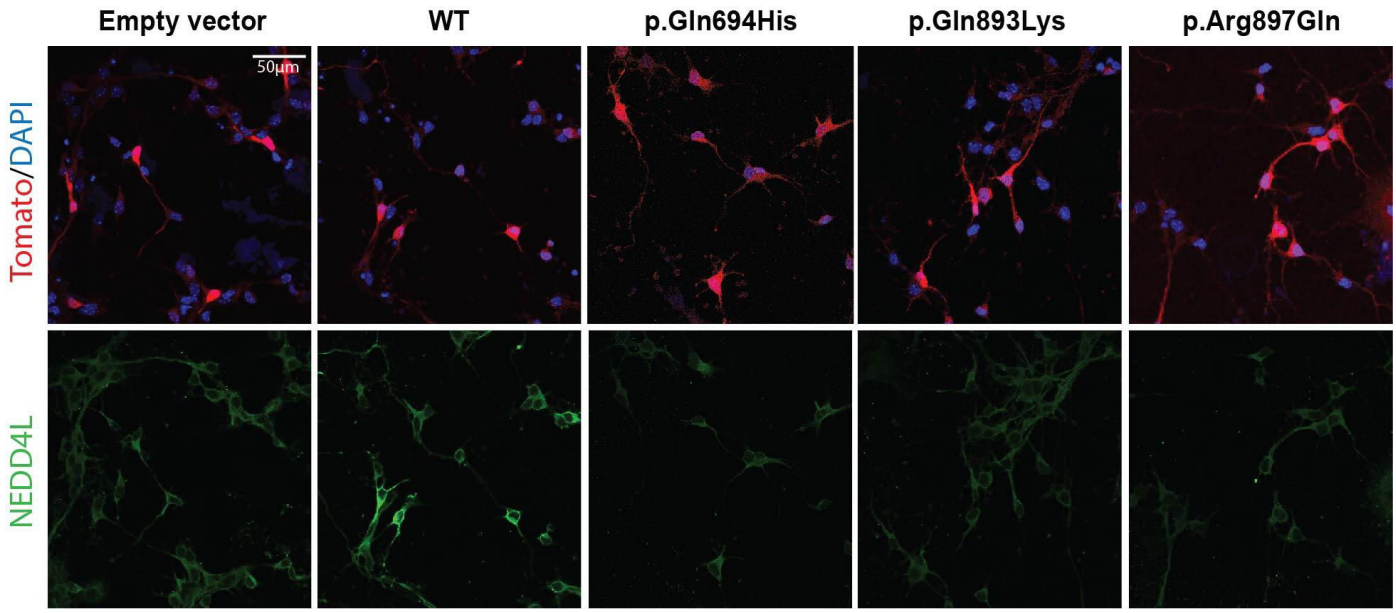


Supplementary Figure 3

NEDD4L expression in mouse developing cortex.

(**a**) *In situ* hybridization with *Nedd4l* probe of an E15 brain section showing cortical expression and distribution of *Nedd4l*. (**b**) qRT–PCR analyses showing cortical expression of *Nedd4L* transcripts at E12.5, E14.5, E16.5 and E18.5. Scale bar, 200 μm.

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.3676

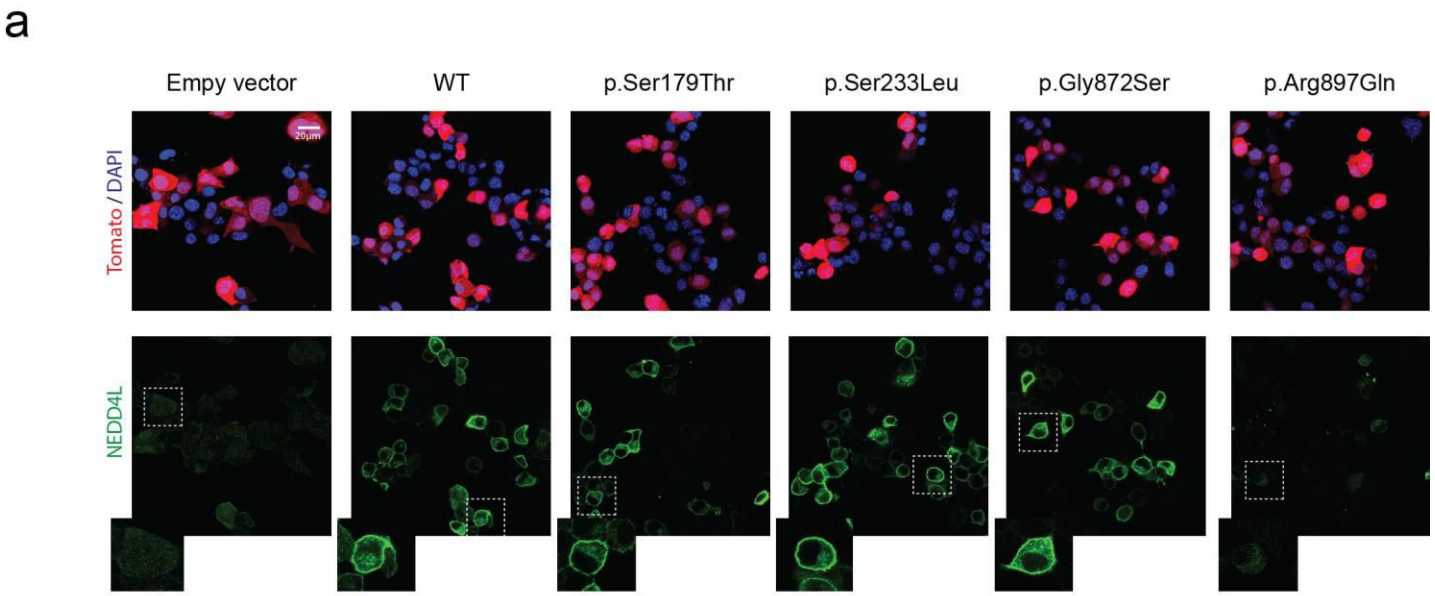


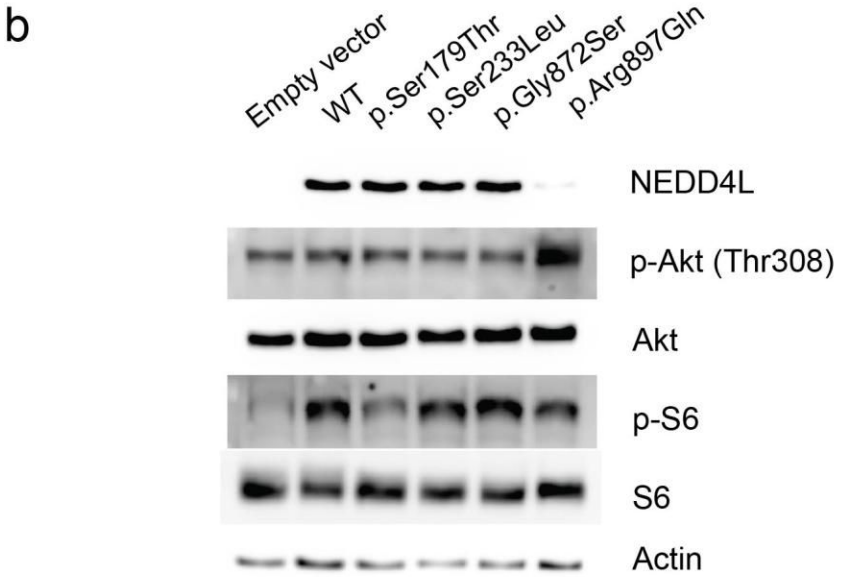
Supplementary Figure 4

Expression and cellular localization of wild-type and NEDD4L mutants in cultured neuronal cells.

Wild-type and mutant NEDD4L cDNA constructs were transfected into primary cultures of neuronal cells, and NEDD4L expression was analyzed by immunofluorescence labeling. Immunostaining (green) shows a cytoplasmic distribution, with enrichment in the periphery of neuronal cells transfected with the wild-type NEDD4L construct, whereas the p.Gln694His, p.Glu893Lys and p.Arg897Gln mutants are not detectable.

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.3676



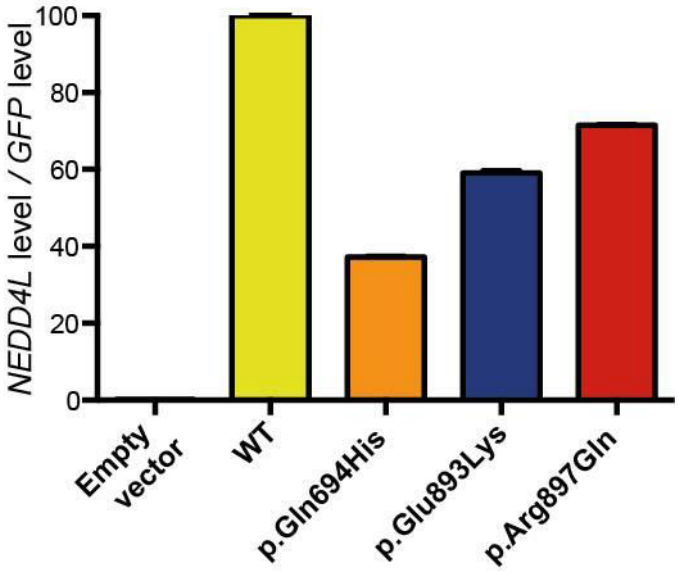


Supplementary Figure 5

Expression of wild-type and NEDD4L control variants and analysis of their consequences on mTORC1 and AKT activities.

(**a**) Tomato/DAPI and NEDD4L detection in N2A cells transfected with empty vector, wild-type and NEDD4L control variant cDNA constructs. NEDD4L immunostaining (green) shows similar cytoplasmic distribution, with enrichment in the cellular of N2A cells, of wild-type and NEDD4L control variants. (**b**) Immunoblot analyses showing similar expression levels and phosphorylation patterns of S6 and AKT resulting from transfection of N2A cells with wild-type NEDD4L and the three control variants reported in the ExAC database (c.698C>T, S233L; c.535T>A, S179T and c.2614G>A, G872S (located in the HECT domain)).

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.3676

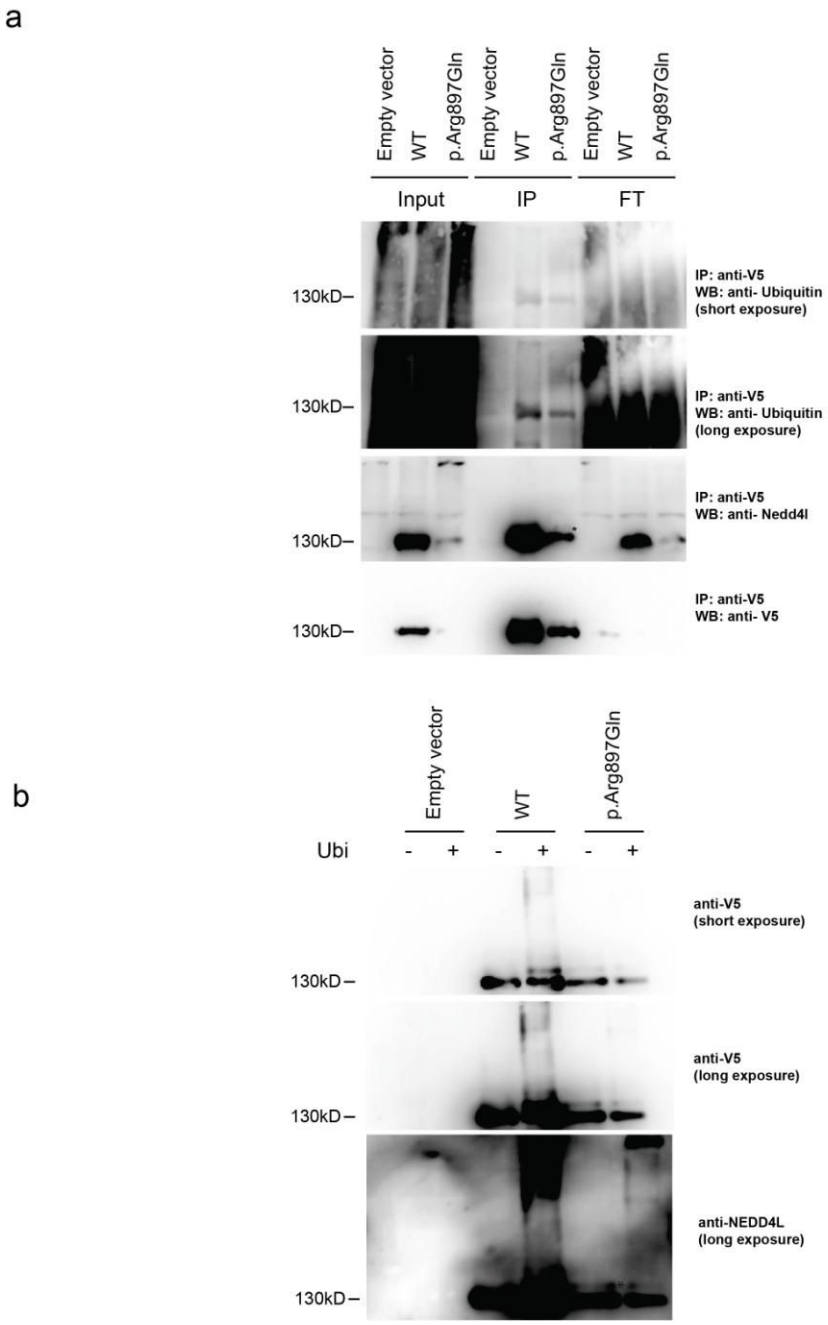


Supplementary Figure 6

qRT–PCR analysis of *NEDD4L* transcripts in N2A cells transfected with wild-type and mutant *NEDD4L* cDNA constructs.

Real-time qPCRs were performed from transfected N2A cells using the SYBR Green method on total, DNase-treated RNA samples, using *NEDD4L*-specific primers. GFP was used for normalization.

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.3676

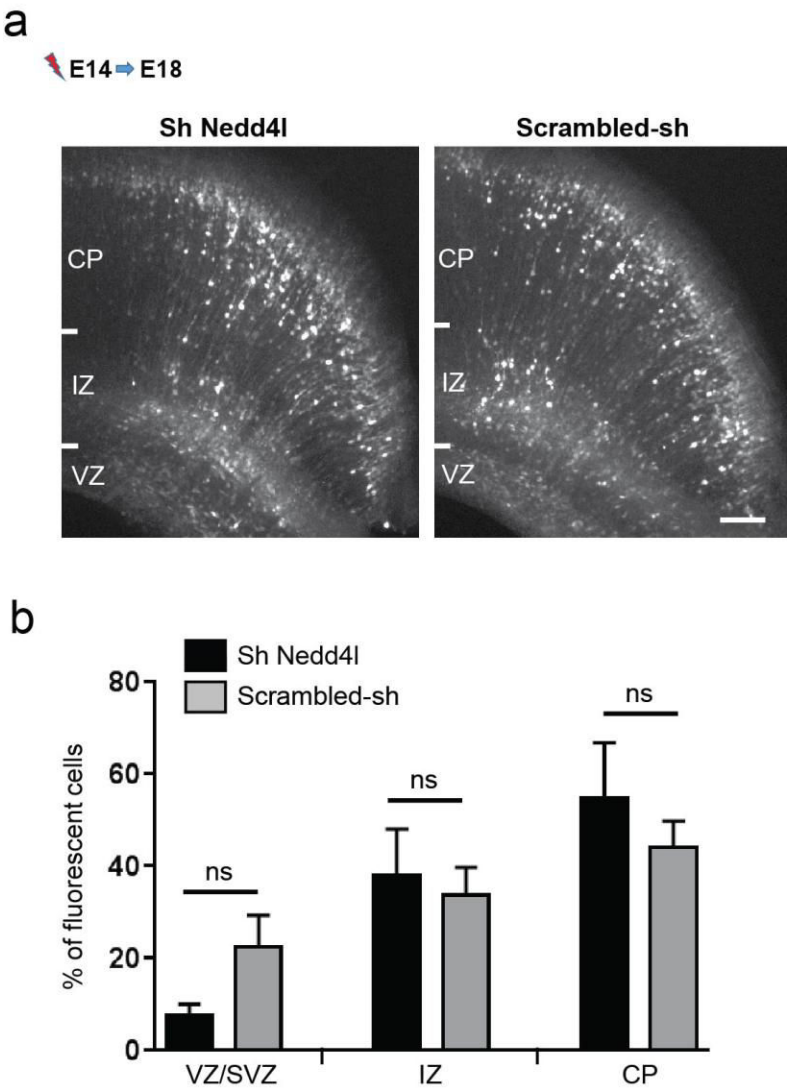


Supplementary Figure 7

Analysis of NEDD4L mutant (p.Arg897Gln) ubiquitination activity.

(**a**) Immunoprecipitation against V5-tagged Nedd4l and analysis by immunoblotting using antibodies to ubiquitin, V5 and NEDD4L. We can observe in the immunoprecipitate (IP) a band corresponding to NEDD4L and a smear of the ubiquitinated protein. (**b**) Wild-type and mutant NEDD4L were immunopurified from transfected N2A cell lysates and incubated with ATP, E1 enzyme and E2 (UbcH7) enzyme with (+) or without (–) ubiquitin. Reaction mixtures were analyzed by immunoblotting using antibodies to V5 and NEDD4L. Note that, despite the unbalanced amounts of wild-type and NEDD4L mutant resulting from the instability of mutant NEDD4L, in the presence of ubiquitin both wild-type and mutant NEDD4L exhibit enhanced ubiquitination activity, as illustrated by the high-molecular-mass smear representing self-ubiquitinated NEDD4L.

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.3676

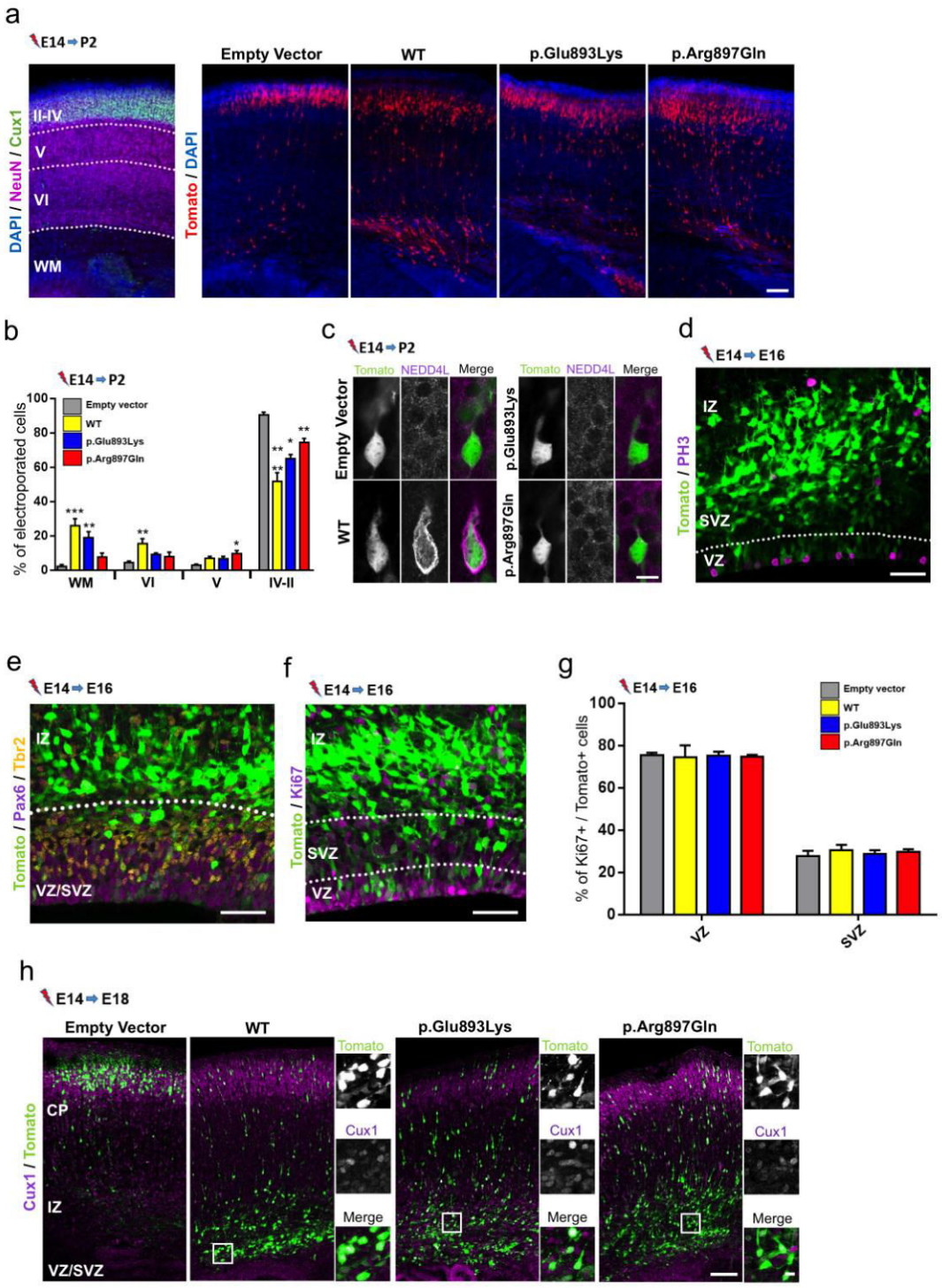


Supplementary Figure 8

***In utero* knockdown of mouse *Nedd4l* expression by RNAi and analysis of neuronal positioning in the isocortex.**

(**a**) The images show coronal sections of mouse brains 4 d after electroporation at E14.5 with the Tomato-encoding reporter construct either in combination with the shRNA targeting *Nedd4l* mRNA or the corresponding scrambled controls (scrambled-sh). Scale bar, 100 μm. (**b**) Fluorescent neuron positioning was quantified in three regions: VZ/SVZ, IZ and CP. Bars represent the means of fluorescent neurons ± s.e.m. of independent brains (Nedd4l-sh, n = 4; scrambled-sh, n = 5). Note the absence of significant differences between the distribution in the three regions of neuronal cells electroporated with shRNA and the control scrambled-sh.

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.3676



Supplementary Figure 9

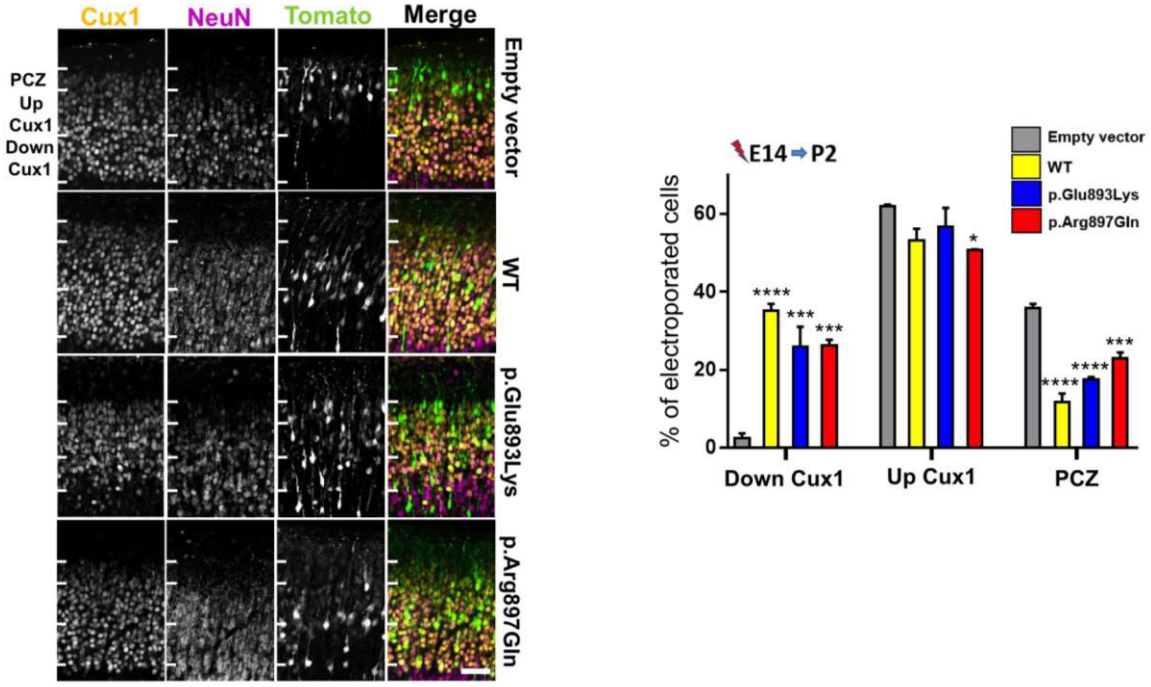
Effect of wild-type and NEDD4L mutants on neuronal positioning, proliferation and differentiation.

(**a**) The images show coronal sections of mouse brains at P2 and electroporated at E14.5 with either empty vector, wild-type NEDD4L or mutant NEDD4L cDNA constructs in combination with an RFP-encoding vector (Tomato). Sections were stained for a neuronal marker, NeuN (magenta), and an upper-layer maker, Cux1 (green), and were counterstained with DAPI (blue) to determine neuronal

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.3676

positioning in the white matter (WM), layers VI, V and II–IV. Scale bar, 100 μm. (**b**) Fluorescent neurons were quantified in the P2 brain regions highlighted in **a**: WM: empty vector (EV) versus WT, $P = 0.0004$, EV versus p.Glu893Lys, $P = 0.0078$; VI: EV versus WT, $P = 0.0091$; V: EV versus p.Arg897Gln, $P = 0.0185$; II–IV: EV versus WT, $P < 0.0001$, EV versus p.Glu893Lys, $P = 0.0024$, EV versus p.Arg897Gln, $P = 0.0448$). Bars represent the means of fluorescent neurons ± s.e.m (EV, $n = 4$; WT, $n = 3$; p.Glu893Lys, $n = 4$; p.Arg897Gln, $n = 3$) in the white matter, layers VI, V and IV–II, which were determined by examination of DAPI-stained coronal sections immunostained with NeuN and Cux1 markers shown in **a**. (**c**) Immunofluorescence staining of NEDD4L (magenta) in electroporated cells (green) in the IZ of P2 brains electroporated at E14.5 with each construct. Scale bar, 10 μm. (**d**) Representative image of brain slices at E16.5 immunostained for the mitotic marker PH3 (magenta) used for mitotic index quantification in the VZ. (**e**,**f**) Representative images of brain slices at E16.5 immunostained for a radial glial cell marker, Pax6 (magenta), an intermediate progenitor marker, Tbr2 (yellow), and a proliferating progenitor marker (Ki67; magenta) used for quantification of Pax6/Tbr2 pools in the VZ/SVZ (see Results section) and proliferating progenitors. Doted lines indicate the VZ and SVZ. (**g**) Quantification of proliferative cells in the VZ and SVZ. Bars represent the means of double-positive $Ki67^{+}Tomato^{+}$ ± s.e.m of analyzed independent brains in the VZ and SVZ (empty vector, $n = 3$; WT, $n = 3$; p.Arg897Gln, $n = 3$; p.Glu893Lys, $n = 3$). Scale bars in **f**, 50 μm. (**h**) Cortical slices at E18.5 stained with an antibody against Cux1 (magenta) showed that misplaced neurons electroporated (green) with wild-type and PNH-related mutations in deep layers of the cortex ectopically expressed the upper-layer marker. Right panels are enlargements of the regions highlighted by white boxes in the IZ. Scale bar, 100 μm (left) and 10 μm (right).

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.3676

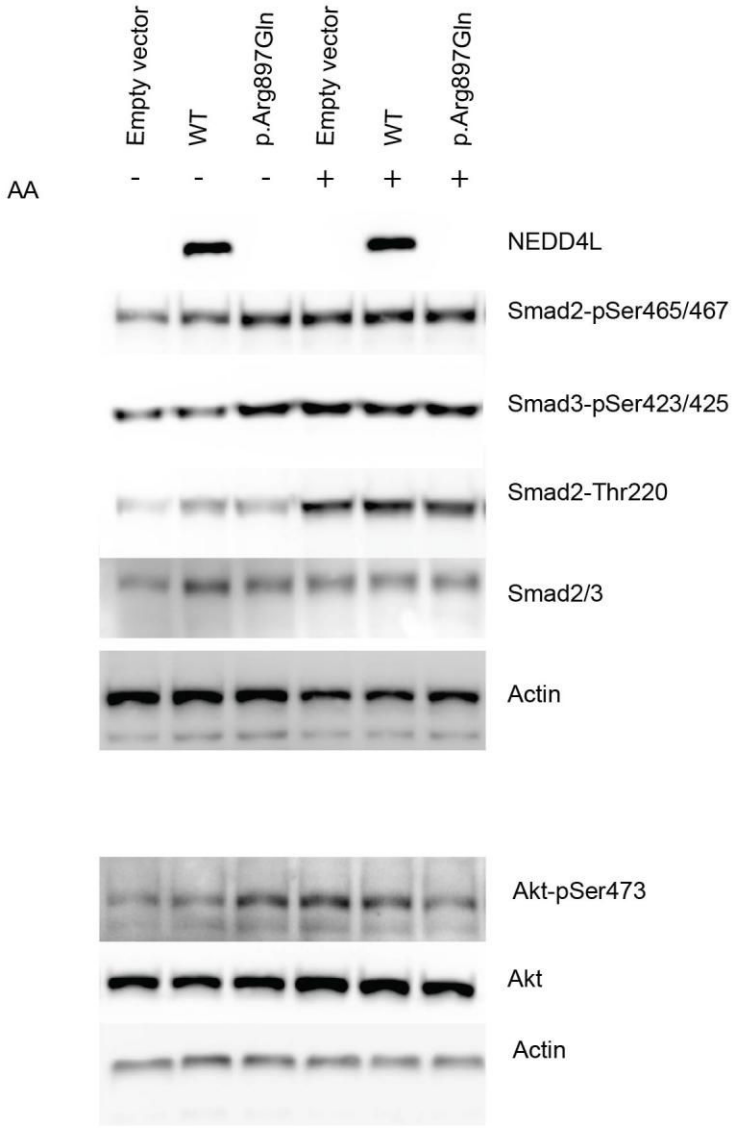


Supplementary Figure 10

Effect of wild-type and NEDD4L mutants on neuronal terminal translocation.

(**a**) Representative images of brain sections showing electroporated neurons with Tomato reporter and NEDD4L constructs at E14.5 analyzed at P2 for the Cux1 (yellow) and NeuN (magenta) markers. (**b**) Quantification of electroporated neurons in the upper layers of corticies reflecting analysis of the terminal translocation process. Expression of wild-type and NEDD4L mutants leads to enrichment in the down Cux1 region (empty vector versus WT, $P < 0.0001$, empty vector versus p.Glu893Lys, $P = 0.0004$, empty vector versus p.Arg897Gln, $P = 0.0003$), while PCZ is significantly depleted (empty vector versus WT, $P < 0.0001$, empty vector versus p.Glu893Lys, $P < 0.0001$, empty vector versus p.Arg897Gln, $P = 0.0005$), Scale bar, 50 μm. Bars represent the means of electroporated neurons ± s.e.m. of analyzed independent brains (empty vector, $n = 3$; WT, $n = 3$; p.Glu893Lys, $n = 3$; p.Arg897Gln, $n = 3$).

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.3676

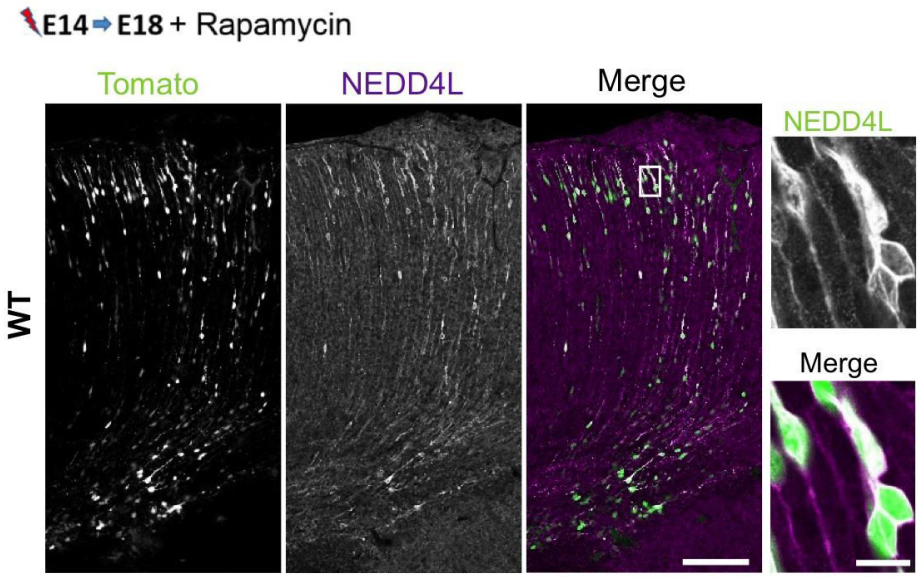


Supplementary Figure 11

Deregulation of AKT and Smad2/3 activation resulting from PNH-related NEDD4L mutant.

Representative immunoblots showing the effect of expression of wild-type and mutant NEDD4L constructs on Akt and Smad2/3 phosphorylation under basal condition and upon treatment of cells for 1 h with activin A (AA), an activator of the TGF-β pathway.

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.3676



Supplementary Figure 12

NEDD4L expression after rapamycin treatment.

Immunofluorescence staining of NEDD4L (magenta) in Tomato-electroporated cells (green) of E18.5 brains electroporated with wild-type NEDD4L cDNA construct at E14.5 and treated daily with rapamycin. Right panels are enlargements of the regions highlighted by white boxes. Scale bars, 100 μm (left) and 10 μm (right). Note that wild-type NEDD4L is still highly expressed in the electroporated cells of rapamycin-treated brains.

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.3676

Supplementary Table 1: Droplets digital PCR results for members of the family P347 (mutation: c. 2677G>A; p.Glu893Lys)

Mutant allele is present in 2240 out of 12644 positive droplets (16.7%) in the mother well; absent in the father and the non affected II-1 sister, present in 7000 out of 12406 positive droplet (50.8%) in patient II-2 well, and present in 6350 out of 11291 positive droplet (51%) in patient II-3 well. Calculations were possible while we obtained more than 10,000 droplets per well (good quality score). Absolute quantification results were normalized according to the Poisson distribution (Poisson modeling = (-LN(accepted droplets-positive droplets-double positive droplets)/accepted droplets) x accepted droplets). The overall results confirm that affected individuals are heterozygous for the variation (ratio about 50%); and indicate that the mother carries a somatic mosaicism with mutant allele frequency of about 16%.

	Father (I-1)	Mother (I-2)	Healthy sister (II-1)	Patient (II-2)	Patient (II-3)	Blank	Control
Accepted droplets (Nb)	12934	12644	12309	12406	11291	10688	6243
Positive droplets for target "mutant allele"	0	765	0	2414	2176	0	0
Positive droplets for reference "WT allele"	4625	4367	5367	2314	2084	0	615
Double positive droplets (Fam+ Hex+)	0	386	0	780	498	0	0
Double negative droplets (Fam- Hex-)	8309	7126	6942	6898	6533	10688	3188
Number of "mutant allele" molecules per well (poisson corrected)	0	2240	0	7000	6360	0	0
Number of "WT allele" molecules per well (poisson corrected)	10420	11100	13480	6760	6100	0	2440
Mutant Allele Fcy (Mut/WT+Mut)	0	16.7	0	50.8	51	0	0

Nature Genetics: doi:10.1038/ng.3676

Supplementary notes

Clinical and neuroimaging features of patients with NEDD4L mutations

P158 (c.2690G>A; p.Arg897Gln)

P158 is the second child of healthy unrelated parents. His sister presented unexplained deafness. He was born at term (40 GW) after normal pregnancy. Neonatal parameters showed a head circumference (HC) at 37cm (85th percentile) with normal weight (3750g, 63rd percentile).

Neonatal examination showed truncal hypotonia and bilateral syndactyly of the second and the third toe. Motor development was moderately delayed, he started to stand without help at 16 months of age, but language development was severely delayed.

At last evaluation at 6 years, his weight was 16.5 kg (-1.5 SD), height was 1.08 cm (-1.5 SD) and HC was 54 cm (+1.5SD) with dolichocephaly. No dysmorphic features were found except the bilateral syndactyly. He was able to walk with moderate ataxia, to use few words and to manipulate with both hands. Neurological examination showed mild axial hypotonia. Ophthalmological examination showed myopia and auditory examination was normal.

Cardiac and abdominal ultrasounds were normal. CGH array was normal.

Brain MRI performed at the age of 6 years showed bilateral nodular heterotopia contiguous mostly along the frontal and parietal part of the lateral ventricles regions, sparing the temporal and the occipital horns, without cortical anomalies.

FLNA sequenced with normal results.

BRC127 (c.2677G>A; p.Glu893Lys)

First child to healthy unrelated parents. Born at term after uneventful pregnancy, birth weight 3120g, Apgars 9 at 1 and 9 at 5 minutes. Cleft palate and micrognathia noted at a few hours old. Also has 2/3 syndactyly of toes bilaterally, 5th finger clinodactyly and deep set eyes. Failed initial hearing test and bilateral hearing aids supplied.

Occipital frontal circumference (OFC) at 2 months of age 38 cm (9th to 25th). Very hypotonic, marked head lag. Weight gain poor. Initial MRI failed due to inadequate sedation.

Age 4 months weight 5.29 kg, length 61 cm and OFC 39.0 cm.

Normal female karyotype and microarray showed 1.5Mb Xp22.31 gain (6,461,638-8,010607)x 3

Susceptibility variant for neurobehavioral phenotypes but didn't explain the patient's symptoms. Patient is on DECIPHER as SMH 259695.

Dehydrocholesterol was normal as was screening of connexin genes.

Age 12 months MRI finally successful: "There is bilateral symmetrical subependymal nodularity consistent with gray matter heterotopia outlining both lateral ventricles. The frontal cortex is also a little irregular in outline, as is the insula, suggesting possible cortical dysplasia. Patchy high signal is present in the frontal white matter consistent with dysmyelination. The ventricular system is normal in size. There are normal appearances to the brainstem and cerebellum. Corpus callosum is a little thin. Otherwise myelination shows some delay for a child of this age. Normal pituitary and internal auditory meaty, vestibule, semicircular canals."

FLNA sequenced with normal results.

Review age 4yr 1m. Walked independently at 3yr 11m. Hearing improved but still some mild impairment due to middle ear problems. Points and can use an I-Pad to communicate but no words. Good general health, hyperactive and difficult to examine. OFC 48.5 cm (0.4-2nd).

Rather long face and small mouth. Crowded teeth. *SATB2* sequenced with normal result.

No further MRI scans have been carried out since.

Family S: P347-II.2 and P347-II.3 (c.2677G>A; p.Glu893Lys)

Family S comprises one healthy girl and two affected siblings, one girl and one boy of healthy unrelated parents. The proband is the second child. During pregnancy, ultrasound has shown bilateral club feet. Neonatal examination demonstrated truncal hypotonia, bilateral syndactyly of the second and the third toe, bilateral club foot and bilateral fifth fingers clinodactyly. She also showed cleft palate and septal interventricular defect. Her motor development was severely delayed and she started walking at 4 years of age. Bilateral neurosensory deafness was diagnosed at 4 years. She developed

seizures at 12 years that were rapidly controlled by antiepileptic drugs. At last evaluation at the age of 20 years, her height was 148 cm, her weight 47kg and head circumference 52 cm. She demonstrated severe intellectual disability without behavioral disturbances.

Her young brother was the last child, born at term (41 GW, gestation weeks) after uneventful pregnancy. Neonatal parameters were within the normal range. At birth, he showed truncal hypotonia and feeding difficulties. On examination, he demonstrated microretrognathism, bilateral syndactyly of the second and the third toe, clinodactyly of the fifth fingers, camptodactyly of the 2nd and 3rd of IPP. He also developed few seizures that disappeared with anti epileptic drugs. His development was also severely impaired, unable to walk independently at 8.5years and severe language delay.

CGH array and *FLNA* screening were normal

PNC (c.2677G>A; p.Glu893Lys)

No Cha is the third child of healthy unrelated parents. No medical familial history. She was born at term (38 WG) after normal pregnancy. Neonatal parameters were normal normocephaly (34cm, 50th percentile) with normal weight (3.360g, 50th percentile) and height (50 cm 50th percentile) . Posterior palatal cleft was discovered in neonatal period. Neurological examination was normal.

She was referred to clinical genetics at 12 months of age, for developmental delay and mild dysmorphic features, that included hypertelorism, small nose, with anteverted nostrils, micrognatism, round face. Developmental milestones were delayed, since she was not able to stand unaided but sit with aid.

Growth was normal, for the head (in the – 1SD range), height (+ 2SD) and weight (- 0.25 SD).

At last evaluation at 34 months, she was able to walk with aid, no language and to manipulate with both hands without fine prehension. Neurological examination showed mild axial hypotonia.

Cardiac ultrasounds showed membranous interventricular communication. CGH array was normal

Brain MRI performed at 7 months showed bilateral nodular heterotopia contiguous mostly along the frontal and parietal part of the lateral ventricles regions, sparing the temporal and the occipital horns, with bifrontal polymicrogyria.

pvhn31124 (EPGP012746) (c.2082G>T; p.Gln694His)

This participant presented at age 5 months with infantile spasms (IS) and hypsarrhythmia on EEG. She has been born full term, with Apgar scores of 8 and 9 at 1 and minutes. She was noted shortly after birth to have a cleft palate, which was subsequently repaired. She had mild head lag and axial hypotonia and was unable to reach for objects at 5 months at the time of diagnosis of IS. At 8 months, these issues were improving, but she was still unable to sit unsupported. Weight, length, and occipito-frontal circumference (OFC) were all normal, ranging from the 20th to 33rd percentile (at 8 months, weight 7.6kg—20th percentile, length 68cm—33rd percentile, OFC 43cm—25th percentile). Examination revealed mild 5th finger syndactyly bilaterally and 2/3 syndactyly of the toes of the left foot with normal toes in the right foot. Visual evoked potentials (VEPs) were abnormal, and she was diagnosed with cortical visual impairment as well as optic nerve pallor. MRI was noted to show PVNH in the lateral ventricles; a mutation in FLNA was suspected but sequencing for FLNA mutations was reportedly normal. Array CGH was also obtained and was normal.

DDDP110533 (c.2036A>G Tyr679Cys)

This patient is the first child to healthy unrelated parents and two maternal half siblings are healthy. Choroid plexus cysts were identified on antenatal scan. Fetal movements and liquor volume were normal. He was born at term +6 days weighing 3kg. Apgar scores were 8 at 1 minute, 9 at 5 minutes. At birth he was found to have Pierre Robin sequence and required tracheostomy on day 1. Additional features noted at birth were bilateral undescended testes, syndactyly involving digits 1-4 of both feet, contractures of fingers, thumbs, elbows and knees and prominent eyes with a divergent strabismus. Head circumference was 32.8cm at 6 days of age. Echocardiogram and skeletal survey were normal. Renal ultrasound showed only mild dilated right renal pelvis. He required Nasogastric feeding and subsequently gastrostomy. Low tone was noted at 4 months and developmental progress was very slow. At last review age 6y 3 months he could roll but was not sitting or standing independently. He could use both hands to explore objects and was pointing to needs. Since reversal of tracheostomy he

can vocalize but has no words. He is able to make choices using a picture exchange system, can point and nod in response. He is a happy boy who sleeps well.

He showed initial poor visual behavior with divergent squint and horizontal nystagmus. At surgery for his complex squint the inferior oblique and inferior rectus muscles to the right eye were found to be absent. Visual evoked potentials showed somewhat attenuated flash evoked potential responses. His hearing is normal. He had jaw distraction surgery at 3y 7/12, decannulation of tracheostomy at 4 1/2 y and repair of cleft palate at 4y 9/12.

Occasional myoclonic-like jerks were noted at 4 months and an EEG at that time was abnormal with relative excess slow wave and irregular spike and slow wave complexes. He was commenced on valproate at 10 months. Absence seizures started at around 11 months.

Brain MRI at 7 months showed bilateral PNH, a degree of cerebral underdevelopment but normal corpus callosum.

Weight has been 25-50th centile and length 50th centile.

Investigations have included normal chromosome microarray (OGT 8x60K), *MECP2*, *MLPA*, *FLNA* sequencing, *CK* and 7-dehydrocholesterol.

RESULTATS

Article 4 :

Les isoformes de tubulines β ne sont pas interchangeables pour restaurer l'altération de la migration radiaire due à l'inactivation de Tubb3

Human Molecular Genetics, 2014, Vol. 23, No. 6 **1516–1526**
doi:10.1093/hmg/ddt538
Advance Access published on October 30, 2013

Beta tubulin isoforms are not interchangeable for rescuing impaired radial migration due to Tubb3 knockdown

Yoann Saillour[1,2], Loïc Broix[1,2], Elodie Bruel-Jungerman[3,4,5], Nicolas Lebrun[1,2], Giuseppe Muraca[1,2], Julien Rucci[1,2], Karine Poirier[1,2], Richard Belvindrah[3,4,5], Fiona Francis[3,4,5] and Jamel Chelly[1,2,*]

[1]Institut Cochin, Université Paris Descartes, CNRS (UMR 8104), Paris F75014, France, [2]INSERM U1016, Paris F75014, France, [3]INSERM UMR-S 839, Paris F75005, France, [4]Université Pierre et Marie Curie, Paris F75005, France and [5]Institut du Fer à Moulin, Paris F75005, France

Received June 21, 2013; Revised October 15, 2013; Accepted October 23, 2013

Over the last years, the critical role of cytoskeletal proteins in cortical development including neuronal migration as well as in neuronal morphology has been well established. Inputs from genetic studies were provided through the identification of several mutated genes encoding either proteins associated with microtubules (*DCX*, *LIS1*, *KIF2A*, *KIF5C*, *DYNC1H1*) or tubulin subunits (*TUBA1A*, *TUBB2B*, *TUBB5* and *TUBG1*), in malformations of cortical development (MCD). We also reported the identification of missense mutations in *TUBB3*, the postmitotic neuronal specific tubulin, in six different families presenting either polymicrogyria or gyral disorganization in combination with cerebellar and basal ganglial abnormalities. Here, we investigate further the association between *TUBB3* mutations and MCDs by analyzing the consequences of *Tubb3* knockdown on cortical development in mice. Using the *in utero*-electroporation approach, we demonstrate that Tubb3 knockdown leads to delayed bipolar morphology and radial migration with evidence, suggesting that the neuronal arrest is a transient phenomenon overcome after birth. Silenced blocked cells display a round-shape and decreased number of processes and a delay in the acquisition of the bipolar morphology. Also, more Tbr2 positive cells are observed, although less cells express the proliferation marker Ki67, suggesting that Tubb3 inactivation might have an indirect effect on intermediate progenitor proliferation. Furthermore, we show by rescue experiments the non-interchangeability of other beta-tubulins which are unable to rescue the phenotype. Our study highlights the critical and specific role of Tubb3 on the stereotyped morphological changes and polarization processes that are required for initiating radial migration to the cortical plate.

INTRODUCTION

During brain development, the radial migration of newborn pyramidal neurons is critical for the formation of a laminar cortex in mammals. Post-mitotic neurons exiting from the proliferative ventricular zone (VZ) start their journey by acquiring a succession of bipolar, multipolar and then again bipolar morphologies in the subventricular (SVZ) and intermediate zones (IZ). They migrate long distances to reach their final destination in the cortical plate (CP) forming an 'inside-out' layered cortex (1–3). These steps are followed by dendritic and axonal extensions and the implementation of neuronal circuitry.

Over the last years, the critical role of cytoskeletal proteins in cortical development including steps of neuronal migration and neuronal morphology has been well established. Genetic studies demonstrated the implication of several genes encoding either microtubule-associated proteins (MAPs), other microtubule-binding proteins or motors, or tubulin subunits in malformations of cortical development (MCD). Mutations in the *DCX* and *LIS1* genes, encoding proteins that modulate microtubule (MT) homeostasis, were shown to be associated with a spectrum of lissencephaly neuronal migration disorders encompassing agyria, pachygyria and laminar heterotopias (4–8). More recently, mutations in genes encoding MT-related motor

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 144412410; Fax: +33 144412421; Email: jamel.chelly@inserm.fr

© *The Author 2013. Published by Oxford University Press. All rights reserved.*
For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Downloaded from http://hmg.oxfordjournals.org/ at INSERM on May 9, 2014

proteins, including kinesins (*KIF2A* and *KIF5C*) and dynein (*DYNC1H1*) were also found in MCD patients (9). Moreover, the importance of MT related functions were further demonstrated by the direct association of mutations in tubulin genes and these cortical developmental disorders (10). Indeed, alpha-tubulin (*TUBA1A* and *TUBA8*), beta-tubulin (*TUBB2B*) and gamma-tubulin (TUBG1) genes were shown to be involved in lissencephalies and polymicrogyria (11–14), while mutations in *TUBB5* were identified in cases presenting microcephaly associated with cortical gyration abnormalities (15). Furthermore, we identified missense mutations in TUBB3, a postmitotic neuronal tubulin, in six different families presenting either polymicrogyria or gyral disorganization in combination with cerebellar and basal ganglial abnormalities (16) (OMIM# 614039). In this study, we also reported a *de novo* heterozygous p.Met388Val mutation in a fetal case with microlissencephaly. *TUBB2B* and *TUBB3* were also found mutated in congenital fibrosis of the extraocular muscle disorders (17,18). Finally, mutations in the *TUBB4A* gene were recently reported in families presenting whispering dysphonia associated with dystonia (19,20) and in a leukoencephalopathy hypomyelination syndrome (21).

Tubulin subunits are highly conserved during evolution and alpha–beta tubulin heterodimers are the structural components of MTs. There are multiple copies of the tubulin genes in human and rodent genomes. Alpha- and beta-tubulin subunits are thus encoded by 19 genes (10 alpha and 9 beta) in human and eight alpha- and eight beta-tubulin genes have been isolated in mice (http://genome.ucsc.edu/). Each alpha/beta-tubulin shows >90% amino acid identity with other alpha/beta-tubulins (22). Tubulin isotypes expression and distribution in different cells or tissues is highly regulated, and their apparent redundancy more probably underlies cellular and functional diversity requirements (23). Whereas any of the isotypes could ensure basic structural functions, such as forming an interphase cytoskeleton network (24), convergent studies tend to confirm the functional specificity of the different tubulin isoforms. For instance, specific knockdowns of a set of beta-tubulins in cell cultures showed, for each of the targeted subunits, different cellular phenotypes in differentiating neuronal cells (25). Though further *in vivo* studies are required, these results highlighting the importance of specific combinatorial expression of different tubulin isoforms, are in favor of the much debated multi-tubulin hypothesis (26).

Here, we investigated the association between *TUBB3* mutations and MCDs by analyzing the consequences of either *Tubb3* knockdown or overexpression of TUBB3 mutations on radial neuronal migration in the mouse cortex, using an *in utero*-electroporation approach. We also demonstrate, by rescue experiments, the non-interchangeability of certain beta-tubulins during brain development, confirming their functional specificity.

RESULTS

Tubb3 inactivation perturbs radial migration

In order to assess the consequences of Tubb3 loss of function on the cortical development, we used an *in utero*-electroporation approach to deliver specific short hairpin RNAs (shRNAs) into cortical progenitor cells of the mouse brain VZ. Two specific anti-Tubb3 shRNAs targeting the 3′UTR sequence were cloned in a psiStrike vector under the control of the U6 promoter. Cellular experiments in P19 neuroblastoma cells showed an extinction of Tubb3 at the transcript (sh1: −44%; sh2: −67%) and protein (sh1: −34%; sh2: −67%) levels and only a minor effect of a scrambled sequence compared with the untransfected control (Fig. 1A and B). The validated shRNAs and scramble constructs were then individually electroporated *in utero*, together with an RFP reporter construct into the mouse cortical VZ at embryonic day E14.5, a time coincident with extensive neuronal production and migration. Control electroporated cells gave rise to red fluorescent young neurons migrating toward the CP. Embryos were harvested 4 days later (E18.5) and the migration pattern of the electroporated cells was determined by the quantification of RFP+ cells in the different cortical regions: VZ/SVZ, IZ and CP. We checked the efficiency of the shRNAs *in vivo* by immunolabeling the Tubb3 protein in brain sections and confirmed the large reduction of Tubb3 expression in electroporated cells (Fig. 1C). In cortices transfected only with the RFP plasmid, nearly all the neurons were found as expected in the CP (VZ: 5.6 ± 3.4%, IZ: 6 ± 3.3%, CP: 88.4 ± 6.7%), while the scrambled construct showed slightly lower number of cells in the CP with a proportion still remaining in the IZ, although this did not reach significance (VZ: 8.86 ± 3.6%, IZ: 18.8 ± 5.1%, CP: 74.1 ± 8.3%) (RFP versus scramble Mann–Whitney test; *P*-value: VZ 0.59; IZ 0.11; CP 0.26). In contrast, neurons transfected with the shRNAs against Tubb3 displayed a severe and significant arrest in radial migration. A majority of them were blocked in the IZ with only a few neurons found in the CP (Sh1; VZ: 11.5 ± 5.2%, IZ: 78.2 ± 7.8%, CP: 10.5 ± 4.5%; Sh2; VZ: 23.3 ± 3.5%, IZ: 53.7 ± 3.5%, CP: 22.3 ± 0.2%) (sh1 versus scramble *P*-value: VZ 0.35; IZ**; CP**; sh2 versus scramble *P*-value: VZ*; IZ**; CP**). To validate the specificity of this result, we carried out a rescue experiment by co-electroporation of the anti-Tubb3 sh1 construct and the sh-resistant human TUBB3-coding sequence (NM_006086.3) and revealed a significant derepression of the shRNA blocking effect (VZ: 1.4 ± 0.7%, IZ: 16.3 ± 6.3%, CP: 82.3 ± 6.8%) (sh1 versus sh1+cTUBB3 *P*-value: VZ 0.06; IZ*; CP*) confirming the specificity of the shRNAs and the importance of Tubb3 for radial migration to the cortex (Fig. 1D–F).

TUBB1, TUBB2B and TUBB4A do not fully rescue the Tubb3 knockdown migration defect

To assess the possible functional redundancy of tubulin subunits and the capacity of other beta-tubulins to substitute for the Tubb3 loss of function, we co-electroporated the Tubb3 shRNA with the human-coding sequence of three other beta-tubulins. We selected one that is weakly expressed in human fetal brain (TUBB1, NM_030773) and two which are highly represented in this tissue (TUBB2B, NM_178012 and TUBB4A, NM_006088) (data not shown). TUBB1 cDNA was not able to rescue the Tubb3 knockdown phenotype as a large majority of electroporated cells remained blocked in the VZ and IZ (VZ: 21.5 ± 6%, IZ: 68.2 ± 5.2%, CP: 10.3 ± 4.1%) (sh1 versus sh1+cTUBB1 *P*-value: VZ: 0.29; IZ: 0.41; CP: 0.73). On the other hand, TUBB2B and TUBB4A expression led to a partial rescue as two equal populations of neurons were observed in the IZ and

Downloaded from http://hmg.oxfordjournals.org/ at INSERM on May 9, 2014

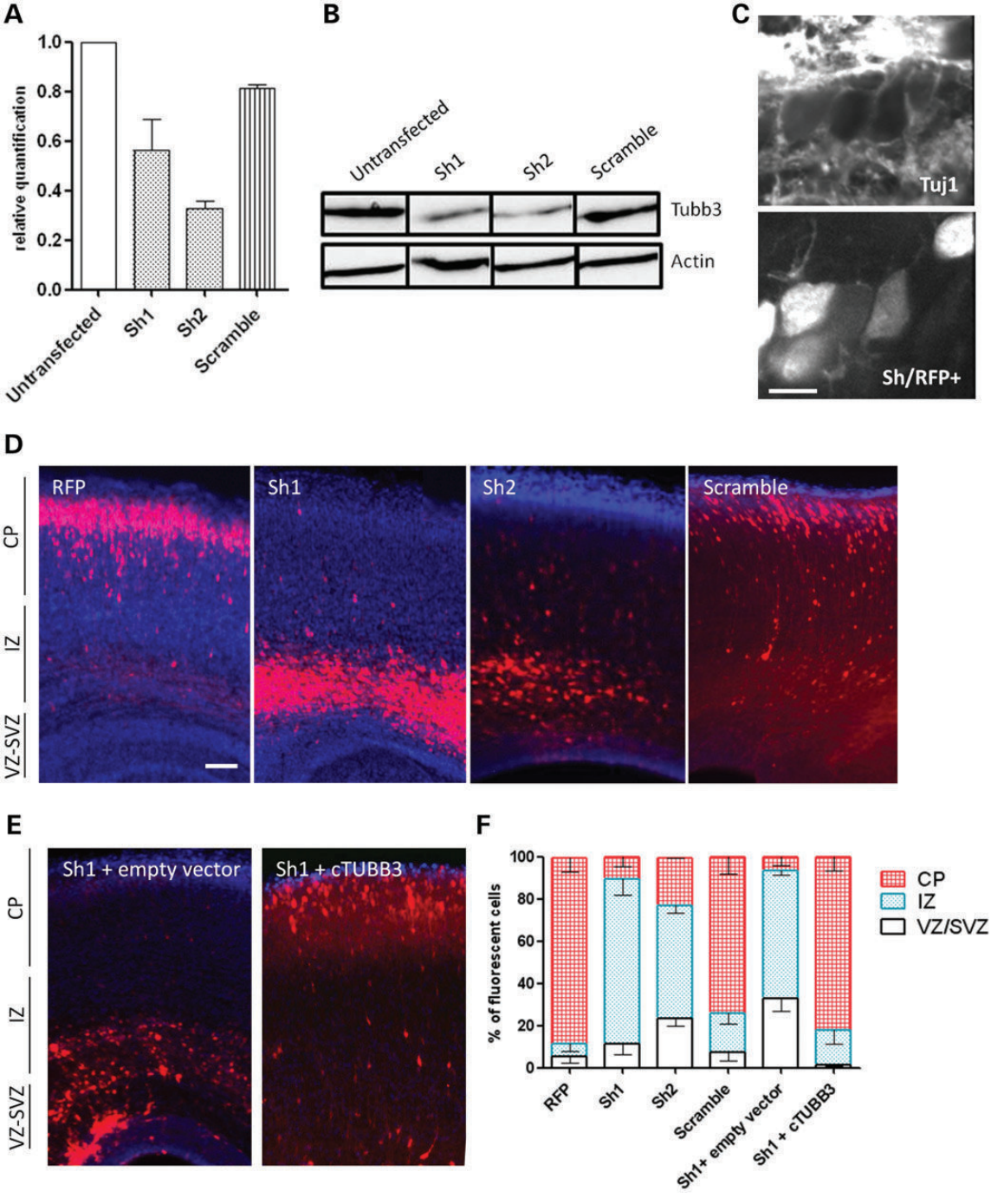


Figure 1. Effect of the knockdown of Tubb3 by shRNA. (**A**–**C**) Validations of efficiency of two sh-RNAs constructs targeting Tubb3. Expression of these two shRNAs in P19 cells led to a decrease of the RNA transcript (sh1: −44%; sh2: −67%) (A) that was confirmed at the protein level by western blotting (B). We checked the efficiency of the shRNAs *in vivo* by immunelabeling the Tubb3 protein in brain sections using the Tuj1 antibody and confirmed the large reduction of Tubb3 expression in electroporated cells, scale bar 5 μm (C). (**D**, **E**) Examination of E18.5 coronal sections of mouse brain, electroporated at E14.5 with RFP alone, or sh1, sh2 and scrambled RNAs together with the RFP plasmid (D), or the sh1 together with an empty vector or the TUBB3 rescue construct (E). (**F**) Fluorescent neurons positioning was quantified in three different regions: VZ/SVZ, IZ and CP. Control cells reached the CP (RFP embryos $n = 4$, VZ: 5.6 ± 3.4%, IZ: 6 ± 3.3%, CP: 88.4 ± 6.7%; scramble $n = 6$, VZ: 8.86 ± 3.6%, IZ: 18.8 ± 5.1%, CP: 74.1 ± 8.3%), whereas shRNAs expressing cells were found in a large majority in the IZ (Sh1, $n = 4$, VZ: 11.5 ± 5.2%, IZ: 78.2 ± 7.8%, CP: 10.5 ± 4.5%; Sh2, $n = 4$, VZ: 23.3 ± 3.5%, IZ: 53.7 ± 3.5%, CP: 22.3 ± 0.2%) (sh1 versus scramble Mann–Whitney test *P*-value: VZ: 0.35; IZ**; CP**; sh2 versus scramble: VZ*; IZ***; CP***) (E). cTUBB3 overexpression leads to the rescue of the shRNA migration phenotype, electroporated neurons were found mainly present in the CP ($n = 5$, VZ: 1.4 ± 0.7%, IZ: 16.3 ± 6.3%, CP: 82.3 ± 6.8%) (sh versus sh+cTUBB3 *P*-value: VZ: 0.06; IZ*; CP*), scale bar 100 μm (D–E).

Downloaded from http://hmg.oxfordjournals.org/ at INSERM on May 9, 2014

CP at day E18.5 (sh1+cTUBB2B VZ: 18 ± 3.1%, IZ: 47.1 ± 8.4%, CP: 34.9 ± 9.6%; sh1+TUBB4A VZ: 13.8 ± 3.7%, IZ: 44.5 ± 9.7%, CP: 41.7 ± 12.5%) (sh1 versus sh1+cTUBB2B *P*-value: VZ 0.24; IZ*; CP 0.07; sh1 versus sh+cTUBB4A *P*-value: VZ: 0.60; IZ: 0.09; CP: 0.26). In view of this result, we checked the expression efficiency of these beta-tubulins after electroporation. Indeed, expression analysis of the transgenes by real-time RT–PCR experiments after *in utero* electroporation and dissection of the electroporated cortical region, showed an efficient and significant expression of these beta-tubulin transgenes (i.e., 177–564 times higher in electroporated regions compared with non-electroporated brains, data not shown).

Although a partial rescue of the migration phenotype was obtained by these two beta-tubulin subunits, the diffused distribution of electroporated cells still remained substantially different from that of the organized cells expressing scramble RNA and RFP alone (Fig. 2A and B), supporting the non-interchangeability of these beta tubulins during cortical development and the functional specificity of Tubb3.

TUBB3 mutants do not rescue the migration impairment

We sought to test whether the expression of MCD-related TUBB3 mutants could complement the phenotype caused by knockdown of Tubb3. We selected therefore TUBB3 variants associated with variable phenotypes in patients and tested p.Gly82Arg and p.Met388Val *TUBB3* mutations, responsible for multifocal polymicrogyria in one patient and fetal microlissencephaly, respectively (16). We electroporated each of these two constructs, in combination with the Tubb3-shRNA-1 and analyzed the position of electroporated cells within the cortex. In both experiments, the mutants did not suppress the shRNA effect: while some of the cells reached the CP (sh1+ p.Gly82Arg: 26.5 ± 11.4%; p.Met388Val: 23.6 ± 4.5%), a majority of them were blocked in the VZ and IZ (p.Gly82Arg VZ: 20.3 ± 6.6%, IZ: 53.2 ± 7.5%; p.Met388Val VZ: 21.5 ± 4.8%, IZ: 55 ± 5.1%), quite similar to the shRNA-1 alone and significantly different from the scramble shRNA (Fig. 2C and D) (sh1 versus sh1+ p.Gly82Arg *P*-value: VZ: 0.35; IZ*; CP: 0.48; sh1 versus sh1+ p.Met388Val *P*-value: VZ: 0.3; IZ*; CP: 0.16) (scramble versus sh1+ p.Gly82Arg *P*-value: VZ: 0.09; IZ*; CP*; sh1 versus sh1+ p.Met388Val *P*-value: VZ:*; IZ**; CP**).

We also overexpressed the wild type and the two TUBB3 mutants alone and observed that the electroporated neurons reached the CP normally. However, when examining more precisely neuronal position it seemed that while control and p.Gly82Arg electroporated neurons reached the upper layers of the CP in a comparable way, the p.Met388Val transfected neurons were arranged in a more diffuse manner in the CP compared with the wild type which may suggest a minor dominant effect on migration (Fig. 2E and F).

The migrating defect related to Tubb3 knockdown is a transient phenomenon

We looked at the effect of the Tubb3 shRNA electroporated at E14.5, on neuron positioning at different embryonic and postnatal stages (E16.5, E17.5, E18.5, P0, P2 and P7). At E16.5 the distribution of RFP+ neurons was quite similar comparing sh and scramble conditions, most of them were found in the VZ and the lower IZ, except for a small proportion of neurons that had already reached the upper IZ. The migration delay of the sh electroporated neurons appeared more evident at E17.5, the effect culminating at E18.5. At the neonatal stage P0 some of the sh electroporated neurons reached the CP and at postnatal stages P2 and P7, no particular differences between the scramble and sh conditions were seen and fluorescent neurons formed a thin layer in the upper part of the cortex (Fig. 3A). In order to verify this result, we checked by immunolabeling of postnatal (P2) brain sections that silencing by shRNA is not transient in neuronal cells that reach the CP. Anti-Tubb3 antibodies showed the presence in the CP of neuronal cells positive for the RFP reporter marker showing a downregulation of Tubb3 (data not shown). Furthermore, brain slices were also stained with an antibody against caspase 3 to assess for an apoptosis of cells arrested in the IZ by immunolabeling of brain sections at E16.5, E18.5 and P2 stages (2, 4 and 6 days after electroporation). No differences were observed between scramble and shRNA conditions (data not shown). These data suggest that the migration phenotype of the neuronal population deficient for Tubb3 is a transient phenomenon and arrested cells maintained their ability to reach the CP 6 days after electroporation.

Tubb3 inactivated cells displayed an abnormal morphology

To better define the defect observed during radial migration, we examined the morphology of cells accumulated in the SVZ/lower IZ in control and sh1 conditions at E16.5. While the migration pattern did not seem to be widely altered, the shape of Tubb3 deficient cells appeared to be different when compared with control. Indeed, a great majority of control cells showed a multipolar morphology with visible processes (scramble: 60 ± 5.5%, sh: 42.4 ± 2.5%; *t*-test, $P^* < 0.05$), compared with the inactivated cells which showed more round shape with no or very short processes (scramble: 8.1 ± 2.6%, sh: 26 ± 3.8%; *t*-test, $P^* < 0.01$) (Fig. 4A and B). Around 30% (scramble: 31.9 ± 3.6%, sh: 31.6 ± 3.1%) of cells in both control and knockdown conditions displayed a typical migrating uni- or bipolar morphology. Similar morphological states were still visible at E18.5 in shRNA electroporated cells blocked in the lower IZ, whereas the control cells had already reached the CP. Approximately 40% of shRNA cells remained multipolar (20.4 ± 8.6%) or displayed round shapes with no or short processes (20.3 ± 9%) (Fig. 4B). Thus, Tubb3 shRNA cells may be retarded in their morphological development.

In addition, we examined the orientation of the main process of cells harboring a bipolar shape at E16.5 and E18.5 days. We divided them into three main categories according to the orientation of the main process with respect to the surface of the ventricle (radially, tangentially or inversely oriented). shRNA and scramble conditions showed similar distributions at E16.5 with a majority of cells oriented radially with an angle of migration between 60° and 90° (scr: 65.1 ± 5%, sh: 51.4 ± 8.4%), a small proportion of cells moved tangentially with an angle between 0° and 30° (scr: 10.1 ± 2.4%, sh: 14.1 ± 4%) and ~20% of them migrated towards the ventricle (scr: 15.2 ± 4.9%, sh: 22.9 ± 3.6%) (n: scr = 262, sh v = 206). At E18.5, whereas control cells had already reached the CP, knockdown

Downloaded from http://hmg.oxfordjournals.org/ at INSERM on May 9, 2014

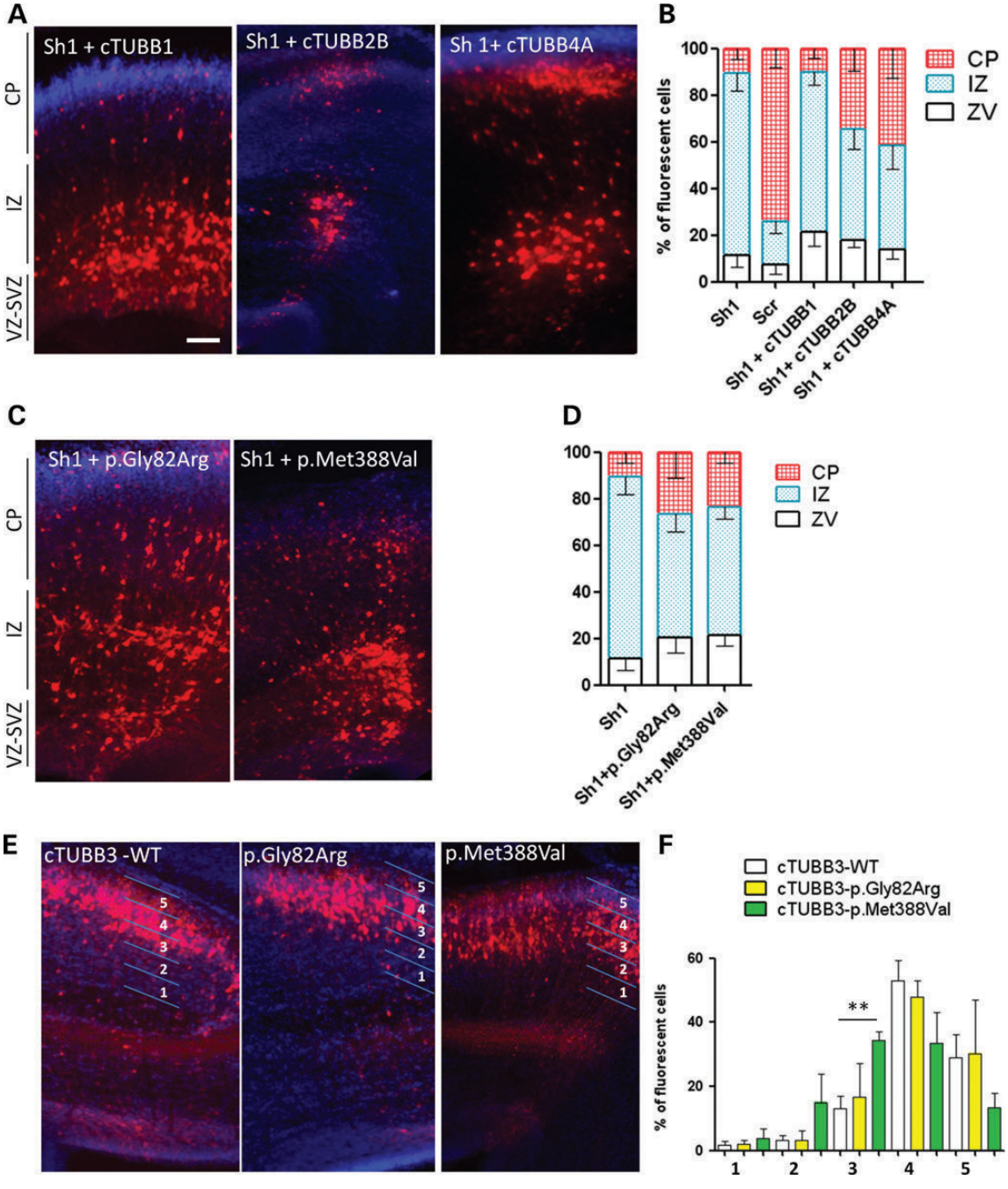


Figure 2. Rescue experiments using TUBB1, TUBB2B and TUBB4A and overexpression of TUBB3 mutants. Examination of E18.5 coronal sections of mouse brains electroporated at day E14.5. (**A**, **B**) Electroporation of Tubb3 shRNA in combination with the coding sequences of TUBB1, TUBB2B and TUBB4A (A). Fluorescent neuron positioning was quantified in three different regions: VZ/SVZ, IZ and CP (B). The sh1+TUBB1 condition showed a majority of cells in the IZ (embryos $n = 5$, VZ: 21.5 ± 6%, IZ: 68.2 ± 5.2%, CP: 10.3 ± 4.1%) (sh1 versus sh1+cTUBB1 *P*-value: VZ: 0.29; IZ: 0.41; CP: 0.73), the sh1+TUBB2B and sh1+TUBB4A conditions displayed two relatively equal populations in the IZ and CP (TUBB2B $n = 8$, VZ: 18 ± 3.1%, IZ: 47.1 ± 8.4%, CP: 34.9 ± 9.6%; TUBB4A $n = 9$, VZ: 13.8 ± 3.7%, IZ: 44.5 ± 9.7%, CP: 41.7 ± 12.5%) hence showing partial rescue (sh1 versus sh1+cTUBB2B *P*-value: VZ: 0.24; IZ*; CP: 0.07; sh1 versus sh1+cTUBB4A *P*-value: VZ: 0.60; IZ: 0.09; CP: 0.26). (**C**, **D**) Two MCD-related mutations (p.Gly82Arg and p.Met388Val) were co-electroporated with the sh construct, in both conditions, a majority of cells were found in the IZ (p.Gly82Arg $n = 6$, IZ: 53.2 ± 7.5%; p.Met388Val $n = 12$, IZ: 55 ± 5.1%) showing therefore partial rescue. (**E**, **F**) Overexpression of TUBB3 WT or p.Gly82Arg and p.Met388Val mutants alone (E). In the three conditions, electroporated neurons migrated to the CP. The CP was divided in five strata (1 = IZ-CP boundary, 5 = marginal zone) and showed a similar pattern for both WT ($n = 4$) and p.Gly82Arg ($n = 3$) conditions and a shift of the position of the neurons overexpressing the p.Met388Val ($n = 4$) mutation to lower layers (F). Error bar represents SEM, Mann–Whitney test, $^{**}P < 0.01$. Scale bar 100 μm.

cells displayed similar orientations as at E16.5. Half of them (48.3 ± 4.8%) were radially oriented, 5.8 ± 4.2% were tangentially oriented and 35 ± 4.5% moved toward the ventricle (Fig. 4C). Altogether, these results showed that Tubb3 inactivation has an impact on neurons morphological changes at E16.5 but not on the orientation of their main process.

Downloaded from http://hmg.oxfordjournals.org/ at INSERM on May 9, 2014

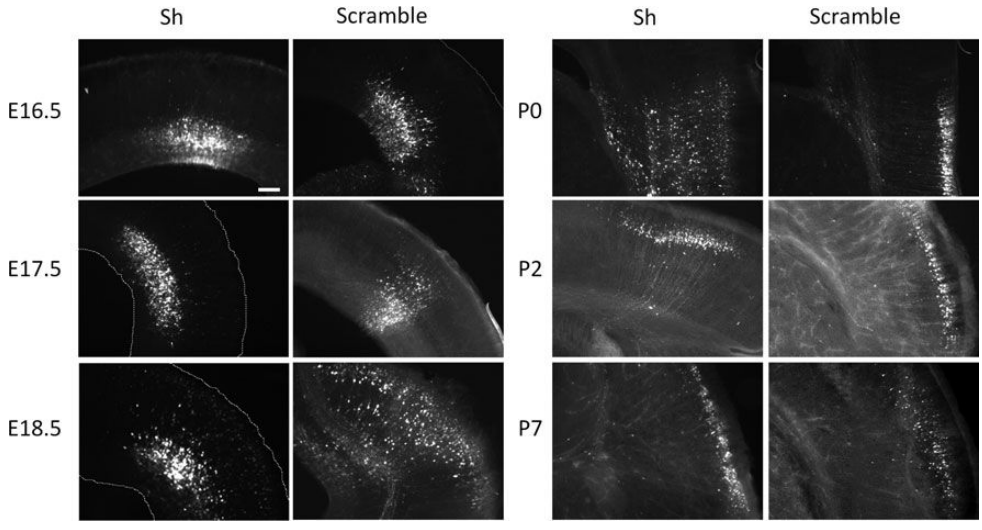


Figure 3. Effects of the Tubb3 shRNA at pre- and post-natal stages on the radial migration. Mouse brains were electroporated at E14.5 with the shRNA against-Tubb3 or control constructs and embryos or pups harvested at E16.5, E17.5, E18.5, P0, P2 and P7. At day E16.5, sh (embryos $n = 6$) and control ($n = 3$) cells were similarly present in the SVZ/lower IZ. While control electroporated cells started to reach the CP from E17.5 stage ($n = 13$), sh cells were still blocked in the SVZ/IZ ($n = 7$). A majority of control cells reached the CP at E18.5 ($n = 4$), whereas sh electroporated cells remained mostly in the SVZ/IZ ($n = 4$). Later, a significant proportion entered the CP at P0 (sh $n = 4$, scramble $n = 6$) and finally formed a compact layer in the upper CP at P2 (sh $n = 4$, scramble $n = 3$) and P7 (sh $n = 5$, scramble $n = 4$). Scale bar 100 μm.

Effect of Tubb3 inactivation on intermediate progenitors

We then sought to determine whether Tubb3 inactivation has an impact on the intermediate progenitor (IP) population in the SVZ. We therefore examined the number of these progenitors by labeling with the IP specific marker, Tbr2, at the E16.5 stage in brains electroporated 2 days earlier with shRNA and scramble constructs. We found a significant increase of Tbr2+ electroporated cells in the shRNA condition compared with the control (scramble: $27.8 \pm 1.7\%$; sh1: $36.5 \pm 2\%$; *t*-test, $P^* < 0.05$) (Fig. 5A). This result suggesting a transition defect and/or a failure of these cells to differentiate into postmitotic neurons prompted us to further investigate consequences of Tubb3 downregulation on IP proliferation.

We checked the expression of Tubb3 in IPs by immunolabeling embryonic brain sections and primary cultures of dissociated progenitors. Double labeling of brain sections suggests that Tubb3 is expressed in a subset of Tbr2 positive cells which are enriched in the basal layer of the SVZ. Because Tbr2 and Tubb3 are localized in different cell compartments, it remained difficult to unambiguously ascertain that these cells express both markers. To further confirm this result, we generated cultures of neuronal progenitor cells and assessed the expression of the two markers. Analysis of the results showed a minor population co-expressing Tubb3 and Tbr2, corresponding to ~10% of the total population of IPs (data not shown).

We also performed quantitative comparative analysis of the proliferation of these cell populations following *in utero* electroporation of scramble and Tubb3-targeting shRNAs. In the VZ no quantitative difference for PH3+, nor for KI67+ cells (RFP electroporated cells) was observed. However, in the SVZ, we found a reproducible significantly reduced number of Ki67+ cells for the Tubb3 shRNA in comparison with the scramble control. For PH3+ cells in the SVZ, no difference between the scramble and shRNA was observed, the scarcity of PH3-positive cells did not allowed reliable statistical comparison (Fig. 5B and C). In independent subsequent *in utero*-electroporation experiments and quantitative comparative analysis using double immunolabeling of brain sections with anti-Tbr2 and anti-Ki67 antibodies, we confirmed the observed decrease of cells in the SVZ co-expressing Tbr2 and Ki67 in the shRNA condition compared with the control (scr: $4.9 \pm 1\%$, sh: $2.4 \pm 0.9\%$; n: scr = 453, sh = 372, χ^2-test, $^*P < 0.05$; data not shown).

Altogether these data show the critical role of Tubb3 in cortical development, especially in the morphological changes undertaken by cells at the beginning of migration and in the regulation of the IP transition towards their differentiation into neuronal cells.

DISCUSSION

The subunit tubulin beta 3 has been considered as a specific marker of neurons for decades and its implication in brain development was more recently emphasized by its involvement in MCDs (16). Here, we used an *in utero*-electroporation approach to explore more precisely the role of Tubb3 in mouse brain during cortical development. We describe a delay of migration that culminates at E18.5 in neurons electroporated at E14.5 with shRNA constructs suppressing Tubb3 expression. These results show that Tubb3 plays an important role in the correct migration of pyramidal neurons in fitting with the MCD phenotypes. Similar studies previously demonstrated a deleterious effect of shRNAs against Tubb2b and Tubb5 during cortical radial migration in the rodent. While the knockdown of Tubb2b disrupt the radial migration in rat (13), anti-Tubb5 shRNA led to a blocking of the migration in mouse cortices with a specific impact on the length of the neurogenic cell cycling (15). We show here delayed initiation of migration in Tubb3 mutant cells which take a longer time to develop a

Downloaded from http://hmg.oxfordjournals.org/ at INSERM on May 9, 2014

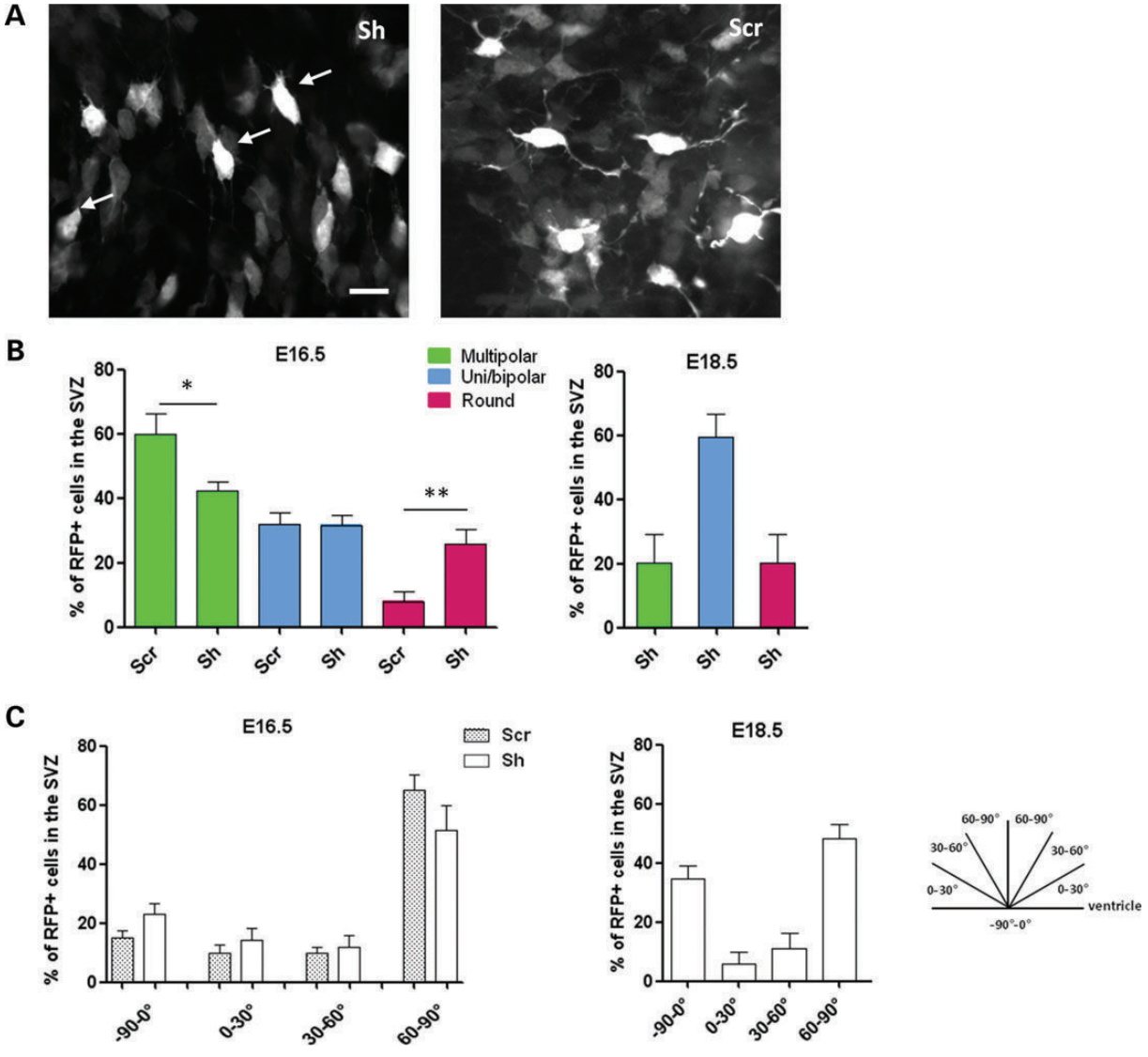


Figure 4. Characterization of cells blocked in the SVZ and lower IZ after Tubb3 inactivation. (**A**, **B**) Morphology of cells in the SVZ/lower IZ of E16.5 mouse brains electroporated 2 days earlier with sh anti-Tubb3 or control shRNA. These inactivated cells displayed a decrease of the multipolar morphology with multiple visible processes (scr: 60 ± 5.5%, sh: 42.4 ± 2.5%) and an increase of round-shaped cells with very short processes (white arrows) compared with the control (scr: 8.1 ± 2.6%, sh: 26 ± 3.8%) with an equal amount of uni/bipolar cells (scr: 31.9 ± 3.6%, sh: 31.6 ± 3.1%) (n: scr = 305, sh = 156). Scale bar 10 μm. Two days later, at day E18.5, 20.4 ± 8.6% of blocked cells in the sh condition were multipolar and 20.3 ± 9% remained round with short processes, whereas 59.3 ± 7.3% were uni- or bipolar ($n = 87$). (**C**) Orientation study of bipolar cells in the VZ. shRNA and scramble conditions showed a similar repartition at E16.5 with a majority of cells oriented radially (scr: 65.1 ± 5%, sh: 51.4 ± 8.4%) and ~20% of them migrating toward the ventricle (scr: 15.2 ± 4.9%, sh: 22.9 ± 3.6%) (n: scr = 262, sh = 206). At E18.5, while control cells have already reached the CP, Sh electroporated cells elongating a main process were for half of them radially oriented (48.3 ± 4.8%), 5.8% of them elongated a process tangentially and 35 ± 4.5% migrated toward the ventricle (n: sh = 40). Error bar represents SEM, χ^2-test, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

bipolar morphology. These combined results confirm the importance of the MT during various steps of cortical development.

Interestingly, in this experimental design the Tubb3-related migration defect seems to be a phenomenon that disappears 4–5 days later in postnatal stages. The result showing a continued downregulation of Tubb3 in neuronal cells that had reached the CP suggest that Tubb3-related migration defect is transient. Though additional investigations are required to address this observation, these data suggest that neurons that do not express Tubb3 maintain migratory potential in early stages after birth. This has been also shown in Dcx knockdown condition, in which blocked neurons in the VZ/ IZ resumed their migration after overexpression of Doublecortine transcript at P0 (27). Also, as expression of TUBB2B, TUBB1 and TUBB4A cDNAs did not rescue the migration phenotype, it suggests that other tubulins could be involved in the adaptive phenomenon and compensate the lack of Tubb3 allowing neuronal cells to recover their migration ability. Similarly, expression profiles during neuronal development of MT-interacting proteins could also contribute to the observed recuperation of migration. Tubb3 downregulation leads to a significant reduction of multipolar processes in E16.5 SVZ. Moreover, silenced cells still display multipolar or round shapes at E18.5 (morphologies which are not observed at this stage in control cells). These

Downloaded from http://hmg.oxfordjournals.org/ at INSERM on May 9, 2014

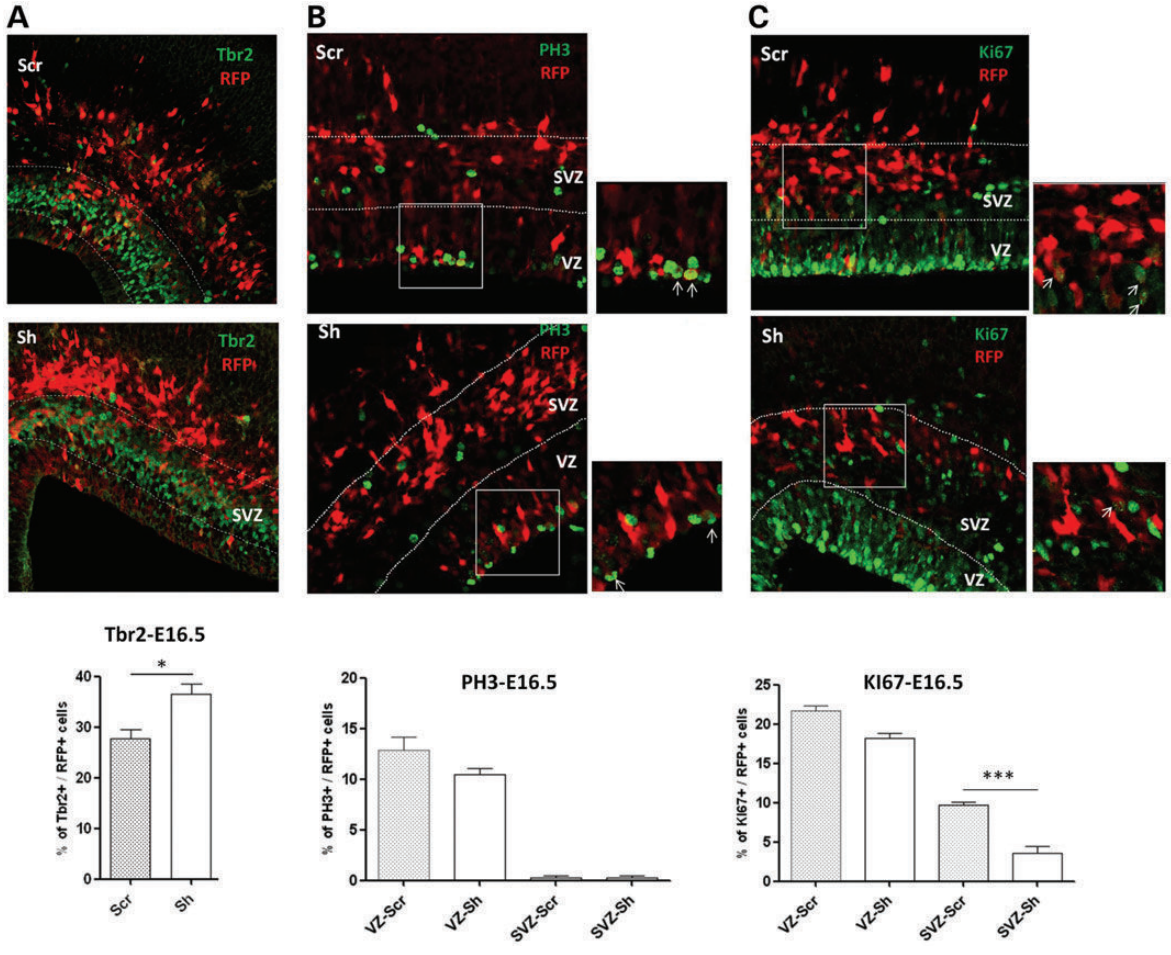


Figure 5. Consequences of Tubb3 inactivation on IPs. (**A**) Quantification of Tbr2+/RFP+ cells in the SVZ of brains electroporated at E14.5 and examined at E16.5 after immunolabeling showed an increased number of Tbr2+ cells electroporated with the sh compared with the control (n: scr = 1813, sh = 688). (**B**, **C**) Immunolabelings with antibodies against PH3 (B) and KI67 (C) of scramble and shRNA electroporated brain sections and quantification of RFP+/PH3+ and RFP+/KI67+ in the VZ (nPH3: scr = 280, sh = 261; nKI67: scr = 343, sh = 366) and the SVZ (nPH3: scr = 561, sh = 565; nKI67: scr = 816, sh = 897). Error bar represents SEM, χ^2-test, $^*P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$. Scale bar 25 μm.

results are reminiscent of previous studies showing that RNAi *in utero*-electroporations-targeting Filamin A, Lis1 and Dcx, three other genes responsible for MCDs and interacting directly or indirectly with the cytoskeleton, lead to an accumulation of multipolar cells in the SVZ or the IZ (28). They also suggest that Tubb3 appears necessary, through its structural role, for proper MT dynamics and therefore neuronal morphology organization and process elongation.

Concerning the other beta-tubulins tested here (TUBB1, TUBB2B and TUBB4A), TUBB1 that is weakly expressed in human fetal brain is not able to replace Tubb3 function, leading to the hypothesis that these two beta subunits ensure completely different functions, perhaps involving different protein partners. Beta-tubulin-2B and -4A, two subunits expressed in human fetal brain, overcome partially the Tubb3 related migration defect showing that they share some, but not all brain specific functions. This result tends to support the idea of the non-interchangeability of tubulin subunits. Our data suggest that even if they share significant homology and common functions, each tubulin subunit may have a specific role that cannot be replaced by other subunits during cortical development. These findings are also consistent with the existence of specific syndromes in human caused by mutations in different tubulin subunits. The complexity is also such that different mutations in one tubulin gene can lead also to several different phenotypes (13,16–18).

In this *in utero*-electroporation-based study, we tested two *TUBB3* MCD-related mutations: (i) p.Gly82Arg, responsible for a moderate form of MDC within the TUBB3-related spectrum, and predicted to be adjacent to the lateral beta–beta interaction domain of tubulins and (ii) p.Met388Val, which leads to a dramatic fetal form of microlissencephaly. This latter mutation resides on the outer surface of the MT and could interact with MAPs and motor proteins or be involved in protein folding (29). We established that the two mutations fail to complement the Tubb3 shRNA phenotype, although the two mutations could act in slightly different ways in an overexpression context. While the p.Gly82Arg mutant had no major overexpression effect, p.Met388Val led to a mild dispersion of neurons in the cortex that could have repercussions in the establishment of a proper neuronal connectivity. These combined observations may suggest that the first mutation acts as a loss of function and

Downloaded from http://hmg.oxfordjournals.org/ at INSERM on May 9, 2014

the second could have potentially a dominant-negative effect during mouse radial migration, consistent with the different phenotype observed in patients. Given that all mutations identified in the tubulin isotypes (*TUBA1A*, *TUBB2B*, *TUBB3* and *TUBB5*) are missense mutations, it is likely that some may act in a dominant-negative fashion via an altered protein function, thus in addition to haploinsufficiency, contributing to the mechanisms underlying MCDs. Though recurrent mutations are consistently associated with almost identical MCDs, at the current level of our understanding of tubulin functions and their cellular roles, and the potential multi-level effects of tubulin mutations assessed by different assays, it is difficult to predict molecular mechanisms (haploinsufficiency or dominant-negative effect) and/or disease phenotype resulting from a given mutated residue or isoform.

Finally, we showed that Tubb3 downregulation is associated with a significant reduction of Ki67+ cells in the SVZ. This finding that is apparently in contradiction with the increased number of Tbr2 cells is also difficult to reconcile with the assumption that Tubb3 is mainly expressed in postmitotic neuronal cells. However, we can hypothesize that Tubb3 inactivation might have an indirect effect on Tbr2 progenitor proliferation. Indeed, Tubb3 inactivation and the subsequent disruption of early differentiation and migration steps of cells that are still Tbr2+ and their accumulation in the SVZ might indirectly trigger through cell–cell contacts a signal that leads to a reduction of proliferation of IPs (Fig. 6). In view of these findings, we are also attempted to hypothesize that normal cortical development may also involve a cross talk between CP and VZ/SVZ.

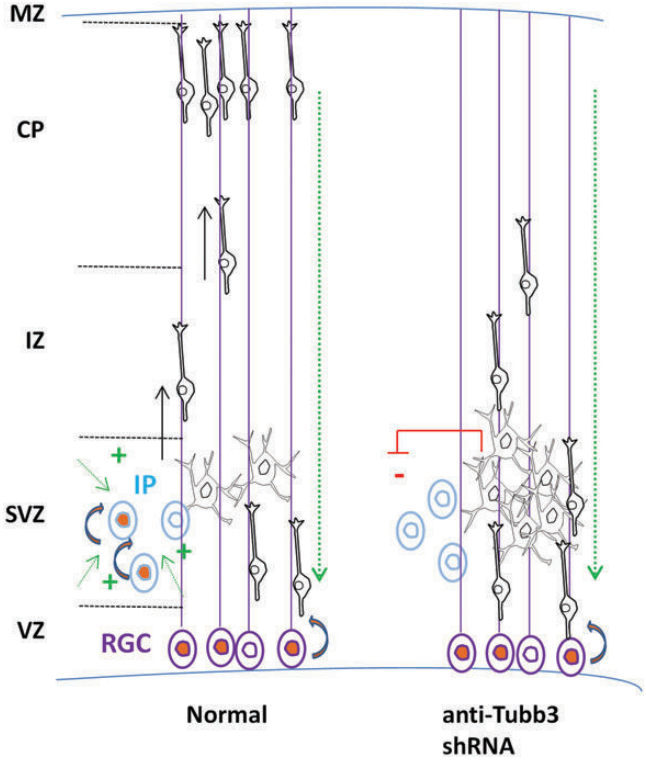


Figure 6. Schematic representation illustrating the hypothesis, proposed in the discussion, of cross talk between progenitors proliferation and neuronal positioning.

It is well established that position of pyramidal neurons in the CP is dependent of their date of birth, and here we propose that cells that reach their final position in the CP 'talk' to the VZ, via radial glia fibers, to allow a fine tuning of progenitor proliferation.

Although many questions remain to be addressed, our study emphasizes the crucial role of the MT network in different steps of neuronal migration and especially in the critical stereotyped morphological changes and polarization processes that are required for triggering and regulating radial migration towards the CP. From our study, it appears clear that beta-tubulins are non-interchangeable in the context of this neuronal radial migration assay, providing therefore important information concerning the debate of their potential redundancy.

MATERIALS AND METHODS

Vectors

We designed two different shRNA oligonucleotides targeting the 3′UTR of the mouse Tubb3 transcript (Sh1 specifically recognizes nucleotides 1427–1451, Sh2, nucleotides 1435–1459, NM_023279). Annealed oligonucleotides were cloned in the psiSTRIKE U6 promoter-driven vector. As control, we used a scrambled oligonucleotide corresponding to Sh2. Human beta-tubulin cDNAs were inserted in the pcDNA vector (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) under the CAG (chicken beta-actin promoter with CMV enhancer) promoter for the rescue experiments.

Quantitative PCR and western blot

Plasmids used for *in utero*-electroporation were prepared using the Endotoxin-Free Plasmid kit (Macherey Nagel, Duren, Germany). Efficiency of the shRNAs against Tubb3 was assessed at the transcript and protein levels by transfection in murine P19 cells with the Neon System (Life Technologies). RNAs were purified by the RNAeasy Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands), cDNA were prepared with Maxima First Strand cDNA synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Watham, MA, USA), and then RT–PCR products amplified from cDNA were quantified with the LightCycler 480 FastStart DNA SYBR Green I Master kit in a LightCycler 480 System (Roche, Manheim, Germany). Protein explorations were performed by loading equal quantities of lysates on polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose membrane. After blocking with a 5% milk solution (w/v), blots were incubated with the primary antibody overnight at 4°C. Mouse Tubb3 antibody from Covance (Princeton, NJ) was used at 1:1000 and goat Actin antibody (SC-1616, Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, USA) was diluted at 1:1000. HRP (horseradish peroxidase) secondary antibodies from Dako-Agilent Technologies (Santa Clata, CA, USA) were used diluted at 1:5000.

In utero electroporation

In utero electroporations were performed as described previously (30) using Swiss timed pregnant mice. Briefly, 1–2 μg of plasmid DNA combined with fast green (2 mg/ml; Sigma) were injected into the lateral ventricles of E14.5 brains and

Downloaded from http://hmg.oxfordjournals.org/ at INSERM on May 9, 2014

then electroporated into VZ progenitor cells by delivering five electric pulses at 45 V for 50 ms at 950 ms intervals through the uterine wall using a CUY21EDIT System (Nepagene, Chiba, Japan). Embryos or pups were allowed to develop for 2–13 days, brains were harvested, and brain sections of 80 μm were prepared using a vibratome (VT1000S, Leica, Solms, Germany). The positions and morphology of transfected cells were analyzed by fluorescence microscopy after fixation of the sections with 4% paraformaldehyde using a DMRA2 microscope (Leica Microsystems, Solms, Germany).

Immunohistochemistry

Free-floating sections were blocked with 2% goat serum in phosphate buffered saline (PBS) and 0.2% Triton-X 100. The primary antibodies used were anti-TBR2 (rabbit polyclonal, 1:200, Abcam, Cambridge, UK), anti-beta 3 tubulin Tuj1 (mouse, 1:500, Covance, Princeton, NJ, USA), anti-phospho Histone H3 (rabbit, 1:500, Millipore, Billerica, MA, USA), anti-Ki67 (mouse, 1:200, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) overnight at 4°C. After three washes in PBS, sections were incubated with either FITC- or Cy5-conjugated secondary antibody (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA) in a 1:300 dilution at room temperature, washed and mounted with Fluoromount (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Images were acquired using a spinning disk system (Leica Microsystems, Solms, Germany) for morphological analyses or a TCS SP5 II (Leica Microsystems, Solms, Germany) for immunolabeling analysis. All cells were counted for statistical analyses using ImageJ software (NIH).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Katia Boutourlinsky, Reham Khalaf and Audrey Roumegous for their technical support and Pierre Billuart for his helpful comments and discussions.

Conflict of Interest statement. None declared.

FUNDING

This work was supported by fundings from Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, the Fondation pour la Recherche Medical (J Chelly—Equipe FRM 2013: DEQ2000326477), the Fondation JED, the Agence Nationale pour la Recherche (ANR Blanc1103-01 projet R11039KK, ANR E-RARE-012-01 projet E10107KP, ANR 08-MNP-013) and the EU-FP7 project GENECODYS (grant number 241995). We thank the INSERM Avenir program and the Fondation Bettencourt Schueller for grants awarded to F.F., the Région Ile-de-France for the NERF postdoctoral grant awarded to EBJ/FF and for their support of animal house and imaging facilities. The team of F.F. is part of the Ecole des Neurosciences de Paris Ile-de-France network.

REFERENCES

1. Gupta, A., Tsai, L.H. and Wynshaw-Boris, A. (2002) Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat. Rev. Genet.*, **3**, 342–355.
2. Tabata, H. and Nakajima, K. (2003) Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.*, **23**, 9996–10001.
3. Kriegstein, A.R. and Noctor, S.C. (2004) Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci.*, **27**, 392–399.
4. Saillour, Y., Carion, N., Quelin, C., Leger, P.L., Boddaert, N., Elie, C., Toutain, A., Mercier, S., Barthez, M.A., Milh, M. *et al.* (2009) LIS1-related isolated lissencephaly: spectrum of mutations and relationships with malformation severity. *Arch. Neurol.*, **66**, 1007–1015.
5. Gleeson, J.G., Allen, K.M., Fox, J.W., Lamperti, E.D., Berkovic, S., Scheffer, I., Cooper, E.C., Dobyns, W.B., Minnerath, S.R., Ross, M.E. *et al.* (1998) Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell*, **92**, 63–72.
6. Reiner, O., Carrozzo, R., Shen, Y., Wehnert, M., Faustinella, F., Dobyns, W.B., Caskey, C.T. and Ledbetter, D.H. (1993) Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature*, **364**, 717–721.
7. Bahi-Buisson, N., Souville, I., Fourniol, F.J., Toussaint, A., Moores, C.A., Houdusse, A., Lemaitre, J.Y., Poirier, K., Khalaf-Nazzal, R., Hully, M. *et al.* (2013) New insights into genotype-phenotype correlations for the doublecortin-related lissencephaly spectrum. *Brain*, **136**, 223–244.
8. des Portes, V., Francis, F., Pinard, J.M., Desguerre, I., Moutard, M.L., Snoeck, I., Meiners, L.C., Capron, F., Cusmai, R., Ricci, S. *et al.* (1998) Doublecortin is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia (SCLH). *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 1063–1070.
9. Poirier, K., Lebrun, N., Broix, L., Tian, G., Saillour, Y., Boscheron, C., Parrini, E., Valence, S., Pierre, B.S., Oger, M. *et al.* (2013) Mutations in TUBG1, DYNC1H1, KIF5C and KIF2A cause malformations of cortical development and microcephaly. *Nat. Genet.*, **45**, 639–647.
10. Jaglin, X.H. and Chelly, J. (2009) Tubulin-related cortical dysgeneses: microtubule dysfunction underlying neuronal migration defects. *Trends Genet.*, **25**, 555–566.
11. Keays, D.A., Tian, G., Poirier, K., Huang, G.J., Siebold, C., Cleak, J., Oliver, P.L., Fray, M., Harvey, R.J., Molnar, Z. *et al.* (2007) Mutations in alpha-tubulin cause abnormal neuronal migration in mice and lissencephaly in humans. *Cell*, **128**, 45–57.
12. Poirier, K., Keays, D.A., Francis, F., Saillour, Y., Bahi, N., Manouvrier, S., Fallet-Bianco, C., Pasquier, L., Toutain, A., Tuy, F.P. *et al.* (2007) Large spectrum of lissencephaly and pachygyria phenotypes resulting from de novo missense mutations in tubulin alpha 1A (TUBA1A). *Hum. Mutat.*, **28**, 1055–1064.
13. Jaglin, X.H., Poirier, K., Saillour, Y., Buhler, E., Tian, G., Bahi-Buisson, N., Fallet-Bianco, C., Phan-Dinh-Tuy, F., Kong, X.P., Bomont, P. *et al.* (2009) Mutations in the beta-tubulin gene TUBB2B result in asymmetrical polymicrogyria. *Nat. Genet.*, **41**, 746–752.
14. Abdollahi, M.R., Morrison, E., Sirey, T., Molnar, Z., Hayward, B.E., Carr, I.M., Springell, K., Woods, C.G., Ahmed, M., Hattingh, L. *et al.* (2009) Mutation of the variant alpha-tubulin TUBA8 results in polymicrogyria with optic nerve hypoplasia. *Am. J. Hum. Genet.*, **85**, 737–744.
15. Breuss, M., Heng, J.I., Poirier, K., Tian, G., Jaglin, X.H., Qu, Z., Braun, A., Gstrein, T., Ngo, L., Haas, M. *et al.* (2012) Mutations in the beta-tubulin gene TUBB5 cause microcephaly with structural brain abnormalities. *Cell. Rep.*, **2**, 1554–1562.
16. Poirier, K., Saillour, Y., Bahi-Buisson, N., Jaglin, X.H., Fallet-Bianco, C., Nabbout, R., Castelnau-Ptakhine, L., Roubertie, A., Attie-Bitach, T., Desguerre, I. *et al.* (2010) Mutations in the neuronal ss-tubulin subunit TUBB3 result in malformation of cortical development and neuronal migration defects. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 4462–4473.
17. Cederquist, G.Y., Luchniak, A., Tischfield, M.A., Peeva, M., Song, Y., Menezes, M.P., Chan, W.M., Andrews, C., Chew, S., Jamieson, R.V. *et al.* (2012) An inherited TUBB2B mutation alters a kinesin-binding site and causes polymicrogyria, CFEOM and axon dysinnervation. *Hum. Mol. Genet.*, **21**, 5484–5499.
18. Tischfield, M.A., Baris, H.N., Wu, C., Rudolph, G., Van Maldergem, L., He, W., Chan, W.M., Andrews, C., Demer, J.L., Robertson, R.L. *et al.* (2010) Human TUBB3 mutations perturb microtubule dynamics, kinesin interactions, and axon guidance. *Cell*, **140**, 74–87.
19. Lohmann, K., Wilcox, R.A., Winkler, S., Ramirez, A., Rakovic, A., Park, J.S., Arns, B., Lohnau, T., Groen, J., Kasten, M. *et al.* (2012) Whispering dysphonia (DYT4 dystonia) is caused by a mutation in the TUBB4 gene. *Ann. Neurol.*, **73**, 537–545.

Downloaded from http://hmg.oxfordjournals.org/ at INSERM on May 9, 2014

20. Hersheson, J., Mencacci, N.E., Davis, M., Macdonald, N., Trabzuni, D., Ryten, M., Pittman, A., Paudel, R., Kara, E., Fawcett, K. *et al.* (2013) Mutations in the autoregulatory domain of beta-tubulin 4a cause hereditary dystonia. *Ann. Neurol.*, **73**, 546–553.
21. Simons, C., Wolf, N.I., McNeil, N., Caldovic, L., Devaney, J.M., Takanohashi, A., Crawford, J., Ru, K., Grimmond, S.M., Miller, D. *et al.* (2013) A de novo mutation in the beta-tubulin gene TUBB4A results in the leukoencephalopathy hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum. *Am. J. Hum. Genet.*, **92**, 767–773.
22. Khodiyar, V.K., Maltais, L.J., Ruef, B.J., Sneddon, K.M., Smith, J.R., Shimoyama, M., Cabral, F., Dumontet, C., Dutcher, S.K., Harvey, R.J. *et al.* (2007) A revised nomenclature for the human and rodent alpha-tubulin gene family. *Genomics*, **90**, 285–289.
23. Hallworth, R. and Luduena, R.F. (2000) Differential expression of beta tubulin isotypes in the adult gerbil cochlea. *Hear. Res.*, **148**, 161–172.
24. Lewis, S.A. and Cowan, N.J. (1988) Complex regulation and functional versatility of mammalian alpha- and beta-tubulin isotypes during the differentiation of testis and muscle cells. *J. Cell. Biol.*, **106**, 2023–2033.
25. Guo, J., Walss-Bass, C. and Luduena, R.F. (2010) The beta isotypes of tubulin in neuronal differentiation. *Cytoskeleton (Hoboken)*, **67**, 431–441.
26. Cleveland, D.W. (1987) The multitubulin hypothesis revisited: what have we learned? *J. Cell. Biol.*, **104**, 381–383.
27. Manent, J.B., Wang, Y., Chang, Y., Paramasivam, M. and LoTurco, J.J. (2009) Dcx reexpression reduces subcortical band heterotopia and seizure threshold in an animal model of neuronal migration disorder. *Nat. Med.*, **15**, 84–90.
28. LoTurco, J.J. and Bai, J. (2006) The multipolar stage and disruptions in neuronal migration. *Trends Neurosci.*, **29**, 407–413.
29. Tischfield, M.A., Cederquist, G.Y., Gupta, M.L. Jr and Engle, E.C. (2011) Phenotypic spectrum of the tubulin-related disorders and functional implications of disease-causing mutations. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **21**, 286–294.
30. Tabata, H. and Nakajima, K. (2001) Efficient in utero gene transfer system to the developing mouse brain using electroporation: visualization of neuronal migration in the developing cortex. *Neuroscience*, **103**, 865–872.
31. Niwa, S., Takahashi, H. and Hirokawa, N. (2013) Beta-tubulin mutations that cause severe neuropathies disrupt axonal transport. *EMBO J.*, **32**, 1352–1364.

Downloaded from http://hmg.oxfordjournals.org/ at INSERM on May 9, 2014

DISCUSSION

DISCUSSION

Au cours de ce travail de thèse, nous avons tout d'abord participé à l'implication de quatre nouveaux gènes codant pour une kinésine motrice (KIF5C), une kinésine avec activité microtubule dépolymérase (KIF2A), la dynéine cytoplasmique (DYNC1H1) et une tubuline du centrosome, la tubuline-γ (TUBG1), dans un large spectre de MDC avec ou sans microcéphalie (Poirier et al. 2013). Ces données sont venues renforcer l'importance du centrosome et des protéines liées aux microtubules dans le développement cortical.

A la suite de cette étude, nous nous sommes focalisés sur la compréhension des mécanismes cellulaires et développementaux altérés par des mutations dans le gène *KIF2A*. Nos explorations physiopathologiques, principalement basées sur la technique d'électroporation *in utero,* ont permis de montrer que l'expression des mutants KIF2A associés à des MDC mène à des défauts neurodéveloppementaux qui combinent des dérégulations de la neurogenèse et de la migration neuronale. Une étude plus approfondie de la population et de la prolifération des progéniteurs neuronaux indique un plus grand nombre de cellules en mitose et de progéniteurs apicaux et basaux, ce qui peut s'expliquer par le défaut de sortie du cycle cellulaire observé pour ces progéniteurs. Sur le plan cellulaire, nous avons mis en évidence dans les fibroblastes de patient, d'une part, des anomalies dans l'intégrité du fuseau mitotique et d'autre part des altérations dans la ciliogenèse.

En parallèle de ces études, ces travaux de thèse ont également permis d'identifier des mutations dans *NEDD4L* causant des hétérotopies nodulaires périventriculaires (HNP) associées à une fente palatine, une syndactylie des orteils et un retard neurodéveloppemental. L'ensemble des mutations identifiées associées à ce phénotype sont des mutations faux-sens localisées dans la région codant pour le domaine catalytique HECT de la E3 ubiquitine ligase NEDD4L. Nos études cellulaires ont montré une surprenante augmentation de la sensibilité des protéines mutées à la dégradation par le protéasome. De plus, l'approche d'électroporation *in utero* a révélé que l'expression des mutants NEDD4L et l'excès de la protéine sauvage affectent les processus de neurogenèse, de migration neuronale et de translocation somatique terminale, confirmant le rôle critique joué par NEDD4L dans la corticogenèse. Des études complémentaires, incluant un traitement préventif par la rapamycine (inhibiteur de mTORC1), ont permis de mettre en évidence des différences dans les voies de signalisation dérégulées par l'excès de NEDD4L et l'expression des mutants. En effet, l'excès de NEDD4L entraine une dérégulation des voies Dab1 et mTORC1 tandis que l'expression des mutants NEDD4L est associée à une dérégulation des voies mTORC1 et AKT.

Dans les parties suivantes, nous allons discuter des questions importantes que soulèvent ces travaux, telles que les mécanismes des mutations dans NEDD4L, les conséquences différentielles de l'excès de NEDD4L sauvage et de l'expression des mutants, le niveau de contribution des dérégulations de la prolifération et de la migration neuronale causées par des mutations dans KIF2A dans le positionnement des neurones et l'émergence du rôle clé joué par le couplage entre la ciliogenèse et le cycle cellulaire dans la pathogénie des MDC.

A. NEDD4L, mécanismes moléculaires des mutations et altération des voies de signalisation mTOR-AKT et TGFβ-Smad2/3

1. Un nouveau mécanisme moléculaire responsable de pathologies humaines

Au cours de notre étude nous avons observé, de manière surprenante, que l'expression des protéines NEDD4L mutées responsables de HNP est détectable uniquement après traitement par un inhibiteur du protéasome suggérant une sensibilité accrue pour la dégradation par le protéasome des formes mutées. Ces observations nous ont conduits dans un premier temps à considérer le fait qu'un mécanisme d'haplo-insuffisance pourrait être à l'origine des pathologies neurodéveloppementales observées. Cependant, ce mécanisme ne semblait pas en accord avec une étude antérieure concernant les modèles double KO pour *Nedd4-1* et *Nedd4l*. En effet, les auteurs ont montré par électroporation *in utero* dans les souris double KO que l'absence de *Nedd4-1* et *Nedd4l* n'entrainaient pas de défaut de positionnement des neurones dans la plaque corticale 21 jours après la naissance (Hsia et al., 2014). Néanmoins, ils montrent par cette même technique que le niveau d'expression de *Nedd4-1* et *Nedd4l* est nécessaire pour la croissance axonale des neurones arrivés à destination dans le cortex indiquant un rôle important du contrôle de l'expression de *Nedd4-1* et *Nedd4l* dans les phases finales de la corticogenèse. Afin de renforcer ces données, nous avons réalisé l'électroporation *in utero* de shRNA dirigés contre Nedd4l et nous n'avons observé aucun défaut de positionnement des neurones durant le développement embryonnaire.

L'ensemble de ces données a donc suggéré un autre mécanisme d'action des mutations sous-tendant les altérations du développement cortical conséquentes à l'expression des protéines NEDD4L mutées instables. Afin d'expliquer cette sensibilité accrue au protéasome nous avons proposé le modèle présenté Figure 58.

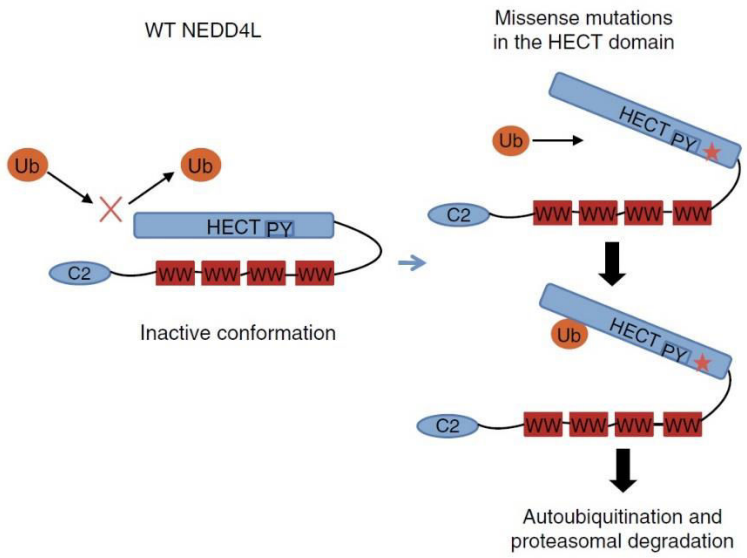


Figure 58 : Modèle représentant les conséquences des mutations dans NEDD4L sur sa stabilité.

La protéine NEDD4L sauvage (gauche) est représentée dans sa forme fermée inactive tandis qu'une mutation dans le domaine HECT est prédite pour mener à un changement de conformation favorisant la transition de l'état inactif fermé vers l'état actif ouvert (droite). L'activation de NEDD4L déclenche son auto-ubiquitination et finalement sa dégradation par le protéasome.

Dans ce modèle, nous proposons que les mutations faux-sens dans le domaine HECT puissent entrainer des changements de conformation et une activation constitutive de la fonction catalytique, ce qui déclenche en retour l'auto-ubiquitination de NEDD4L et sa prise en charge par le protéasome.

Ce modèle est principalement basé sur deux études antérieures. Bruce et *coll* ont été les premiers à proposer qu'un domaine WW (domaine d'interaction protéine-protéine contenant deux résidus tryptophane conservés) de la partie N-terminale de la protéine peut se lier à un motif PY contenu dans le domaine HECT et ainsi permettre l'inhibition de l'auto-ubiquitination de NEDD4L (Bruce et al., 2008). Des mutations dans ce motif PY du domaine HECT diminue la stabilité de la protéine lors d'expériences de *pulse-chase* suggérant que ce motif est impliqué dans la stabilité de NEDD4L. Les auteurs montrent également que l'ubiquitination d'un substrat promeut l'auto-ubiquitination de NEDD4L. Ces données suggèrent donc que : (1) En l'absence de substrat, l'interaction entre le domaine WW et le domaine HECT permet de stabiliser la protéine en empêchant l'auto-ubiquitination. (2) Suite à des interactions avec le substrat, la liaison entre les domaines WW et HECT est perturbée par l'intervention d'une liaison de plus forte affinité entre le domaine WW de NEDD4L et le substrat. (3) Suite à l'ubiquitination du substrat et la perturbation de l'interaction WW-HECT, NEDD4L s'auto-ubiquitine, ce qui mène à sa dégradation.

Plus récemment, Escobedo et *coll* ont également étudié ce processus de régulation par auto-ubiquitination de NEDD4L. En plus de renforcer les observations précédentes, les auteurs suggèrent également que l'auto-ubiquitination de NEDD4L correspondrait à un mécanisme bi-moléculaire (Escobedo et al., 2014). En effet, une déstabilisation du domaine HECT (reflétant un état de dépliement de la protéine qui est le signal pour la dégradation de la protéine) entrainerait l'exposition du motif PY

d'une molécule de NEDD4L qui pourrait ainsi se lier au domaine WW3 d'une autre molécule de NEDD4L fonctionnelle, qui en retour serait responsable de l'ubiquitination de la molécule NEDD4L déstabilisée (Figure 59).

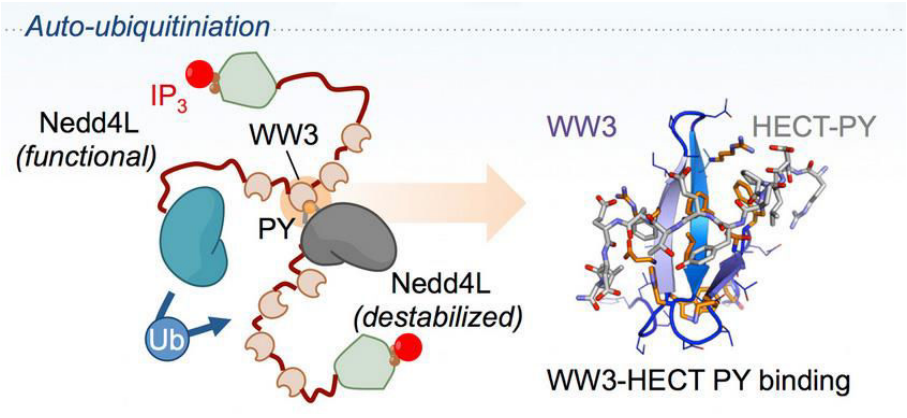


Figure 59 : Modèle de l'auto-ubiquitination de NEDD4L selon un mécanisme bi-moléculaire.

Une protéine NEDD4L fonctionnelle à l'état ouvert actif serait capable de se lier, via son domaine WW3, au domaine HECT déstabilisé d'une autre protéine NEDD4L afin de catalyser son ubiquitination et entrainer sa dégradation par le protéasome. (D'après Escobedo et al. 2014)

Concernant notre modèle d'activation constitutive des formes mutées de NEDD4L, il est raisonnable d'envisager que les mutations ne causent pas uniquement l'auto-ubiquitination de NEDD4L mais également l'ubiquitination anormale d'autres substrats de NEDD4L tandis qu'un mécanisme conventionnel de perte de fonction entrainerait uniquement une diminution de l'activité d'ubiquitination. En outre, malgré l'auto-ubiquitination et la dégradation des formes mutées de NEDD4L, le modèle d'activation constitutive pourrait imiter l'activité accrue résultant de la surexpression de la forme sauvage de NEDD4L. Ce modèle pourrait donc expliquer, au moins partiellement, les contradictions évidentes que soulèvent l'observation de défauts similaires de la corticogenèse résultant de l'expression de la forme stable sauvage de NEDD4L et les formes mutées instables responsables de HNP. De plus, de manière cohérente avec le modèle bi-moléculaire proposé par Escobedo et *coll,* nous avons observé que la co-expression de la forme sauvage et d'une forme mutée de NEDD4L entraine une diminution de l'expression de la forme sauvage (données personnelles, Figure 60). Ces données laissent donc suggérer que les mutations dans le domaine HECT de NEDD4L entraineraient l'activation constitutive de NEDD4L puis sa dégradation et également la dégradation d'une fraction (d'un pool accessible) de la protéine sauvage endogène.

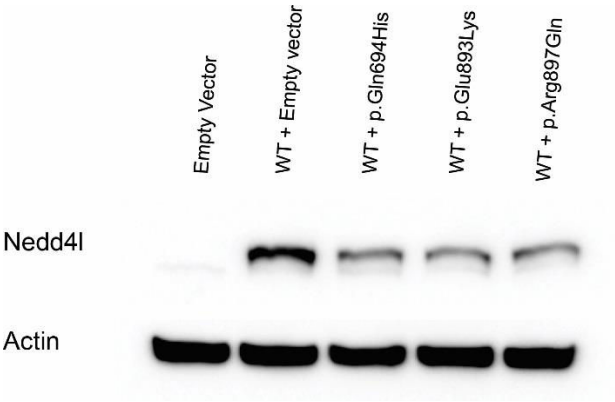


Figure 60 : Co-expressions des protéines NEDD4L sauvages et mutées dans les cas de HNP.

Immunoblot représentatif réalisé à partir d'extraits protéiques de cellules N2A co-transfectées avec un vecteur d'expression de NEDD4L sauvage (WT) et les vecteurs d'expression des différentes formes mutées de NEDD4L responsables de HNP. Il est intéressant de noter que l'expression combinée des mutants NEDD4L avec NEDD4L WT entraine une forte diminution du niveau total de NEDD4L comparé au contrôle NEDD4L WT + vecteur vide (*Empty vector*). (Données personnelles)

2. Différentes voies de signalisation altérées entre l'excès de NEDD4L et l'expression des mutants

Au cours de notre étude, nous avons mis en évidence des dérégulations des voies de signalisation mTOR-Dab1 pour l'excès d'expression de la protéine sauvage et mTOR-PI3K-AKT et TGFβ-Smad2/3 pour l'expression des protéines NEDD4L mutées. Ces dérégulations différentielles sont résumées sur la Figure 61.

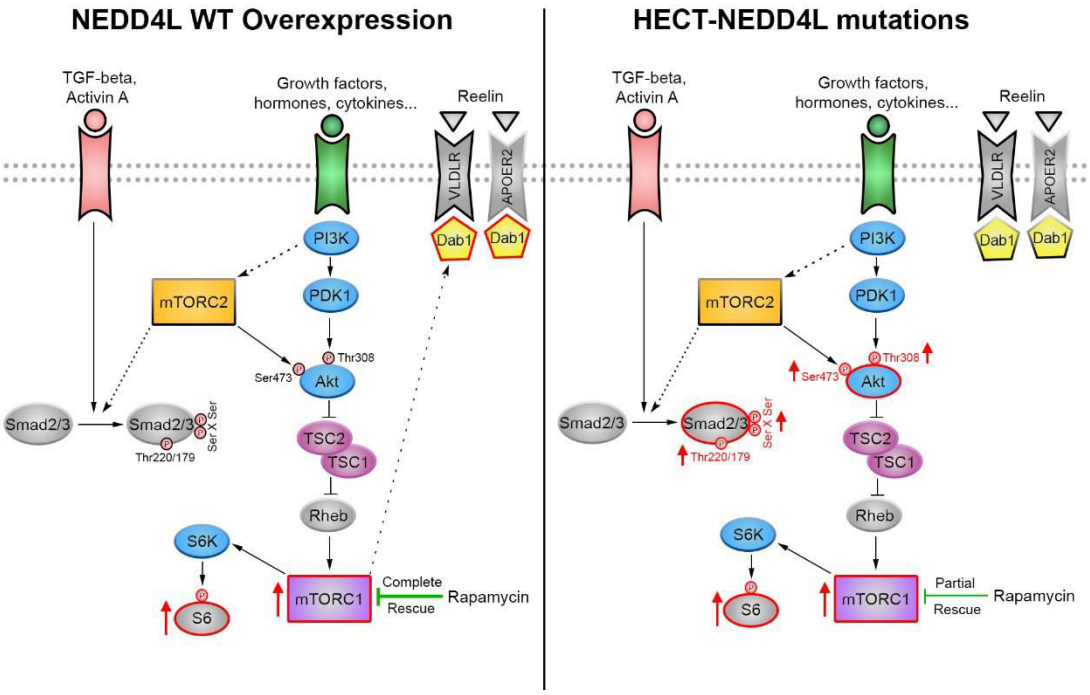


Figure 61 : Schéma récapitulatif des dérégulations observées dans des conditions basales résultant de l'excès de NEDD4L sauvage (gauche) et de l'expression des mutants NEDD4L responsable de HNP (droite).

2.1 L'excès de NEDD4L sauvage et les voies mTORC1-Dab1

Les observations du sauvetage du phénotype complet du défaut de positionnement des neurones et de la distribution de Dab1 dans les neurones en migration suite au traitement à la rapamycine, ont laissé suggérer que le défaut de migration radiaire induit par la surexpression de NEDD4L sauvage pourrait être dû à une dérégulation de la voie mTORC1 et Dab1 (Figure 61).

Comme nous l'avons abordé dans l'introduction, la signalisation mTOR (mTORC1 et mTORC2) joue un rôle crucial dans le développement du cortex. Afin de mieux disséquer le rôle de mTORC1, Cloetta et *coll* ont inactivé spécifiquement mTORC1 chez la souris par délétion du gène codant pour Raptor (protéine adaptatrice uniquement présente dans le complexe mTORC1) dans les progéniteurs neuronaux. Ils ont observé que ces souris présentaient des microcéphalies associées à une réduction du nombre de neurones produits et une diminution de la taille des neurones (Cloëtta et al., 2013). Plus récemment, les effets de l'activation de mTORC1 dans les progéniteurs neuronaux et dans la migration neuronale ont été évalués. L'activation de mTORC1 a pour conséquence une augmentation de la mort cellulaire par apoptose des progéniteurs neuronaux tandis que l'activation spécifique dans les neurones post-mitotiques entraine un arrêt de la migration et une augmentation de la taille des neurones. De manière parallèle, une mutation *de novo* somatique dans mTOR a été identifiée chez un patient présentant une hémimégalencéphalie (Lee et al., 2012b). Dans les cellules de patient, le niveau d'activation de la voie mTORC1 (visualisé par la phosphorylation de pS6) est anormalement élevé suggérant que la mutation dans mTOR entraine son activation constitutive et confirme l'importance du contrôle de l'activation de mTOR dans le développement cortical. Il est intéressant de noter que, à l'inverse, l'inactivation spécifique de mTOR dans les neurones post-mitotiques et le traitement par la rapamycine n'altère pas la migration et le positionnement des neurones dans la plaque corticale (Jossin and Goffinet, 2007; Ka et al., 2014).

D'autre part, l'activation anormale de la voie mTOR est également une caractéristique soulignant les défauts de migration observés chez les patients présentant des scléroses tubéreuses complexes (Tsai et al., 2014). Dans le cas des scléroses tubéreuses complexes, l'activation de la voie mTOR est conséquente à l'absence de TSC1/TSC2. Les études des modèles KO pour TSC1/2 ont montré une dérégulation au niveau du contrôle de la différenciation des progéniteurs en neurones mais pas d'augmentation de la mort cellulaire comme pour le cas de l'activation constitutive de mTORC1 (Magri et al., 2011). De manière cohérente, l'inhibition de la voie mTORC1 par la rapamycine corrige la majorité des défauts du développement cortical observés dans les souris modèles KO pour TSC1/2 (Carson et al., 2012; Way et al., 2012). Plus récemment, Moon et *coll* ont montré qu'une dérégulation de la voie de signalisation Reelin-Dab1 contribue aux défauts de migration observés dans leur modèle

de souris KO pour Tsc2 dans les neurones post-mitotiques. Les auteurs suggèrent que l'activation aberrante de la voie mTORC1 dans les tubeurs dérégule l'équilibre entre Dab1 et Dab1 phosphorylée par augmentation de l'expression de l'ubiquitine ligase Cul5 (Moon et al. 2015). De plus, nous pouvons noter que l'excès d'expression de la protéine nucléocytoplasmique Dab1 dans le cytoplasme des neurones en migration a un effet inhibiteur sur le processus de migration radiaire (Honda and Nakajima, 2016).

De l'ensemble de ces données, nous pouvons tout d'abord remarquer des différences majeures entre l'activation constitutive de mTORC1 et son activation indirecte par délétion de TSC1/2, qui entrainent respectivement une forte augmentation de l'apoptose des progéniteurs et une dérégulation de la balance entre prolifération et différenciation. Ces différences peuvent s'expliquer par des niveaux d'activation différentielle de mTORC1. Dans le cas de la délétion de TSC1/2, l'activation de mTORC1 peut être contrôlée par d'autres voies de signalisation tandis que des mutations activatrices dans mTORC1 entrainent son activation constitutive.

Les défauts de la migration radiaire associés à une relocalisation de Dab1 dans le cytoplasme, à la prolifération des progéniteurs et à l'absence de mort par apoptose conséquent à l'excès de NEDD4L sauvage, semble donc laisser suggérer un mécanisme physiopathologique se rapprochant de celui des scléroses tubéreuses complexes. Dans ce contexte, afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques du développement cortical conséquents à un excès de NEDD4L, il serait intéressant de vérifier le niveau d'expression et d'ubiquitination de protéines telles que Tsc1/2, Rheb ou encore Cul5 durant les différents processus de la corticogenèse.

2.2 L'expression des mutants NEDD4L associées à des HNP et les voies mTOR-AKT et TGFβ-Smad2/3

A la différence de l'excès de NEDD4L sauvage, l'expression des formes mutées de NEDD4L semble induire des défauts dans le développement cortical qui passent par une dérégulation des voies PI3K-AKT, mTORC1 et mTORC2 et TGFβ-Smad2/3 (Figure 61). Bien que des expériences soient nécessaires pour déterminer par quels mécanismes l'expression des mutants NEDD4L affectent ces voies de signalisation, ces hypothèses sont cohérentes avec une étude récente montrant que NEDD4L est capable de catalyser l'ubiquitination de PIK3CA (sous-unité catalytique de PI3K) afin de réguler la signalisation PI3K-AKT et avec nos expériences de traitement à la rapamycine (Wang et al., 2016b).

Nos expériences cellulaires ont mis en évidence une augmentation de la phosphorylation activatrice de AKT sur le résidu Thr308, qui est le site de phosphorylation décrit pour être la conséquence de l'activation de la voie PI3K-PDK1. La voie signalisation PDK1-AKT contribue à la régulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation et du métabolisme d'un grand nombre de types cellulaires, cependant son rôle dans la migration neuronale n'a été que très peu décrit jusqu'à

récemment. En effet, cette année, Itoh et *coll* ont décrit un rôle crucial de la voie PDK1-AKT dans la régulation de la vitesse de locomotion des neurones pyramidaux par le contrôle du mouvement coordonné entre le noyau et le centrosome, qui est un processus dépendant des microtubules (Itoh et al., 2016). La voie PDK1-Akt régulerait le réseau de microtubules dans les neurones en migration par l'intermédiaire de la régulation du complexe dynéine cytoplasmique/dynactine. De manière intéressante, dans cette étude et d'après nos données personnelles, l'expression d'une forme constitutivement active de AKT durant le développement cortical entraine un défaut majeur de la migration radiaire. Il a également été montré que AKT régule l'expression de la sous-unité $p150^{Glued}$ de la dynactine (Itoh et al. 2016). Il est donc possible d'imaginer que l'augmentation de l'activité de AKT dans le cas de l'expression des mutants NEDD4L pourrait entrainer un défaut de la régulation des processus dépendant des microtubules, via le complexe dynéine cytoplasmique/dynactine, et ainsi contribuer à la pathogenèse des HNP. Cela mettrait en évidence des similarités dans les mécanismes physiopathologiques à l'origine de HNP et des anomalies de la gyration dues à des mutations dans des gènes codant pour des protéines associées aux microtubules.

Nous avons également observé une augmentation de la phosphorylation activatrice sur le résidu Ser473 de AKT. mTORC2 est décrit comme étant la kinase clé pour cette phosphorylation étant donné que la délétion de Rictor (un protéine spécifique du complexe mTORC2) réduit la phosphorylation sur ce résidu dans de nombreux types cellulaires (Guertin et al., 2006; Shiota et al., 2006). Le rôle de mTORC2 est beaucoup moins décrit que mTORC1. Une étude montre que la délétion de Rictor dans les progéniteurs neuronaux de souris entraine une diminution des corps cellulaires des neurones et de la taille du cerveau qui parait totalement indépendante des voies descendantes de mTORC1 telle que pS6 (Thomanetz et al., 2013). Il est également envisageable de penser que l'augmentation de la phosphorylation de AKT sur le résidu Ser473 soit due indirectement à l'augmentation de l'activité de la voie PI3K-PDK. En effet, AKT phosphorylée en Thr308 induit la phosphorylation de mTORC2 qui en retour catalyse la phosphorylation de AKT en Ser473 afin d'obtenir une activation complète de AKT (Yang et al., 2015) (Figure 62).

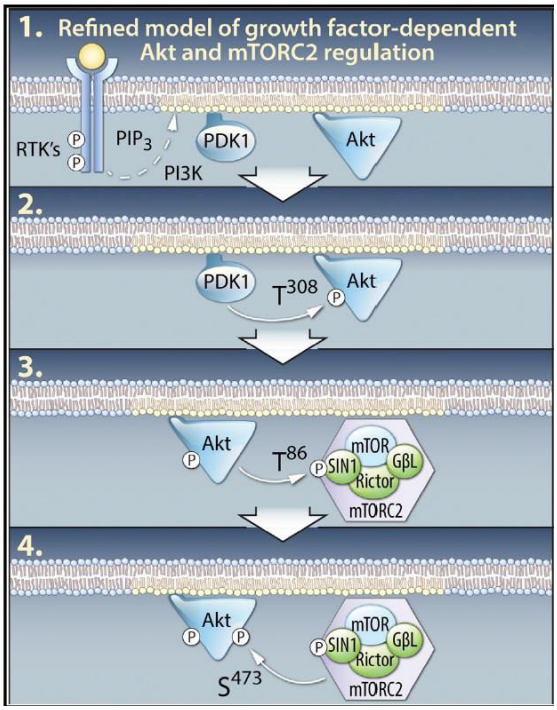


Figure 62 : Modèle de la boucle de régulation positive entre AKT et mTORC2.

Suite à la fixation d'un facteur de croissance sur son récepteur, la voie PI3K-PDK1 est activée (1). La kinase PDK1 phosphoryle AKT sur le résidu Thr308, augmentant ainsi son activité (2). AKT phosphoryle ensuite la protéine SIN1 du complexe mTORC2 augmentant l'activité de mTORC2 (3), ce qui mène à l'activation complète de AKT par phosphorylation sur le résidu Ser473 par mTORC2. (D'après Yang et al. 2015)

Récemment, NEDD4L a été identifié comme un acteur clé de la régulation croisée existant entre les voies PI3K-mTORC2 et TGFβ-Smad2/3 (Yu et al., 2015). En effet, mTORC2, par l'intermédiaire de l'activation de la voie PI3K, phosphoryle Smad2/3, ce qui permet le recrutement de NEDD4L et finalement la dégradation de Smad2/3. Cette dégradation dépendante de PI3K-mTORC2 a pour conséquence de restreindre l'activation de la voie TGFβ induite par l'activine (et d'autres ligands). De manière intéressante, nous avons observé que l'expression des formes mutées de NEDD4L induit une augmentation du niveau de Smad2/3 phosphorylé à l'état basal mais mène à une diminution de ces protéines après activation par l'activine. Cela semble principalement suggérer que l'expression des mutants NEDD4L limite l'activation de la voie TGFβ induite par l'activine et que la régulation croisée entre les deux voies PI3K-mTORC2 et TGFβ-Activine-Smad2/3 est perturbée. Le rôle de la voie TGFβ dans le développement est encore très peu décrit et compris. Seules quelques études sur son rôle dans la prolifération des progéniteurs ont été réalisées. L'ensemble de ces études semble suggérer que l'activation de la voie TGFβ dans les cellules gliales radiaires promeut la différenciation en neurones et en astrocytes (Stipursky et al., 2012, 2014). De manière parallèle, l'activation de la voie TGFβ par l'activine dans des cellules neuronales progénitrices en culture favorise la différenciation neuronale (Rodriguez-Martinez et al., 2012). Il sera particulièrement intéressant d'évaluer la contribution de la dérégulation de la voie TGFβ-Smad2/3 ainsi que sa régulation croisée avec la voie PI3K-mTORC2, dans le cas de l'expression des mutants NEDD4L, dans les altérations du développement cortical, ce qui

permettrait de mieux comprendre le rôle de cette voie dans les différents processus de la corticogenèse.

De plus, l'expression des mutants NEDD4L entraine une augmentation de l'activité de mTORC1, qui n'est cependant pas associée à une dérégulation de la localisation de Dab1 (discutée ultérieurement), mais qui semble contribuer au défaut de migration puisque le traitement par la rapamycine atténue partiellement les effets sur la migration radiaire.

Au final, nous avons montré que, pour les formes mutées de NEDD4L, en plus de l'augmentation de l'activité de mTORC1, la dérégulation de l'activité des voies AKT et TGFβ-Smad2/3 apporte un nouveau point d'entrée pour mieux comprendre le rôle de NEDD4L dans le développement cortical. Ces données viennent également renforcer l'implication de la voie PI3K-AKT-mTOR dans le développement cortical, des mutations activatrices dans AKT3, PIK3R2 et PIK3C étant déjà identifiées dans un large spectre de maladies neurodéveloppementales dont certaines partagent des caractéristiques phénotypiques communes aux MDC.

A l'avenir, il serait donc intéressant de disséquer plus en détail l'implication des voies dérégulées dans les mécanismes physiopathologiques sous-tendant l'expression des formes mutées de NEDD4L. Une des pistes pourrait être le traitement des souris électroporées *in utero* par des drogues inhibant spécifiquement chaque voie, telles que la Torin-1 (inhibiteur de mTORC1 et mTORC2) ou PIK-75 (inhibiteur spécifique de PI3K).

3. Quels sont les mécanismes à l'origine de ces différences ?

L'une des interrogations qui émerge à la vue de ces résultats est comment l'excès de NEDD4L sauvage et l'expression des mutants constitutivement actifs peuvent entrainer des dérégulations différentielles de voies de signalisation? Nous allons tenter de discuter des premiers éléments de réponse en proposant des hypothèses basées sur des régulations différentielles de la monoubiquitination de substrats et des mécanismes de modulation de l'activité de NEDD4L.

3.1 Une implication de la monoubiquitination?

Alors que l'ajout par une E3 ubiquitine ligase d'une chaine de plusieurs ubiquitines sur une protéine cible correspond principalement à un signal pour la dégradation par le protéasome, la monoubiquitination permet la régulation de nombreuses fonctions cellulaires telles que le trafic intracellulaire, l'endocytose de récepteur ou la régulation transcriptionnelle (Hicke, 2001).

L'un des phénotypes surprenant obtenu pour l'excès de NEDD4L sauvage en culture cellulaire (données personnelles) et lors du développement cortical correspond à une forte relocalisation du facteur

nucléocytoplasmique Dab1 au niveau de la périphérie de la cellule. Dans la même lignée de résultats, nous avons également observé un phénotype de relocalisation similaire de RBX2 (sous-unité de la Cullin-5 E3 ubiquitine ligase) après surexpression de NEDD4L sauvage en culture cellulaire mais pas pour l'expression des formes mutées de NEDD4L (données personnelles). Même si peu de données sont disponibles concernant la fonction de la monoubiquitination de substrats par NEDD4L, deux études attirent particulièrement l'attention. En effet, une première étude a montré que NEDD4L catalyse la monoubiquitination de DLG3 (*Drosophila discs large* 3), ce qui est requis pour la liaison de DLG3 à la dynéine permettant son trafic au niveau des jonctions adhérentes de la membrane apicale des cellules épithéliales (Van Campenhout et al., 2011). Une seconde étude s'est intéressée à la régulation du transport de PTEN (Phosphatase and tensin homolog) entre le cytoplasme et le noyau et suggère que la monoubiquitination de PTEN par NEDD4-1 permet l'import de PTEN au niveau du noyau (Trotman et al., 2007). De plus, dans leur modèle, il existe une balance entre la monoubiquitination et la polyubiquitination de PTEN par NEDD4-1 qui entre en jeu dans la régulation du destin de PTEN entre l'import vers le noyau et sa dégradation (Figure 63).

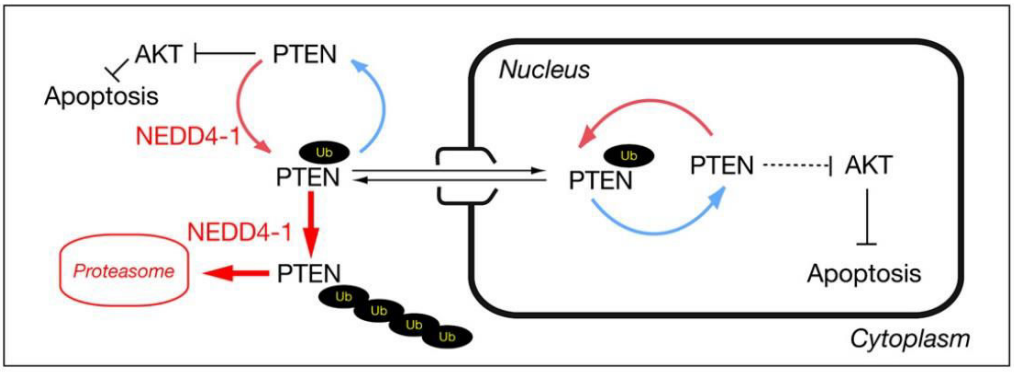


Figure 63 : Modèle de la régulation de la balance entre le trafic nucléocytoplasmique et la dégradation de PTEN par NEDD4-1.

La protéine PTEN est monoubiquitinée par NEDD4-1 dans le cytoplasme, ce qui permet son import dans le noyau. PTEN peut également être polyubiquitinée dans le cytoplasme par NEDD4-1 menant à sa dégradation par le protéasome. Une fois dans le noyau, PTEN peut retourner dans le cytoplasme ou, après avoir été déubiquitinée, rester dans le noyau et ainsi être protégée de la dégradation par le protéasome. (D'après Trotman et al. 2007)

Ainsi, grâce à ces données nous pouvons émettre l'hypothèse que l'excès de NEDD4L sauvage pourrait catalyser la monoubiquitination d'un plus grand nombre de protéines telles que DAB1 et RBX2, induisant une plus forte relocalisation de ces protéines au niveau de la périphérie de la cellule tandis que l'activité de polyubiquitination vis à vis de ces substrats serait inchangée. L'expression des mutants NEDD4L, potentiellement constitutivement activés, dérégulerait la balance en faveur d'une

polyubiquitination des substrats plutôt qu'une monoubiquitination, ce qui pourrait expliquer les différences de phénotypes observés entre la surexpression de la protéine sauvage et les protéines mutées pour la localisation subcellulaire de DAB1 et RBX2. Dans le futur, il sera donc pertinent de savoir si NEDD4L est capable de monoubiquitiner certains des substrats cités et d'évaluer la contribution de ce mécanisme dans la dérégulation des processus du développement cortical, ce qui ne semble pas encore décrit jusqu'à maintenant.

3.2 Une modulation différentielle de l'activité de NEDD4L ?

Tout d'abord, il est important de faire un rappel du modèle d'activation de NEDD4L proposé par Escobedo et *coll* (Escobedo et al. 2014). Dans leur modèle, la production d'IP3 induit la redistribution du calcium dans le cytoplasme, ce qui déclenche la transition d'une conformation fermée inactive vers une conformation active de NEDD4L, puisque la liaison du calcium sur le domaine C2 de NEDD4L défavorise l'interaction entre le domaine C2 et le domaine HECT. Une fois activée, les différents domaines WW de NEDD4L sont capables de reconnaitre des cibles cytoplasmiques. La protéine NEDD4L est également capable de se relocaliser au niveau de la membrane plasmique, où elle peut s'attacher à l'IP3 du groupement PIP2 contenu dans la membrane et ainsi cibler ses substrats proches de la membrane ou membranaires (Figure 64).

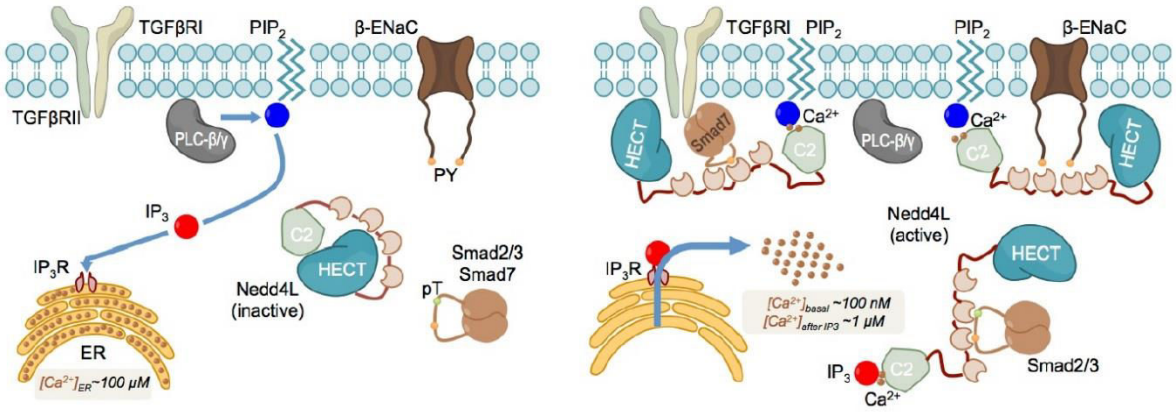


Figure 64 : Modèle de la modulation de l'activité de NEDD4L.

(D'après Escobedo et al. 2014)

Dans notre modèle décrivant les conséquences des mutations dans le domaine HECT, nous proposons que les mutations entrainent un changement de conformation qui favorise la transition vers un état ouvert et actif de NEDD4L.

Il est donc possible d'imaginer que les protéines mutées, présentant constitutivement une conformation ouverte, peuvent être activées à la membrane de manière totalement indépendante de la production d'IP3 et réguler l'ubiquitination de nombreux substrats membranaires ou proches de la membrane. Cette différence pourrait expliquer la dérégulation de la voie PI3K-AKT observée uniquement dans le cas des mutants car des effecteurs essentiels de cette voie tels que PTEN sont principalement localisés à la membrane. A l'inverse, la distribution de la protéine sauvage, même en excès, resterait sous contrôle de la production d'IP3 et n'aurait pas d'effet majeur sur la voie PI3K-AKT mais pourrait répondre de manière plus sensible à la production d'IP3 et induire une réponse inadaptée à certains signaux. Il est intéressant de mentionner une nouvelle fois l'étude de Itoh et *coll* sur le rôle de la voie PDK1-AKT dans la migration neuronale (Itoh et al. 2016). Dans cette étude, les auteurs réalisent, par électroporation *in utero*, la surexpression de Akt1 sauvage et la surexpression de AKT1 constitutivement active dans les progéniteurs neuronaux du cortex. La forme constitutivement active correspond au replacement du domaine PH (*Pleckstrin homology*) par une séquence de myristoylation qui permet son attachement constitutif à la membrane. De manière intéressante ils observent des différences majeures entre les deux conditions. La surexpression de AKT1 sauvage entraine une augmentation de la vitesse de locomotion tandis que l'inverse se produit pour l'excès de AKT1 constitutivement active. Ces résultats renforcent un peu plus l'idée qu'une régulation spatio-temporelle de l'activité d'ubiquitination de NEDD4L, comme cela semble être le cas pour la régulation de l'activité kinase de AKT, permettrait aux neurones de répondre de manière ajustée aux changements de signaux extracellulaires afin d'atteindre leur destination finale dans le cortex en développement.

B. KIF2A, classification des MDC et ciliogenèse

1. Une classification des MDC basée sur les processus biologiques affectés

Comme nous l'avons abordé dans l'introduction, les MDC sont traditionnellement classées sur la base des processus biologiques susceptibles d'être affectés. Ces principaux processus du développement cortical sont la prolifération des progéniteurs, la migration neuronale et la mise en place de la lamination corticale. Dans cette classification, les malformations secondaires à des défauts de prolifération des progéniteurs (ou de la balance entre prolifération et apoptose) incluent les microcéphalies et les mégalencéphalies. Les malformations dues à des altérations dans les processus de migration neuronale et de l'organisation corticale comprennent généralement les anomalies de la

gyration corticale (spectre de lissencéphalies, polymicrogyrie) et les hétérotopies (hétérotopie laminaire sous-corticale, lissencéphalie type II).

Une grande majorité des gènes identifiés comme responsables de microcéphalies jusqu'à maintenant codent pour des protéines centrosomales ou du fuseau mitotique, dont la perturbation de la fonction serait responsable de la dérégulation de la division cellulaire. D'autre part, les gènes responsables d'anomalies de la gyration et d'hétérotopies sont principalement susceptibles de causer des défauts de la migration neuronale en perturbant la stabilité des microtubules et le trafic intracellulaire dépendant des microtubules ou en altérant l'intégrité de la membrane piale et les interactions avec la matrice extracellulaire.

Cependant, à mesure que de nouveaux gènes sont identifiés et qu'un nombre croissant d'études montrent la présence de plusieurs malformations distinctes chez un même patient, l'hypothèse proposant un modèle "un gène/un mécanisme biologique/une malformation" est de plus en plus remise en question.

1.1 Un gène - une malformation?

Au cours des dernières années, des études sur des cohortes de patients présentant des microcéphalies ont révélé que les frontières entre des maladies de la prolifération, de la migration neuronale et de l'organisation corticale étaient plus étroites que suggéré auparavant. En effet, l'identification de mutations dans le gène WDR62 (qui est une des causes génétiques les plus communes de microcéphalie) et leur implication dans un large spectre de malformations, y compris des pachygyries, des lissencéphalies et des polymicrogyries, ont permis de soutenir l'hypothèse que les gènes associés à des MDC mènent à des défauts neurodéveloppementaux qui combinent des dérégulations de la prolifération et de la migration neuronale (Bilgüvar et al., 2010). Au cours de ces travaux de thèse, nous avons mis en évidence des mutations dans les gènes *KIF5C*, *KIF2A*, *DYNC1H1* et *TUBG1* dans un large spectre de MDC (Poirier et al. 2013). En particulier, des mutations dans *DYNC1H1* sont responsables d'un large spectre de malformations corticales caractérisées principalement par des pachygyries postérieures. Certains des patients présentent des anomalies supplémentaires, incluant des microcéphalies, des hétérotopies nodulaires, des hypoplasies du corps calleux et des dysmorphies des ganglions de la base. Cependant, le résultat le plus surprenant fut la présence concomitante chez deux patients de pachygyries et de polymicrogyries, qui sont traditionnellement considérées comme deux malformations distinctes. Ces données sont venues renforcer l'idée qu'un même gène peut être impliqué dans de multiples étapes du développement cortical soulignant les différences de phénotypes observables pour des mutations dans un même gène.

1.2 Une fonction - un mécanisme - une malformation?

Comme nous l'avons mentionné, les gènes impliqués dans les microcéphalies codent principalement pour des protéines centrosomales ou du fuseau mitotique. En conséquence, de nombreuses études fonctionnelles ont été réalisées pour déterminer les conséquences des mutations dans ces gènes sur la prolifération des progéniteurs neuronaux. Que ce soit des altérations de la longueur du cycle cellulaire, des modifications de l'orientation du fuseau mitotique, ou un retard dans la progression de la mitose menant à la mort cellulaire, l'ensemble de ces dérégulations semblent mener à une réduction du nombre de progéniteurs neuronaux. Cette réduction de la population de progéniteurs neuronaux est généralement associée à un appauvrissement du nombre de neurones produit, ce qui serait à l'origine d'un cerveau de taille réduite. Il est intéressant de noter que les fonctions de ces protéines dans les processus post-mitotiques sont encore très peu étudiées. Le couplage entre le centrosome et le réseau de microtubules est crucial pour la locomotion des neurones, il est donc facile d'imaginer que des mutations dans des protéines centrosomales puissent entrainer des défauts de la migration neuronale. Un des rares exemples renforçant cette idée concerne le gène *CENPJ* pour lequel il a été montré que, en plus de dérégulations dans la prolifération des progéniteurs, la diminution de l'expression de *CENPJ* entraine des défauts de la migration neuronale conséquents à un mauvais positionnement du centrosome dans les neurones en migration (Garcez et al., 2015). Les autres gènes codant pour des protéines du centrosome et associés à des microcéphalies avec de multiples malformations corticales associées, tel que *WDR62*, pourraient également être impliqués dans des processus post-mitotiques semblables. Dans ce cas, il serait possible d'imaginer que les cellules qui échappent aux défauts primaires de mitose pourraient ensuite être incapables de d'achever leur migration suite à une dérégulation secondaire dans la nucléokinèse ou dans l'extension du processus antérieur.

De la même manière, il est généralement admis que les anomalies de la gyration sont secondaires à des défauts dans le processus de migration neuronale et par conséquent les effets au niveau de la prolifération sont peu évalués. En particulier, l'expression spécifique dans les neurones post-mitotiques des protéines DCX et TUBB3, respectivement responsables principalement de lissencéphalies et de pachygyries, laissaient suggérer que des mutations dans ces protéines causeraient des altérations uniquement dans les processus mitotiques. Cependant, nous avons montré que la diminution de l'expression de TUBB3 par électroporation *in utero* entraine, en plus des défauts de migration neuronale, une dérégulation de la prolifération des progéniteurs intermédiaires. Nous avons proposé un modèle dans lequel les neurones bloqués qui s'accumulent entre la SVZ et la IZ pourraient établir des contacts avec les progéniteurs intermédiaires et réguler négativement leur prolifération (voir Résultats article 4, Saillour et al. 2014) (Figure 65).

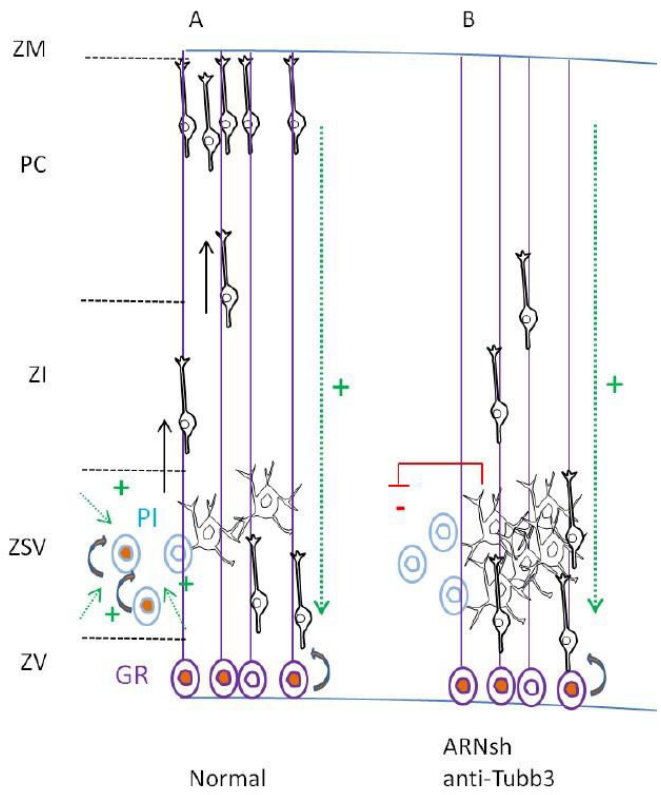


Figure 65 : Modèle de la régulation croisée entre le positionnement neuronal et la prolifération des progéniteurs neuronaux.

(A) Dans les conditions normales, les cellules gliales radiaires (GR) et les progéniteurs intermédiaires (PI) des zones ventriculaires et sous-ventriculaire (ZV et ZSV) produisent les neurones qui vont migrer à travers la zone intermédiaire (ZI) pour atteindre leur destination dans la plaque corticale (PC). (B) La diminution de l'expression de TUBB3 durant le développement cortical entraine un défaut de la migration neuronale et une accumulation des neurones dans la ZSV. Les neurones ainsi bloqués seraient à l'origine d'un signal négatif sur la prolifération des PI. (D'après Saillour et al. 2014)

Une contribution d'un défaut de prolifération des progéniteurs dans les lissencéphalies et les pachygyries a aussi été observée dans le cadre de nos études concernant les mutations dans le gène *KIF2A* chez des patients présentant comme phénotype principal et commun des anomalies de la gyration (Poirier et al. 2013). Nos explorations fonctionnelles ont dans un premier temps montré que KIF2A est exprimée dans les zones prolifératives et dans les neurones du cortex, ce qui laissait suggérer une fonction de KIF2A dans la prolifération et les processus post-mitotiques. Les explorations *in vivo* des conséquences de l'expression de mutants KIF2A responsables de MDC ont permis de mettre en évidence des défauts neurodéveloppementaux qui combinent des dérégulations de la prolifération et de la migration neuronale. Au final, nos données renforcent donc l'idée que les gènes associés aux MDC sont impliqués à plusieurs stades du développement et que la prolifération et la migration sont génétiquement et fonctionnellement interdépendants.

2. Couplage cil primaire et cycle cellulaire et régulation de la neurogenèse

Nos analyses cellulaires dans les fibroblastes d'un patient porteur à l'état hétérozygote de la mutation p.His321Asp dans le gène *KIF2A*, responsable d'une pachygyrie à prédominance postérieure avec microcéphalie, ont permis de révéler une localisation anormale de KIF2A dans le cil primaire associée à un appauvrissement au niveau du corps basal. De plus, les analyses du nombre de fibroblastes présentant un cil après 24h de culture sans sérum (cellules quiescentes) permettant l'induction du cil primaire montre un plus grand nombre de cellules ciliées. Ces données semblent donc suggérer que la forme mutée de KIF2A associée à des MDC perturbe la fonction de KIF2A dans la ciliogenèse.

2.1 Le rôle des kinésines à activité microtubule dépolymérase dans le désassemblage du cil primaire

La famille des kinésines-13 chez l'homme comprend les protéines KIF2A, KIF2B, KIF2C/MCAK et KIF24, qui ont toutes en commun d'avoir une activité microtubule dépolymérase dépendante de l'ATP. KIF24 fut la première kinésine de cette famille à être impliquée dans la régulation de la ciliogenèse. En effet, Kobayashi et *coll* ont caractérisé KIF24 comme une kinésine centriolaire capable de réprimer une ciliogenèse inappropriée dans les cellules en prolifération, par stabilisation de CP110 au niveau de la partie distale des centrioles mères et par le remodelage des microtubules centriolaires via son activité microtubule dépolymérase (Kobayashi et al., 2011). Plus récemment, Miyamoto et *coll* ont décrit le rôle crucial de KIF2A dans le désassemblage du cil primaire après stimulation par des facteurs de croissance (Miyamoto et al. 2015). Les auteurs montrent que l'activité microtubule dépolymérase de KIF2A est nécessaire au désassemblage du cil primaire permettant aux cellules quiescentes d'entrer dans le cycle cellulaire et également pour la répression d'une ciliogenèse aberrante pendant le cycle cellulaire. Cependant le mécanisme du désassemblage du cil primaire dépendant de l'activité microtubule dépolymérase de KIF2A reste non élucidé. Cette étude, combinée à nos données, montrent que KIF2A se localise principalement au niveau du corps basal du cil primaire dans les cellules en interphase et en particulier au niveau des appendices sub-distaux du centriole mère. Cependant, les appendices sub-distaux ne semblent pas être la région la plus pertinente pour expliquer la dépolymérisation des microtubules permettant le désassemblage du cil primaire sachant qu'il ne s'agit pas de la région où se localisent les extrémités des microtubules de l'axonème (Figure 66). Récemment, une étude a montré que les appendices sub-distaux sont plutôt impliqués dans l'accrochage des microtubules cytoplasmiques au corps basal régulant ainsi leur stabilisation (Veleri et al., 2014). Des observations permettant de mieux comprendre le mécanisme de désassemblage pourrait provenir du modèle Chlamydomonas. Chez Chlamydomonas, la diminution de l'expression de la kinésine-13 (il n'existe qu'une seule kinésine-13 chez Chlamydomonas) mène à des cils plus courts suite à un assemblage plus lent (Piao et al., 2009; Wang et al., 2013). Des observations complémentaires ont

suggéré la possibilité que la kinésine-13 contribue à la régulation du désassemblage indirectement par dépolymérisation des microtubules cytoplasmiques au niveau du corps basal afin de produire des tubulines solubles pouvant être transportées dans le cil primaire (Piao et al., 2009; Wang et al., 2013). Cette hypothèse est en accord avec une étude suggérant qu'une augmentation du niveau de tubuline soluble dans le cytoplasme est associée à une augmentation de la taille du cil primaire (Sharma et al., 2011). D'autre part, deux études chez Chlamydomonas et Tetrahymena montrent que la kinésine-13 est capable de se déplacer dans le cil durant l'assemblage et le désassemblage du cil et serait capable de réguler la quantité et la qualité (modifications post-traductionnelles) des tubulines dans le cil (Piao et al., 2009; Vasudevan et al., 2014).

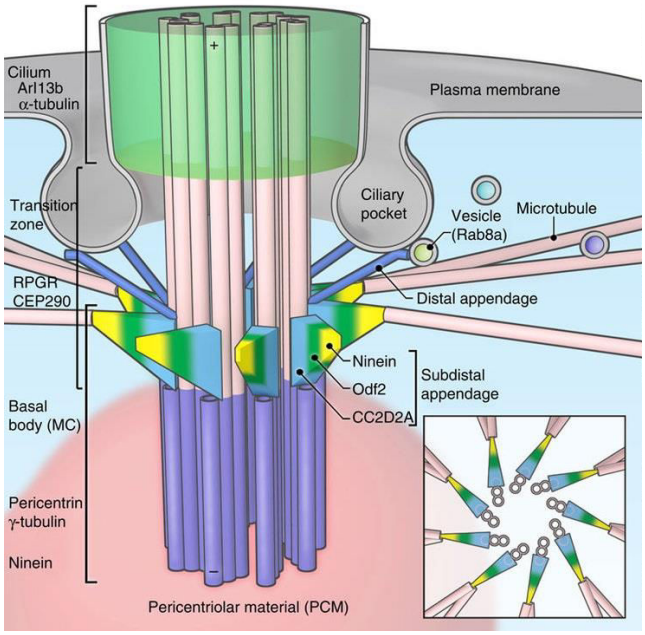


Figure 66 : Schéma représentatif de la base du cil primaire.

Le centriole mère correspond à des triplets de microtubules (cylindres violets) qui continuent à l'état de doublets et forment les microtubules de l'axonème (cylindres roses). Les cônes de couleurs (jaune-vert-bleu) représentent les appendices sub-distaux tandis que les tiges bleues représentent les appendices distaux. Les appendices sub-distaux permettent l'accrochage des microtubules cytoplasmiques (roses) et régulent ainsi le transport de vésicules vers la base du cil primaire. Les appendices distaux jouent un rôle dans le lien entre le centriole mère et la membrane plasmique. (D'après Veleri et al. 2014)

Au vu de ces observations, l'altération de la localisation de KIF2A mutée au niveau du corps basal du cil primaire entrainerait une dérégulation de l'afflux en tubulines cytoplasmiques au niveau du cil primaire et perturberait ainsi la ciliogenèse. De plus, nous observons une forte localisation de KIF2A dans l'ensemble du cil primaire, ce qui ne semble pas encore décrit dans les cellules mammifères. Cette relocalisation pourrait donc avoir une influence directement sur les microtubules axonemaux plutôt qu'une action de KIF2A sur les microtubules cytoplasmique.

Dans un premier temps, il est donc envisagé d'étudier plus précisément la localisation de KIF2A dans les cellules ciliées par microscopie à haute résolution. Ensuite, afin de mieux comprendre les effets des mutations dans KIF2A sur le désassemblage du cil primaire dans les fibroblastes de patients, il sera nécessaire d'étudier le nombre de cellules ciliées et la longueur des cils à différentes heures après stimulation de cellules quiescentes par des facteurs de croissance permettant leur entrée dans le cycle cellulaire.

2.2 Le couplage entre le désassemblage du cil primaire et la progression dans le cycle cellulaire dans les progéniteurs neuronaux

Bien qu'il ait été montré que la ciliogenèse asynchrone par héritage asymétrique de la membrane du cil au niveau des cellules gliales radiaires semble définir le destin cellulaire, le rôle précis du cil primaire dans les progéniteurs neuronaux reste à définir. Les souris KO conditionnelles (délétions dans les populations de progéniteurs Nestin ou GFAP) pour KIF3A et IFT88 (*intraflagellar transport 88*), qui sont des protéines essentielles pour la formation du cil primaire ne semblent pas présenter de défaut majeur du développement du cerveau (Tong et al., 2014). Cependant, l'absence de cil primaire peut avoir des conséquences très différentes de la dérégulation du cycle d'assemblage et de désassemblage du cil primaire régulant la progression dans le cycle cellulaire.

Même si certains mécanismes permettant le désassemblage du cil primaire commencent à être décrits, le lien entre le désassemblage et la progression dans le cycle cellulaire est très peu connu. Des expériences dans des cultures de cellules mammifères suggèrent que le désassemblage du cil primaire survient de manière biphasique, avec une première vague de désassemblage ayant lieu en G1 après stimulation par des facteurs de croissance et en G2 juste avant l'entrée en mitose (Figure 67).

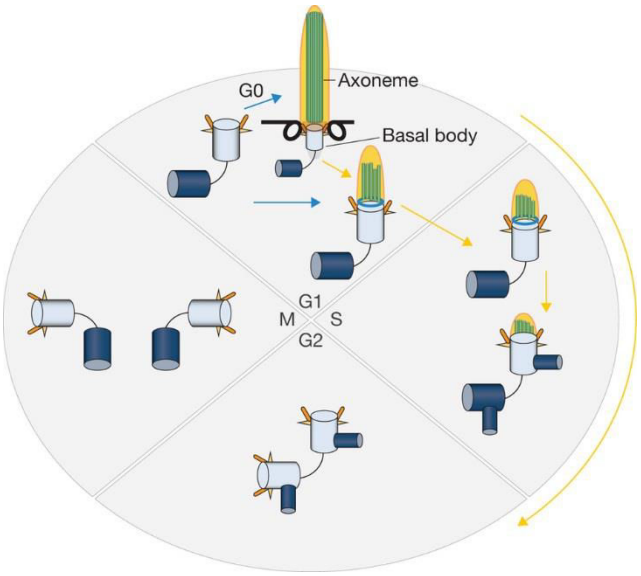


Figure 67 : Couplage de la ciliogenèse avec le cycle cellulaire.

(D'après Sánchez & Dynlacht 2016)

Deux protéines exprimées dans les cellules gliales radiaires ont été étudiées pour leur rôle dans la phase de désassemblage du cil primaire en G1. Dans un premiers cas, Sung et *coll* ont observé que Tctex-1, qui correspond à la chaine légère de la dynéine cytoplasmique est nécessaire à la transition de la phase G1 vers la phase S par régulation du désassemblage du cil primaire dans des cellules en culture (Li et al., 2011). Les auteurs ont ensuite montré que Tctex-1 est localisée au niveau de la zone de transition du cil primaire dans les cellules gliales radiaires et que sa délétion entraine une sortie du cycle cellulaire et une différenciation précoce des cellules gliales. Ces données laissent donc suggérer qu'un allongement de la phase G1 par défaut d'entrée dans la phase S conséquent à une dérégulation du désassemblage du cil primaire pourrait réguler la balance entre prolifération et différenciation des cellules gliales radiaires. Un deuxième exemple provient de la protéine centrosomale NDE1, qui pour rappel a été identifiée dans des cas de microcéphalie chez l'homme. En culture cellulaire, la délétion de NDE1 entraine une augmentation de la longueur du cil primaire et résulte en un retard dans les phases G1/S (Kim et al., 2011). En parallèle, une étude de la délétion de NDE1 dans les cellules gliales radiaires a suggéré que l'arrêt des cellules au niveau la transition G1/S est associé à une augmentation de la longueur du cil primaire, ce qui semble conforter l'idée d'un rôle du couplage entre le désassemblage du cil et la progression de la phase G1 vers la phase S (Doobin et al., 2016).

A l'inverse, aucune étude ne semble montrer l'implication du désassemblage du cil primaire en fin de G2 permettant l'entrée en mitose dans les progéniteurs neuronaux. Cependant, il est intéressant de noter que l'activité microtubule dépolymérase de KIF24 est augmentée via sa phosphorylation par NEK2 (Kim et al., 2015). NEK2 est une sérine/thréonine kinase exprimée durant les phases S et G2 du

cycle et semble permettre de prévenir le réassemblage du cil primaire durant la phase G2 en activant KIF24. En parallèle, l'activité dépolymérase de KIF2A est également régulée par une kinase durant le cycle cellulaire. En effet, la kinase PLK1, qui est exprimée durant les phases G2/M phosphoryle KIF2A afin d'augmenter son activité microtubule polymérase (Miyamoto et al. 2015). Le fait que ces deux kinésines impliquées dans la régulation du désassemblage du cil primaire soient régulées par des kinases exprimées de manière différentielle durant le cycle cellulaire constitue un argument supplémentaire en faveur du rôle joué par la régulation du désassemblage du cil primaire dans la progression dans le cycle cellulaire.

Par la suite, il sera donc pertinent d'évaluer les conséquences des mutations dans KIF2A sur le couplage entre la ciliogenèse et la progression dans le cycle cellulaire par des approches cellulaires et durant le développement par électroporation *in utero*. En culture cellulaire, il sera intéressant de suivre la dynamique du cil primaire en fonction des différentes phases du cycle cellulaire (par exemple par transfection des cellules avec les constructions FUCCI (*Fluorescence ubiquitination cell cycle indicator*) par vidéomicroscopie. Par électroporation *in utero*, la quantification des cellules gliales radiaires électroporées présentant un cil primaire selon les différentes phases du cycle, détectées par des marqueurs de chaque phase (par exemple Cycline D1 et B1), permettrait d'éclaircir le rôle joué par KIF2A dans la régulation de la prolifération des progéniteurs.

2.3 L'émergence du rôle du sytème ubiquitine/protéasome dans la régulation de la ciliogenèse

De plus en plus d'études mettent en évidence le rôle du système ubiquitine/protéasome (UPS) dans la ciliogenèse et dans son couplage avec le cycle cellulaire (Figure 68) (Izawa et al., 2015).

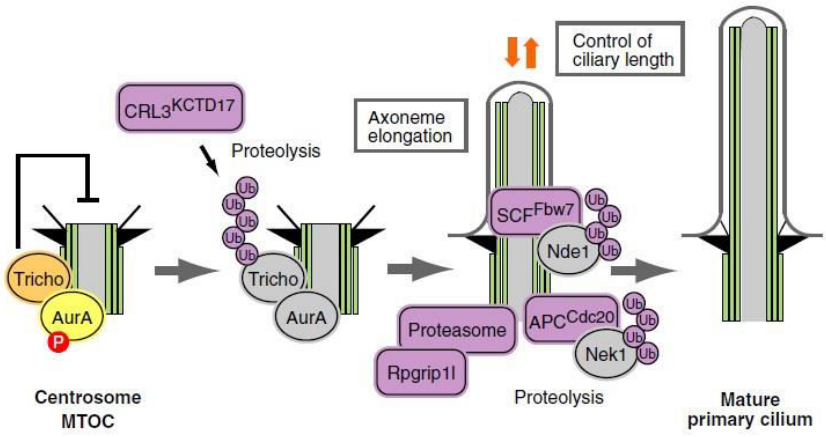


Figure 68 : Principaux composants du système ubiquitine/protéasome impliqués dans le contrôle de la ciliogenèse dépendant du cycle cellulaire.

(D'après Izawa et al. 2015)

L'un des exemples les plus marquants est la régulation de la dégradation par le protéasome de la protéine centrosomale impliquée dans les MDC, NDE1. Comme nous l'avons abordé précédemment, NDE1 est un régulateur négatif de la longueur du cil primaire (Kim et al. 2011). Maskey et *coll* ont reporté récemment que des mécanismes dépendants du cycle cellulaire peuvent contrôler la longueur du cil primaire via la voie CDK5-FBW7-NDE1 (Maskey et al., 2015). En effet, FBW7 (*F-box and WD40 repeat domain-containing 7*) est une E3 ubiquitine ligase qui régule la dégradation de NDE1 pour maintenir un faible niveau de NDE1 durant les phases G1 et G0, ce qui permet au cil primaire de se former et de fonctionner correctement. CDK5, une kinase active durant les phases G0 et G1, est responsable de la phosphorylation de NDE1 permettant le recrutement de FBW7.

Ce système de régulation dépendant de l'UPS a également été proposé pour KIF2A. Miyamoto et *coll* ont d'abord observé que KIF2A est plus faiblement exprimée durant la phase G0 que durant les phases de prolifération (Miyamoto et. 2015). Ces différences d'expression sont en fait la conséquence d'une reconnaissance et d'une polyubiquitination de KIF2A par la E3 ubiquitine ligase APC/C (*Anaphase-promoting complex/cyclosome)* durant la phase G0, ce qui induit sa dégradation et ainsi permet la formation du cil primaire. Ces données renforcent encore un peu plus le lien très étroit existant entre la ciliogenèse et la progression dans le cycle cellulaire via l'implication de l'UPS.

C. Hypothèse unificatrice des mécanismes physiopathologiques

Le cil primaire est une structure critique pour la régulation de nombreuses voies de signalisation durant le développement du cortex. Les voies TGFβ et PI3K-AKT-mTOR sont régulées par de nombreux facteurs extracellulaires intégrés au niveau du cil primaire. Les récepteurs TGFβ-RI et TGFβ-RII sont localisés à la base du cil primaire. La fixation du ligand sur ces récepteurs induit la phosphorylation et l'activation de SMAD2/3, également à la base du cil primaire, permettant la réponse à la voie TGFβ. LKB1 (*Liver kinase B1*), un régulateur négatif de la voie mTOR, est localisée au niveau du cil primaire et son activation, par exemple via une déformation du cil primaire, mène à l'inhibition de la signalisation mTOR. Il est suggéré que NEDD4L est localisée au niveau du cil primaire (données non publiées), il serait donc particulièrement intéressant de déterminer si NEDD4L joue un rôle dans la régulation de la ciliogenèse via l'UPS, ce qui pourrait être à l'origine ou contribuer à la dérégulation des voies de signalisation mTOR-AKT et TGFβ-Smad2/3.

Nous avons également observé une accumulation anormale de la protéine membranaire Smo (*Smoothened*) au niveau du cil primaire des fibroblastes de patients porteurs de mutations dans le gène *TUBB3* et responsables de MDC. Ces données laissent suggérer une dérégulation dans la

transduction de la signalisation *Sonic Hedgehog* dépendante du cil primaire dans la pathogenèse des MDC causées par des mutations dans *TUBB3*.

Dans le cas du gène *KIF2A*, nous avons décrit des défauts de la ciliogenèse dans les fibroblastes de patient porteur d'une mutation identifiée dans un cas de MDC. Il sera donc intéressant par la suite d'évaluer les conséquences des défauts de ciliogenèse sur la transduction des signaux cellulaires dépendant du cil primaire.

Même si des études supplémentaires sont requises pour renforcer cette hypothèse, l'ensemble de ces données nous permet de proposer une hypothèse unificatrice dans laquelle un grand nombre de MDC pourraient être causé par des mécanismes physiopathologiques communs impliquant des altérations de la ciliogenèse et des voies de signalisation dépendantes du cil primaire.

BIBLIOGRAPHIE

Aaku-Saraste, E., Hellwig, A., and Huttner, W.B. (1996). Loss of Occludin and Functional Tight Junctions, but Not ZO-1, during Neural Tube Closure—Remodeling of the Neuroepithelium Prior to Neurogenesis. Dev. Biol. *180*, 664–679.

Aaku-Saraste, E., Oback, B., Hellwig, A., and Huttner, W.B. (1997). Neuroepithelial cells downregulate their plasma membrane polarity prior to neural tube closure and neurogenesis. Mech. Dev. *69*, 71–81.

Adachi, Y., Poduri, A., Kawaguch, A., Yoon, G., Salih, M.A., Yamashita, F., Walsh, C.A., and Barkovich, A.J. (2011). Congenital microcephaly with a simplified gyral pattern: Associated findings and their significance. Am. J. Neuroradiol. *32*, 1123–1129.

Alcamo, E.A., Chirivella, L., Dautzenberg, M., Dobreva, G., Fariñas, I., Grosschedl, R., and McConnell, S.K. (2008). Satb2 Regulates Callosal Projection Neuron Identity in the Developing Cerebral Cortex. Neuron *57*, 364–377.

Alcantara, D., and O'Driscoll, M. (2014). Congenital microcephaly. Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet. *166*, 124–139.

Alexandre, P., Reugels, A.M., Barker, D., Blanc, E., and Clarke, J.D.W. (2010). Neurons derive from the more apical daughter in asymmetric divisions in the zebrafish neural tube. Nat. Neurosci. *13*, 673–679.

Andrews, W.D., Barber, M., and Parnavelas, J.G. (2007). Slit-Robo interactions during cortical development. In Journal of Anatomy, pp. 188–198.

Antony, J.M., Paquin, A., Nutt, S.L., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2011). Endogenous microglia regulate development of embryonic cortical precursor cells. J. Neurosci. Res. *89*, 286–298.

Arai, Y., Funatsu, N., Numayama-Tsuruta, K., Nomura, T., Nakamura, S., and Osumi, N. (2005). Role of Fabp7, a downstream gene of Pax6, in the maintenance of neuroepithelial cells during early embryonic development of the rat cortex. J. Neurosci. *25*, 9752–9761.

Arai, Y., Pulvers, J.N., Haffner, C., Schilling, B., Nüsslein, I., Calegari, F., and Huttner, W.B. (2011). Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. Nat. Commun. *2*, 154.

Arlotta, P., Molyneaux, B.J., Chen, J., Inoue, J., Kominami, R., and MacKlis, J.D. (2005). Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. Neuron *45*, 207–221.

Asami, M., Pilz, G.A., Ninkovic, J., Godinho, L., Schroeder, T., Huttner, W.B., and Götz, M. (2011). The role of Pax6 in regulating the orientation and mode of cell division of progenitors in the mouse cerebral cortex. Development *138*, 5067–5078.

Assadi, A.H., Zhang, G., Beffert, U., McNeil, R.S., Renfro, A.L., Niu, S., Quattrocchi, C.C., Antalffy, B. a, Sheldon, M., Armstrong, D.D., et al. (2003). Interaction of reelin signaling and Lis1 in brain development. Nat. Genet. *35*, 270–276.

Attardo, A., Calegari, F., Haubensak, W., Wilsch-Bräuninger, M., and Huttner, W.B. (2008). Live imaging at the onset of cortical neurogenesis reveals differential appearance of the neuronal phenotype in apical versus basal progenitor progeny. PLoS One *3*.

Ayala, R., Shu, T., and Tsai, L.H. (2007a). Trekking across the Brain: The Journey of Neuronal Migration. Cell *128*, 29–43.

Ayala, R., Shu, T., and Tsai, L.H. (2007b). Trekking across the Brain: The Journey of Neuronal Migration. Cell *128*, 29–43.

Badouel, C., Zander, M., Liscio, N., Bagherie-Lachidan, M., Sopko, R., Coyaud, E., Raught, B., Miller, F., and McNeill, H. (2015). Fat1 interacts with Fat4 to regulate neural tube closure, neural progenitor proliferation and apical constriction during mouse brain development. Development dev.123539 – .

Baek, S.T., Copeland, B., Yun, E.-J., Kwon, S.-K., Guemez-Gamboa, A., Schaffer, A.E., Kim, S., Kang, H.-C., Song, S., Mathern, G.W., et al. (2015). An AKT3-FOXG1-reelin network underlies defective migration in human focal malformations of cortical development. Nat. Med. *21*, 1445–1454.

Bahi-Buisson, N., and Guerrini, R. (2013). Diffuse malformations of cortical development. Handb. Clin. Neurol. *111*, 653–665.

Bahi-Buisson, N., Poirier, K., Boddaert, N., Fallet-Bianco,

C., Specchio, N., Bertini, E., Caglayan, O., Lascelles, K., Elie, C., Rambaud, J., et al. (2010). GPR56-related bilateral frontoparietal polymicrogyria: Further evidence for an overlap with the cobblestone complex. Brain *133*, 3194–3209.

Bai, J., Ramos, R.L., Ackman, J.B., Thomas, A.M., Lee, R. V, and LoTurco, J.J. (2003). RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. Nat Neurosci *6*, 1277–1283.

Ballif, B.A., Arnaud, L., Arthur, W.T., Guris, D., Imamoto, A., and Cooper, J.A. (2004). Activation of a Dab1/CrkL/C3G/Rap1 pathway in Reelin-stimulated neurons. Curr. Biol. *14*, 606–610.

Barber, M., Arai, Y., Morishita, Y., Vigier, L., Causeret, F., Borello, U., Ledonne, F., Coppola, E., Contremoulins, V., Pfrieger, F.W., et al. (2015). Migration speed of Cajal-Retzius cells modulated by vesicular trafficking controls the size of higher-order cortical areas. Curr. Biol. *25*, 2466–2478.

Barkovich, A.J., Guerrini, R., Kuzniecky, R.I., Jackson, G.D., and Dobyns, W.B. (2012). A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: Update 2012. Brain *135*, 1348–1369.

Barkovich, A.J Kuzniecky, Jackson, G.D Guerrini, Dobyns, W.. (2005). A developmental and genetic classification for malformation sof cortical development. Neurology *65*, 1873–1887.

Barnes, A.P., and Polleux, F. (2009). Establishment of Axon-Dendrite Polarity in Developing Neurons. Annu. Rev. Neurosci. *32*, 347–381.

Barzik, M., Kotova, T.I., Higgs, H.N., Hazelwood, L., Hanein, D., Gertler, F.B., and Schafer, D.A. (2005). Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. J. Biol. Chem. *280*, 28653–28662.

Baudoin, J.P., Viou, L., Launay, P.S., Luccardini, C., Espeso Gil, S., Kiyasova, V., Irinopoulou, T., Alvarez, C., Rio, J.P., Boudier, T., et al. (2012). Tangentially Migrating Neurons Assemble a Primary Cilium that Promotes Their Reorientation to the Cortical Plate. Neuron *76*, 1108–1122.

Bechstedt, S., Lu, K., and Brouhard, G.J. (2014). Doublecortin recognizes the longitudinal curvature of the microtubule end and lattice. Curr. Biol. *24*, 2366–2375.

Beffert, U., Morfini, G., Bock, H.H., Reyna, H., Brady, S.T., and Herz, J. (2002). Reelin-mediated signaling locally regulates protein kinase B/Akt and glycogen synthase kinase 3β. J. Biol. Chem. *277*, 49958–49964.

Belvindrah, R., Graus-Porta, D., Goebbels, S., Nave, K.-A., and Müller, U. (2007). Beta1 integrins in radial glia but not in migrating neurons are essential for the formation of cell layers in the cerebral cortex. J. Neurosci. *27*, 13854–13865.

Del Bene, F., Wehman, A.M., Link, B.A., and Baier, H. (2008). Regulation of Neurogenesis by Interkinetic Nuclear Migration through an Apical-Basal Notch Gradient. Cell *134*, 1055–1065.

Bengoa-Vergniory, N., and Kypta, R.M. (2015). Canonical and noncanonical Wnt signaling in neural stem/progenitor cells. Cell. Mol. Life Sci. *72*, 4157–4172.

Bentley, D., and Toroian-Raymond, A. (1986). Disoriented pathfinding by pioneer neurone growth cones deprived of filopodia by cytochalasin treatment. Nature *323*, 712–715.

Bielle, F., Griveau, A., Narboux-Nême, N., Vigneau, S., Sigrist, M., Arber, S., Wassef, M., and Pierani, A. (2005). Multiple origins of Cajal-Retzius cells at the borders of the developing pallium. Nat. Neurosci. *8*, 1002–1012.

Bilgüvar, K., Oztürk, A.K., Louvi, A., Kwan, K.Y., Choi, M., Tatli, B., Yalnizoğlu, D., Tüysüz, B., Cağlayan, A.O., Gökben, S., et al. (2010). Whole-exome sequencing identifies recessive WDR62 mutations in severe brain malformations. Nature *467*, 207–210.

Bizzotto, S., and Francis, F. (2015). Morphological and functional aspects of progenitors perturbed in cortical malformations. Front. Cell. Neurosci. *9*, 30.

Bock, H.H., and May, P. (2016). Canonical and Non-canonical Reelin Signaling. Front. Cell. Neurosci. *10*, 166.

Bock, H.H., Jossin, Y., Liu, P., Förster, E., May, P., Goffinet, A.M., and Herz, J. (2003). Phosphatidylinositol 3-kinase interacts with the adaptor protein Dab1 in response to reelin signaling and is required for normal cortical lamination. J. Biol. Chem. *278*, 38772–38779.

Bockaert, J., and Marin, P. (2015). mTOR in Brain

Physiology and Pathologies. Physiol. Rev. *95*, 1157–1187.

Bond, J., Roberts, E., Springell, K., Lizarraga, S.B., Lizarraga, S., Scott, S., Higgins, J., Hampshire, D.J., Morrison, E.E., Leal, G.F., et al. (2005). A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size. Nat. Genet. *37*, 353–355.

Breitsprecher, D., Kiesewetter, A.K., Linkner, J., Vinzenz, M., Stradal, T.E.B., Small, J.V., Curth, U., Dickinson, R.B., and Faix, J. (2011). Molecular mechanism of Ena/VASP-mediated actin-filament elongation. EMBO J. *30*, 456–467.

Breuss, M., and Keays, D.A. (2014). Microtubules and neurodevelopmental disease: the movers and the makers. Adv. Exp. Med. Biol. *800*, 75–96.

Breuss, M., Heng, J.I.T., Poirier, K., Tian, G., Jaglin, X.H., Qu, Z., Braun, A., Gstrein, T., Ngo, L., Haas, M., et al. (2012). Mutations in the β-Tubulin Gene TUBB5 Cause Microcephaly with Structural Brain Abnormalities. Cell Rep. *2*, 1554–1562.

Breuss, M., Fritz, T., Gstrein, T., Chan, K., Ushakova, L., Yu, N., Vonberg, F.W., Werner, B., Elling, U., and Keays, D.A. (2016). Mutations in the murine homologue of TUBB5 cause microcephaly by perturbing cell cycle progression and inducing p53 associated apoptosis. Development 1126–1133.

Britanova, O., de Juan Romero, C., Cheung, A., Kwan, K.Y., Schwark, M., Gyorgy, A., Vogel, T., Akopov, S., Mitkovski, M., Agoston, D., et al. (2008). Satb2 Is a Postmitotic Determinant for Upper-Layer Neuron Specification in the Neocortex. Neuron *57*, 378–392.

Bruce, M.C., Kanelis, V., Fouladkou, F., Debonneville, A., Staub, O., and Rotin, D. (2008). Regulation of Nedd4-2 self-ubiquitination and stability by a PY motif located within its HECT-domain. Biochem. J. *415*, 155–163.

Bultje, R.S., Castaneda-Castellanos, D.R., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Kriegstein, A.R., and Shi, S.H. (2009). Mammalian Par3 Regulates Progenitor Cell Asymmetric Division via Notch Signaling in the Developing Neocortex. Neuron *63*, 189–202.

Bystron, I., Rakic, P., Molnár, Z., and Blakemore, C. (2006). The first neurons of the human cerebral cortex. Nat. Neurosci. *9*, 880–886.

Bystron, I., Blakemore, C., and Rakic, P. (2008). Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. Nat. Rev. Neurosci. *9*, 110–122.

Calegari, F., and Huttner, W.B. (2003). An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. J. Cell Sci. *116*, 4947–4955.

Calegari, F., Haubensak, W., Haffner, C., and Huttner, W.B. (2005). Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development. J. Neurosci. *25*, 6533–6538.

Campbell, K., and Götz, M. (2002). Radial glia: Multi-purpose cells for vertebrate brain development. Trends Neurosci. *25*, 235–238.

Van Campenhout, C.A., Eitelhuber, A., Gloeckner, C.J., Giallonardo, P., Gegg, M., Oller, H., Grant, S.G.N., Krappmann, D., Ueffing, M., and Lickert, H. (2011). Dlg3 Trafficking and apical tight junction formation is regulated by Nedd4 and Nedd4-2 E3 Ubiquitin ligases. Dev. Cell *21*, 479–491.

Cappello, S., Attardo, A., Wu, X., Iwasato, T., Itohara, S., Wilsch-Bräuninger, M., Eilken, H.M., Rieger, M.A., Schroeder, T.T., Huttner, W.B., et al. (2006). The Rho-GTPase cdc42 regulates neural progenitor fate at the apical surface. Nat. Neurosci. *9*, 1099–1107.

Cappello, S., B??hringer, C.R.J., Bergami, M., Conzelmann, K.K., Ghanem, A., Tomassy, G.S., Arlotta, P., Mainardi, M., Allegra, M., Caleo, M., et al. (2012). A Radial Glia-Specific Role of RhoA in Double Cortex Formation. Neuron *73*, 911–924.

Cappello, S., Gray, M.J., Badouel, C., Lange, S., Einsiedler, M., Srour, M., Chitayat, D., Hamdan, F.F., Jenkins, Z. a, Morgan, T., et al. (2013). Mutations in genes encoding the cadherin receptor-ligand pair DCHS1 and FAT4 disrupt cerebral cortical development. Nat. Genet. *45*, 1300–1308.

Carabalona, A., Beguin, S., Pallesi-pocachard, E., Buhler, E., Pellegrino, C., Arnaud, K., Hubert, P., Oualha, M., Siffroi, J.P., Khantane, S., et al. (2012). A glial origin for periventricular nodular heterotopia caused by impaired expression of Filamin-A. Hum. Mol. Genet. *21*, 1004–

1017.

Carabalona, A., Hu, D.J.-K., and Vallee, R.B. (2016). KIF1A inhibition immortalizes brain stem cells but blocks BDNF-mediated neuronal migration. Nat. Neurosci. *19*, 253–262.

Caronia-Brown, G., and Grove, E.A. (2011). Timing of cortical interneuron migration is influenced by the cortical hem. Cereb. Cortex *21*, 748–755.

Carson, R.P., Van Nielen, D.L., Winzenburger, P.A., and Ess, K.C. (2012). Neuronal and glia abnormalities in Tsc1-deficient forebrain and partial rescue by rapamycin. Neurobiol. Dis. *45*, 369–380.

Caspi, M., Atlas, R., Kantor, A., Sapir, T., and Reiner, O. (2000). Interaction between LIS1 and doublecortin, two lissencephaly gene products. Hum. Mol. Genet. *9*, 2205–2213.

Causeret, F., and Pierani, A. (2016). Quand la migration de neurones signalisateurs contrôle la régionalisation du cortex cérébral. Médecine/Science.

Chai, X., Forster, E., Zhao, S., Bock, H.H., and Frotscher, M. (2009). Reelin stabilizes the actin cytoskeleton of neuronal processes by inducing n-cofilin phosphorylation at serine3. J Neurosci *29*, 288–299.

Chai, X., Zhao, S., Fan, L., Zhang, W., Lu, X., Shao, H., Wang, S., Song, L., Failla, A. V., Zobiak, B., et al. (2016). Reelin and cofilin cooperate during the migration of cortical neurons: A quantitative morphological analysis. Development *1*, 1029–1040.

Chang, L., Zhang, Z., Yang, J., McLaughlin, S.H., and Barford, D. (2015). Atomic structure of the APC/C and its mechanism of protein ubiquitination. Nature *522*, 450–454.

Chen, Y., and Hancock, W.O. (2015). Kinesin-5 is a microtubule polymerase. Nat. Commun. *6*, 8160.

Chen, B., Wang, S.S., Hattox, A.M., Rayburn, H., Nelson, S.B., and McConnell, S.K. (2008a). The Fezf2-Ctip2 genetic pathway regulates the fate choice of subcortical projection neurons in the developing cerebral cortex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 11382–11387.

Chen, G., Sima, J., Jin, M., Wang, K.-Y., Xue, X.-J., Zheng, W., Ding, Y.-Q., and Yuan, X.-B. (2008b). Semaphorin-3A guides radial migration of cortical neurons during development. Nat. Neurosci. *11*, 36–44.

Chen, J.-F., Zhang, Y., Wilde, J., Hansen, K.C., Lai, F., and Niswander, L. (2014). Microcephaly disease gene Wdr62 regulates mitotic progression of embryonic neural stem cells and brain size. Nat. Commun. *5*, 3885.

Chenn, A., and McConnell, S.K. (1995). Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of notchl immunoreactivity in mammalian neurogenesis. Cell *82*, 631–641.

Chenn, A., and Walsh, C.A. (2002). Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. Science *297*, 365–369.

Chilton, J.K. (2006). Molecular mechanisms of axon guidance. Dev. Biol. *292*, 13–24.

Ciani, L., Krylova, O., Smalley, M.J., Dale, T.C., and Salinas, P.C. (2004). A divergent canonical WNT-signaling pathway regulates microtubule dynamics: Dishevelled signals locally to stabilize microtubules. J. Cell Biol. *164*, 243–253.

Cloëtta, D., Thomanetz, V., Baranek, C., Lustenberger, R.M., Lin, S., Oliveri, F., Atanasoski, S., and Rüegg, M. a (2013). Inactivation of mTORC1 in the developing brain causes microcephaly and affects gliogenesis. J. Neurosci. *33*, 7799–7810.

Costa, M.R., Wen, G., Lepier, A., Schroeder, T., and Götz, M. (2008). Par-complex proteins promote proliferative progenitor divisions in the developing mouse cerebral cortex. Development *135*, 11–22.

Creppe, C., Malinouskaya, L., Volvert, M.L., Gillard, M., Close, P., Malaise, O., Laguesse, S., Cornez, I., Rahmouni, S., Ormenese, S., et al. (2009). Elongator Controls the Migration and Differentiation of Cortical Neurons through Acetylation of α-Tubulin. Cell *136*, 551–564.

Cunningham, C.L., Martinez-Cerdeno, V., and Noctor, S.C. (2013). Microglia Regulate the Number of Neural Precursor Cells in the Developing Cerebral Cortex. J. Neurosci. *33*, 4216–4233.

D'Arcangelo, G., Miao, G.G., Chen, S.C., Soares, H.D., Morgan, J.I., and Curran, T. (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. Nature *374*, 719–723.

Dave, R.K., Ellis, T., Toumpas, M.C., Robson, J.P., Julian, E., Adolphe, C., Bartlett, P.F., Cooper, H.M., Reynolds, B.A.,

and Wainwright, B.J. (2011). Sonic hedgehog and notch signaling can cooperate to regulate neurogenic divisions of neocortical progenitors. PLoS One *6*.

Davis, T.H., Cuellar, T.L., Koch, S.M., Barker, A.J., Harfe, B.D., McManus, M.T., and Ullian, E.M. (2008). Conditional loss of Dicer disrupts cellular and tissue morphogenesis in the cortex and hippocampus. J. Neurosci. *28*, 4322–4330.

Dehay, C., and Kennedy, H. (2007). Cell-cycle control and cortical development. Nat. Rev. Neurosci. *8*, 438–450.

Delgado-Esteban, M., García-Higuera, I., Maestre, C., Moreno, S., and Almeida, A. (2013). APC/C-Cdh1 coordinates neurogenesis and cortical size during development. Nat. Commun. *4*, 2879.

Derer, P., and Derer, M. (1990). Cajal-retzius cell ontogenesis and death in mouse brain visualized with horseradish peroxidase and electron microscopy. Neuroscience *36*, 839–856.

Desai, A., Verma, S., Mitchison, T.J., and Walczak, C.E. (1999). Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes. Cell *96*, 69–78.

Deuel, T.A.S., Liu, J.S., Corbo, J.C., Yoo, S.Y., Rorke-Adams, L.B., and Walsh, C.A. (2006). Genetic interactions between doublecortin and doublecortin-like kinase in neuronal migration and axon outgrowth. Neuron *49*, 41–53.

Devisme, L., Bouchet, C., Gonzals, M., Alanio, E., Bazin, A., Bessires, B., Bigi, N., Blanchet, P., Bonneau, D., Bonnires, M., et al. (2012). Cobblestone lissencephaly: Neuropathological subtypes and correlations with genes of dystroglycanopathies. Brain *135*, 469–482.

Devreotes, P., and Horwitz, A.R. (2015). Signaling networks that regulate cell migration. Cold Spring Harb Perspect Biol *7*, a005959.

Dhanesh, S.B., Subashini, C., and James, J. (2016). Hes1: the maestro in neurogenesis. Cell. Mol. Life Sci. 1–24.

Dickson, B.J., and Gilestro, G.F. (2006). Regulation of Commissural Axon Pathfinding by Slit and its Robo Receptors. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *22*, 651–675.

Dixon-Salazar, T., Silhavy, J.L., Marsh, S.E., Louie, C.M., Scott, L.C., Gururaj, A., Al-Gazali, L., Al-Tawari, A.A., Kayserili, H., Sztriha, L., et al. (2004). Mutations in the AHI1 gene, encoding jouberin, cause Joubert syndrome with cortical polymicrogyria. Am. J. Hum. Genet. *75*, 979–987.

Dong, Z., Yang, N., Yeo, S.Y., Chitnis, A., and Guo, S. (2012). Intralineage Directional Notch Signaling Regulates Self-Renewal and Differentiation of Asymmetrically Dividing Radial Glia. Neuron *74*, 65–78.

Doobin, D.J., Kemal, S., Dantas, T.J., and Vallee, R.B. (2016). Severe NDE1-mediated microcephaly results from neural progenitor cell cycle arrests at multiple specific stages. Nat Commun *7*.

Draganova, K., Zemke, M., Zurkirchen, L., Valenta, T., Cantù, C., Okoniewski, M., Schmid, M.T., Hoffmans, R., Götz, M., Basler, K., et al. (2015). Wnt/??-catenin signaling regulates sequential fate decisions of murine cortical precursor cells. Stem Cells *33*, 170–182.

Eckler, M.J., Nguyen, T.D., McKenna, W.L., Fastow, B.L., Guo, C., Rubenstein, J.L.R., and Chen, B. (2015). Cux2-Positive Radial Glial Cells Generate Diverse Subtypes of Neocortical Projection Neurons and Macroglia. Neuron *86*, 1100–1108.

Eguren, M., Porlan, E., Manchado, E., García-Higuera, I., Cañamero, M., Fariñas, I., and Malumbres, M. (2013). The APC/C cofactor Cdh1 prevents replicative stress and p53-dependent cell death in neural progenitors. Nat. Commun. *4*, 2880.

Eiraku, M., Watanabe, K., Matsuo-Takasaki, M., Kawada, M., Yonemura, S., Matsumura, M., Wataya, T., Nishiyama, A., Muguruma, K., and Sasai, Y. (2008). Self-Organized Formation of Polarized Cortical Tissues from ESCs and Its Active Manipulation by Extrinsic??Signals. Cell Stem Cell *3*, 519–532.

Ekşioğlu, Y.Z., Scheffer, I.E., Cardenas, P., Knoll, J., DiMario, F., Ramsby, G., Berg, M., Kamuro, K., Berkovic, S.F., Duyk, G.M., et al. (1996). Periventricular heterotopia: An X-linked dominant epilepsy locus causing aberrant cerebral cortical development. Neuron *16*, 77–87.

Elke Gabriel1, Arpit Wason1, Anand Ramani1, Li Ming Gooi1, Patrick Keller2, Andrei Pozniakovsky2, Ina Poser2, Florian Noack3, Narasimha Swamy Telugu4, Federico Calegari3, Tomo Šarić4, Jürgen Hescheler, A., and A Hyman, Marco Gottardo, Giuliano Callaini, F.S.A. and J.G. (2016). CPAP promotes timely cilium disassembly to

maintain neural progenitor pool. EMBO J. *Volume 35*, pp 699–791.

Englund, C. (2005). Pax6, Tbr2, and Tbr1 Are Expressed Sequentially by Radial Glia, Intermediate Progenitor Cells, and Postmitotic Neurons in Developing Neocortex. J. Neurosci. *25*, 247–251.

Escobedo, A., Gomes, T., Aragón, E., Martín-Malpartida, P., Ruiz, L., and Macias, M.J. (2014). Structural basis of the activation and degradation mechanisms of the E3 ubiquitin ligase Nedd4L. Structure *22*, 1446–1457.

Evsyukova, I., Plestant, C., and Anton, E.S. (2013). Integrative mechanisms of oriented neuronal migration in the developing brain. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *29*, 299–353.

Falace, A., Filipello, F., La Padula, V., Vanni, N., Madia, F., De Pietri Tonelli, D., De Falco, F.A., Striano, P., Dagna Bricarelli, F., Minetti, C., et al. (2010). TBC1D24, an ARF6-interacting protein, is mutated in familial infantile myoclonic epilepsy. Am. J. Hum. Genet. *87*, 365–370.

Falace, A., Buhler, E., Fadda, M., Watrin, F., Lippiello, P., Pallesi-Pocachard, E., Baldelli, P., Benfenati, F., Zara, F., Represa, A., et al. (2014). TBC1D24 regulates neuronal migration and maturation through modulation of the ARF6-dependent pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *111*, 2337–2342.

Falconer, D.S. (1951). Two new mutants, “trembler” and “reeler”, with neurological actions in the house mouse (Mus musculus L.). J. Genet. *50*, 192–205.

Falnikar, A., Tole, S., and Baas, P.W. (2011). Kinesin-5, a mitotic microtubule-associated motor protein, modulates neuronal migration. Mol. Biol. Cell *22*, 1561–1574.

Fan, G., Martinowich, K., Chin, M.H., He, F., Fouse, S.D., Hutnick, L., Hattori, D., Ge, W., Shen, Y., Wu, H., et al. (2005). DNA methylation controls the timing of astrogliogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. Development *132*, 3345–3356.

Fang, W.Q., Chen, W.W., Fu, A.Y., and Ip, N. (2013). Axin directs the amplification and differentiation of intermediate progenitors in the developing cerebral cortex. Neuron *79*, 665–679.

Feng, L., Allen, N.S., Simo, S., and Cooper, J.A. (2007). Cullin 5 regulates Dab1 protein levels and neuron positioning during cortical development. Genes Dev. *21*, 2717–2730.

Feng, Y., Chen, M.H., Moskowitz, I.P., Mendonza, A.M., Vidali, L., Nakamura, F., Kwiatkowski, D.J., and Walsh, C.A. (2006). Filamin A (FLNA) is required for cell-cell contact in vascular development and cardiac morphogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 19836–19841.

Ferland, R.J., Batiz, L.F., Neal, J., Lian, G., Bundock, E., Lu, J., Hsiao, Y.C., Diamond, R., Mei, D., Banham, A.H., et al. (2009). Disruption of neural progenitors along the ventricular and subventricular zones in periventricular heterotopia. Hum. Mol. Genet. *18*, 497–516.

Fernández, V., Llinares-Benadero, C., and Borrell, V. (2016). Cerebral cortex expansion and folding: what have we learned? EMBO J. 1–24.

Fietz, S. a, Kelava, I., Vogt, J., Wilsch-Bräuninger, M., Stenzel, D., Fish, J.L., Corbeil, D., Riehn, A., Distler, W., Nitsch, R., et al. (2010). OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. Nat. Neurosci. *13*, 690–699.

Fish, J.L., Kosodo, Y., Enard, W., Pääbo, S., Huttner, W.B., Paabo, S., Huttner, W.B., Pääbo, S., and Huttner, W.B. (2006). Aspm specifically maintains symmetric proliferative divisions of neuroepithelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 10438–10443.

Fish, J.L., Dehay, C., Kennedy, H., and Huttner, W.B. (2008). Making bigger brains-the evolution of neural-progenitor-cell division. J. Cell Sci. *121*, 2783–2793.

Florio, M., and Huttner, W.B. (2014). Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. Development *141*, 2182–2194.

Fox, J.W., Lamperti, E.D., Ekşioğlu, Y.Z., Hong, S.E., Feng, Y., Graham, D.A., Scheffer, I.E., Dobyns, W.B., Hirsch, B.A., Radtke, R.A., et al. (1998). Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human Periventricular heterotopia. Neuron *21*, 1315–1325.

Frade, J.M. (2002). Interkinetic nuclear movement in the vertebrate neuroepithelium: Encounters with an old acquaintance. In Progress in Brain Research, pp. 67–71.

Francis, F., Koulakoff, A., Boucher, D., Chafey, P., Schaar, B., Vinet, M.C., Friocourt, G., McDonnell, N., Reiner, O., Kahn, A., et al. (1999). Doublecortin is a developmentally

regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. Neuron *23*, 247–256.

Franco, S.J., and Müller, U. (2013). Shaping Our Minds: Stem and Progenitor Cell Diversity in the Mammalian Neocortex. Neuron *77*, 19–34.

Franco, S.J., Martinez-Garay, I., Gil-Sanz, C., Harkins-Perry, S.R., and M??ller, U. (2011). Reelin Regulates Cadherin Function via Dab1/Rap1 to Control Neuronal Migration and Lamination in the Neocortex. Neuron *69*, 482–497.

Franco, S.J., Gil-Sanz, C., Martinez-Garay, I., Espinosa, A., Harkins-Perry, S.R., Ramos, C., Müller, U., and Muller, U. (2012). Fate-Restricted Neural Progenitors in the Mammalian Cerebral Cortex. Science (80-.). *337*, 746–749.

Frasa, M. a. M., Koessmeier, K.T., Ahmadian, M.R., and Braga, V.M.M. (2012). Illuminating the functional and structural repertoire of human TBC/RABGAPs. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *13*, 476–476.

Friocourt, G., Kanatani, S., Tabata, H., Yozu, M., Takahashi, T., Antypa, M., Raguénès, O., Chelly, J., Férec, C., Nakajima, K., et al. (2008). Cell-autonomous roles of ARX in cell proliferation and neuronal migration during corticogenesis. J. Neurosci. *28*, 5794–5805.

Fuentes, P., Cánovas, J., Berndt, F.A., Noctor, S.C., and Kukuljan, M. (2012). CoREST/LSD1 control the development of pyramidal cortical neurons. Cereb. Cortex *22*, 1431–1441.

Fukata, M., Watanabe, T., Noritake, J., Nakagawa, M., Yamaga, M., Kuroda, S., Matsuura, Y., Iwamatsu, A., Perez, F., and Kaibuchi, K. (2002). Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. Cell *109*, 873–885.

Gal, J.S., Morozov, Y.M., Ayoub, A.E., Chatterjee, M., Rakic, P., and Haydar, T.F. (2006). Molecular and morphological heterogeneity of neural precursors in the mouse neocortical proliferative zones. J. Neurosci. *26*, 1045–1056.

Gambello, M.J., Darling, D.L., Yingling, J., Tanaka, T., Gleeson, J.G., and Wynshaw-Boris, A. (2003). Multiple dose-dependent effects of Lis1 on cerebral cortical development. J. Neurosci. *23*, 1719–1729.

Gangloff, Y.-G., Mueller, M., Dann, S.G., Svoboda, P., Sticker, M., Spetz, J.-F., Um, S.H., Brown, E.J., Cereghini, S., Thomas, G., et al. (2004). Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development. Mol. Cell. Biol. *24*, 9508–9516.

Gao, Z., and Godbout, R. (2013). Reelin-Disabled-1 signaling in neuronal migration: Splicing takes the stage. Cell. Mol. Life Sci. *70*, 2319–2329.

Garcez, P.P., Diaz-Alonso, J., Crespo-Enriquez, I., Castro, D., Bell, D., and Guillemot, F. (2015). Cenpj/CPAP regulates progenitor divisions and neuronal migration in the cerebral cortex downstream of Ascl1. Nat. Commun. *6*, 6474.

Garcia-Gonzalo, F.R., and Reiter, J.F. (2012). Scoring a backstage pass: Mechanisms of ciliogenesis and ciliary access. J. Cell Biol. *197*, 697–709.

García-Moreno, F., López-Mascaraque, L., and De Carlos, J.A. (2007). Origins and migratory routes of murine Cajal-Retzius cells. J. Comp. Neurol. *500*, 419–432.

Gaspard, N., Bouschet, T., Hourez, R., Dimidschstein, J., Naeije, G., van den Ameele, J., Espuny-Camacho, I., Herpoel, A., Passante, L., Schiffmann, S.N., et al. (2008). An intrinsic mechanism of corticogenesis from embryonic stem cells. Nature *455*, 351–357.

Gdalyahu, A., Ghosh, I., Levy, T., Sapir, T., Sapoznik, S., Fishler, Y., Azoulai, D., and Reiner, O. (2004). DCX, a new mediator of the JNK pathway. EMBO J. *23*, 823–832.

Gilmore, E.C., and Walsh, C.A. (2013). Genetic causes of microcephaly and lessons for neuronal development. Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol. *2*, 461–478.

Gil-Sanz, C., Espinosa, A., Fregoso, S.P., Bluske, K.K., Cunningham, C.L., Martinez-Garay, I., Zeng, H., Franco, S.J., and Müller, U. (2015). Lineage Tracing Using Cux2-Cre and Cux2-CreERT2 Mice. Neuron *86*, 1091–1099.

Gleeson, J.G., Allen, K.M., Fox, J.W., Lamperti, E.D., Berkovic, S., Scheffer, I., Cooper, E.C., Dobyns, W.B., Minnerath, S.R., Ross, M.E., et al. (1998). doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. Cell *92*, 63–72.

Gleeson, J.G., Peter T, L., Flanagan, L.A., and Walsh, C.A. (1999). Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. Neuron *23*, 257–271.

Gloerich, M., and Bos, J.L. (2011). Regulating Rap small G-proteins in time and space. Trends Cell Biol. *21*, 615–623.

Godin, J.D., Colombo, K., Molina-Calavita, M., Keryer, G., Zala, D., Charrin, B.E.C., Dietrich, P., Volvert, M.L., Guillemot, F., Dragatsis, I., et al. (2010). Huntingtin Is Required for Mitotic Spindle Orientation and Mammalian Neurogenesis. Neuron *67*, 392–406.

Godin, J.D., Thomas, N., Laguesse, S., Malinouskaya, L., Close, P., Malaise, O., Purnelle, A., Raineteau, O., Campbell, K., Fero, M., et al. (2012). P27Kip1 Is a Microtubule-Associated Protein that Promotes Microtubule Polymerization during Neuron Migration. Dev. Cell *23*, 729–744.

Goh, K.L., Cai, L., Cepko, C.L., and Gertler, F.B. (2002). Ena/VASP proteins regulate cortical neuronal positioning. Curr. Biol. *12*, 565–569.

Gonda, Y., Andrews, W.D., Tabata, H., Namba, T., Parnavelas, J.G., Nakajima, K., Kohsaka, S., Hanashima, C., and Uchino, S. (2013). Robo1 regulates the migration and laminar distribution of upper-layer pyramidal neurons of the cerebral cortex. Cereb. Cortex *23*, 1495–1508.

González-Billault, C., Del Río, J.A., Ureña, J.M., Jiménez-Mateos, E.M., Barallobre, M.J., Pascual, M., Pujadas, L., Simó, S., La Torre, A., Gavin, R., et al. (2005). A role of MAP1B in reelin-dependent neuronal migration. Cereb. Cortex *15*, 1134–1145.

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

Gruber, R., Zhou, Z., Sukchev, M., Joerss, T., Frappart, P.-O., and Wang, Z.-Q. (2011). MCPH1 regulates the neuroprogenitor division mode by coupling the centrosomal cycle with mitotic entry through the Chk1–Cdc25 pathway. Nat. Cell Biol. *13*, 1325–1334.

Guertin, D.A., Stevens, D.M., Thoreen, C.C., Burds, A.A., Kalaany, N.Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K.J., and Sabatini, D.M. (2006). Ablation in Mice of the mTORC Components raptor, rictor, or mLST8 Reveals??that mTORC2 Is Required for Signaling to Akt-FOXO and PKC??, but Not S6K1. Dev. Cell *11*, 859–871.

Guo, C., Eckler, M.J., McKenna, W.L., McKinsey, G.L., Rubenstein, J.L.R., and Chen, B. (2013). Fezf2 expression identifies a multipotent progenitor for neocortical projection neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. Neuron *80*, 1167–1174.

Guo, J., Yang, Z., Song, W., Chen, Q., Wang, F., Zhang, Q., and Zhu, X. (2006). Nudel contributes to microtubule anchoring at the mother centriole and is involved in both dynein-dependent and -independent centrosomal protein assembly. Mol. Biol. Cell *17*, 680–689.

Guo, J., Higginbotham, H., Li, J., Nichols, J., Hirt, J., Ghukasyan, V., and Anton, E.S. (2015). Developmental disruptions underlying brain abnormalities in ciliopathies. Nat. Commun. *6*, 7857.

Hanashima, C., Li, S.C., Shen, L., Lai, E., and Fishell, G. (2004). Foxg1 suppresses early cortical cell fate. Science *303*, 56–59.

Hansen, S.D., and Mullins, R.D. (2010). VASP is a processive actin polymerase that requires monomeric actin for barbed end association. J. Cell Biol. *191*, 571–584.

Hansen, D. V, Lui, J.H., Parker, P.R.L., and Kriegstein, A.R. (2010). Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. Nature *464*, 554–561.

Hart, A.W., Morgan, J.E., Schneider, J., West, K., McKie, L., Bhattacharya, S., Jackson, I.J., and Cross, S.H. (2006). Cardiac malformations and midline skeletal defects in mice lacking filamin A. Hum. Mol. Genet. *15*, 2457–2467.

Hartfuss, E., Galli, R., Heins, N., and Götz, M. (2001). Characterization of CNS Precursor Subtypes and Radial Glia. Dev. Biol. *229*, 15–30.

Hattori, M., Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H., and Inoue, K. (1994). Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor acetylhydrolase [corrected]. Nature *370*, 216–218.

Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W., and Huttner, W.B. (2004). Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 3196–3201.

Hentges, K.E., Sirry, B., Gingeras, A.C., Sarbassov, D.,

Sonenberg, N., Sabatini, D., and Peterson, A.S. (2001). FRAP/mTOR is required for proliferation and patterning during embryonic development in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 13796–13801.

Herzog, D., Loetscher, P., van Hengel, J., Knusel, S., Brakebusch, C., Taylor, V., Suter, U., and Relvas, J.B. (2011). The Small GTPase RhoA Is Required to Maintain Spinal Cord Neuroepithelium Organization and the Neural Stem Cell Pool. J Neurosci *31*, 5120–5130.

Hevner, R.F., Shi, L., Justice, N., Hsueh, Y.P., Sheng, M., Smiga, S., Bulfone, A., Goffinet, A.M., Campagnoni, A.T., and Rubenstein, J.L.R. (2001). Tbr1 regulates differentiation of the preplate and layer 6. Neuron *29*, 353–366.

Hewitt, J.E. (2009). Abnormal glycosylation of dystroglycan in human genetic disease. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis. *1792*, 853–861.

Hiesberger, T., Trommsdorff, M., Howell, B.W., Goffinet, A., Mumby, M.C., Cooper, J.A., and Herz, J. (1999). Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of Disabled-1 and modulates tau phosphorylation. Neuron *24*, 481–489.

Higginbotham, H., Eom, T.Y., Mariani, L.E., Bachleda, A., Hirt, J., Gukassyan, V., Cusack, C.L., Lai, C., Caspary, T., and Anton, E.S. (2012). Arl13b in Primary Cilia Regulates the Migration and Placement of Interneurons in the Developing Cerebral Cortex. Dev. Cell *23*, 925–938.

Higginbotham, H., Guo, J., Yokota, Y., Umberger, N.L., Su, C.-Y., Li, J., Verma, N., Hirt, J., Ghukasyan, V., Caspary, T., et al. (2013). Arl13b-regulated cilia activities are essential for polarized radial glial scaffold formation. Nat. Neurosci. *16*, 1000–1007.

Hippenmeyer, S. (2014). Cellular and Molecular Control of Neuronal Migration. Adv. Exp. Med. Biol. *800*, 1–24.

Hippenmeyer, S., Youn, Y.H., Moon, H.M., Miyamichi, K., Zong, H., Wynshaw-Boris, A., and Luo, L. (2010a). Genetic mosaic dissection of Lis1 and Ndel1 in neuronal migration. Neuron *68*, 695–709.

Hippenmeyer, S., Youn, Y.H., Moon, H.M., Miyamichi, K., Zong, H., Wynshaw-Boris, A., and Luo, L. (2010b). Genetic mosaic dissection of Lis1 and Ndel1 in neuronal migration. Neuron *68*, 695–709.

Hirabayashi, Y., Itoh, Y., Tabata, H., Nakajima, K., Akiyama, T., Masuyama, N., and Gotoh, Y. (2004). The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. Development *131*, 2791–2801.

Hirabayashi, Y., Suzki, N., Tsuboi, M., Endo, T.A., Toyoda, T., Shinga, J., Koseki, H., Vidal, M., and Gotoh, Y. (2009). Polycomb Limits the Neurogenic Competence of Neural Precursor Cells to Promote Astrogenic Fate Transition. Neuron *63*, 600–613.

Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., and Niwa, S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 682–696.

Homma, N., Takei, Y., Tanaka, Y., Nakata, T., Terada, S., Kikkawa, M., Noda, Y., and Hirokawa, N. (2003). Kinesin superfamily protein 2A (KIF2A) functions in suppression of collateral branch extension. Cell *114*, 229–239.

Honda, T., and Nakajima, K. (2016). Proper level of cytosolic disabled-1, which is regulated by dual nuclear translocation pathways, is important for cortical neuronal migration. Cereb. Cortex *26*, 3219–3236.

Hong, S.E., Shugart, Y.Y., Huang, D.T., Shahwan, S. Al, Grant, P.E., Hourihane, J.O., Martin, N.D.T., and Walsh, C.A. (2000). Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. Nat. Genet. *26*, 93–96.

Howell, B.W., Hawkes, R., Soriano, P., and Cooper, J.A. (1997). Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. Nature *389*, 733–737.

Howell, B.W., Herrick, T.M., Hildebrand, J.D., Zhang, Y., and Cooper, J.A. (2000). Dab1 tyrosine phosphorylation sites relay positional signals during mouse brain development. Curr. Biol. *10*, 877–885.

Hsia, H.-E., Kumar, R., Luca, R., Takeda, M., Courchet, J., Nakashima, J., Wu, S., Goebbels, S., An, W., Eickholt, B.J., et al. (2014). Ubiquitin E3 ligase Nedd4-1 acts as a downstream target of PI3K/PTEN-mTORC1 signaling to promote neurite growth. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *111*, 13205–13210.

Ikonen, E., de Almeid, J.B., Fath, K.R., Burgess, D.R., Ashman, K., Simons, K., and Stow, J.L. (1997). Myosin II is associated with Golgi membranes: identification of p200

as nonmuscle myosin II on Golgi-derived vesicles. J. Cell Sci. *110 (Pt 1*, 2155–2164.

Imai, F., Hirai, S., Akimoto, K., Koyama, H., Miyata, T., Ogawa, M., Noguchi, S., Sasaoka, T., Noda, T., and Ohno, S. (2006). Inactivation of aPKClambda results in the loss of adherens junctions in neuroepithelial cells without affecting neurogenesis in mouse neocortex. Development *133*, 1735–1744.

Insolera, R., Bazzi, H., Shao, W., Anderson, K. V, and Shi, S.-H. (2014a). Cortical neurogenesis in the absence of centrioles. Nat. Neurosci. *17*, 1528–1535.

Insolera, R., Shao, W., Airik, R., Hildebrandt, F., and Shi, S.H. (2014b). SDCCAG8 Regulates Pericentriolar Material Recruitment and Neuronal Migration in the Developing Cortex. Neuron *83*, 805–822.

Ishiuchi, T., Misaki, K., Yonemura, S., Takeichi, M., and Tanoue, T. (2009). Mammalian Fat and Dachsous cadherins regulate apical membrane organization in the embryonic cerebral cortex. J. Cell Biol. *185*, 959–967.

Itoh, M., Kim, C.H., Palardy, G., Oda, T., Jiang, Y.J., Maust, D., Yeo, S.Y., Lorick, K., Wright, G.J., Ariza-McNaughton, L., et al. (2003). Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of notch signaling by delta. Dev. Cell *4*, 67–82.

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

Itoh, Y., Higuchi, M., Oishi, K., Kishi, Y., Okazaki, T., Sakai, H., Miyata, T., Nakajima, K., and Gotoh, Y. (2016). PDK1-Akt pathway regulates radial neuronal migration and microtubules in the developing mouse neocortex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *113*, E2955–E2964.

Izawa, I., Goto, H., Kasahara, K., and Inagaki, M. (2015). Current topics of functional links between primary cilia and cell cycle. Cilia *4*, 12.

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

Jaglin, X.H., Poirier, K., Saillour, Y., Buhler, E., Tian, G., Bahi-Buisson, N., Fallet-Bianco, C., Phan-Dinh-Tuy, F., Kong, X.P., Bomont, P., et al. (2009). Mutations in the beta-tubulin gene TUBB2B result in asymmetrical polymicrogyria. Nat. Genet. *41*, 746–752.

Javaherian, A., and Kriegstein, A. (2009). A stem cell niche for intermediate progenitor cells of the embryonic cortex. Cereb. Cortex *19 Suppl 1*, i70–i77.

Jean, D.C., Baas, P.W., and Black, M.M. (2012). A novel role for doublecortin and doublecortin-like kinase in regulating growth cone microtubules. Hum. Mol. Genet. *21*, 5511–5527.

Jeong, S.J., Luo, R., Singer, K., Giera, S., Kreidberg, J., Kiyozumi, D., Shimono, C., Sekiguchi, K., and Piao, X. (2013). GPR56 Functions Together with ??3??1 Integrin in Regulating Cerebral Cortical Development. PLoS One *8*.

Jiang, X., and Nardelli, J. (2015). Cellular and molecular introduction to brain development. Neurobiol. Dis. *92*, 3–17.

Jossin, Y., and Cooper, J.A. (2011). Reelin, Rap1 and N-cadherin orient the migration of multipolar neurons in the developing neocortex. Nat. Neurosci. *14*, 697–703.

Jossin, Y., and Goffinet, A.M. (2007). Reelin signals through phosphatidylinositol 3-kinase and Akt to control cortical development and through mTor to regulate dendritic growth. Mol. Cell. Biol. *27*, 7113–7124.

Ka, M., Condorelli, G., Woodgett, J.R., and Kim, W.-Y. (2014). mTOR regulates brain morphogenesis by mediating GSK3 signaling. Development *141*, 4076–4086.

Kamachi, Y., and Kondoh, H. (2013). Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. Development *140*, 4129–4144.

Kardon, J.R., and Vale, R.D. (2009). Regulators of the cytoplasmic dynein motor. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 854–865.

Kassai, H., Sugaya, Y., Noda, S., Nakao, K., Maeda, T., Kano, M., and Aiba, A. (2014). Selective Activation of mTORC1 Signaling Recapitulates Microcephaly, Tuberous Sclerosis, and Neurodegenerative Diseases. Cell Rep. *7*, 1626–1639.

Katayama, K. -i., Melendez, J., Baumann, J.M., Leslie, J.R., Chauhan, B.K., Nemkul, N., Lang, R.A., Kuan, C.-Y., Zheng, Y., and Yoshida, Y. (2011). Loss of RhoA in neural progenitor cells causes the disruption of adherens junctions and hyperproliferation. Proc. Natl. Acad. Sci.

108, 7607–7612.

Kawabe, H., and Brose, N. (2011). The role of ubiquitylation in nerve cell development. Nat. Rev. Neurosci. *12*, 251–268.

Kawase-Koga, Y., Otaegi, G., and Sun, T. (2009). Different timings of dicer deletion affect neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse central nervous system. Dev. Dyn. *238*, 2800–2812.

Kawauchi, T., Chihama, K., Nabeshima, Y., and Hoshino, M. (2006). Cdk5 phosphorylates and stabilizes p27kip1 contributing to actin organization and cortical neuronal migration. Nat. Cell Biol. *8*, 17–26.

Kawauchi, T., Sekine, K., Shikanai, M., Chihama, K., Tomita, K., Kubo, K. ichiro, Nakajima, K., Nabeshima, Y. ichi, and Hoshino, M. (2010). Rab GTPases-dependent endocytic pathways regulate neuronal migration and maturation through N-cadherin trafficking. Neuron *67*, 588–602.

Keays, D.A., Tian, G., Poirier, K., Huang, G.J., Siebold, C., Cleak, J., Oliver, P.L., Fray, M., Harvey, R.J., Molnár, Z., et al. (2007). Mutations in α-Tubulin Cause Abnormal Neuronal Migration in Mice and Lissencephaly in Humans. Cell *128*, 45–57.

Kent, C., and Clarke, P.J. (1991). The immunolocalisation of the neuroendocrine specific protein PGP9.5 during neurogenesis in the rat. Dev. Brain Res. *58*, 147–150.

Kholmanskikh, S.S., Dobrin, J.S., Wynshaw-Boris, A., Letourneau, P.C., and Ross, M.E. (2003). Disregulated RhoGTPases and actin cytoskeleton contribute to the migration defect in Lis1-deficient neurons. J Neurosci *23*, 8673–8681.

Kholmanskikh, S.S., Koeller, H.B., Wynshaw-Boris, A., Gomez, T., Letourneau, P.C., and Ross, M.E. (2006). Calcium-dependent interaction of Lis1 with IQGAP1 and Cdc42 promotes neuronal motility. Nat Neurosci *9*, 50–57.

Kim, S., and Dynlacht, B. (2013). Centrosomes tune in to metabolic state and turn on to oxygen. Dev. Cell *26*, 325–326.

Kim, S., Zaghloul, N. a, Bubenshchikova, E., Oh, E.C., Rankin, S., Katsanis, N., Obara, T., and Tsiokas, L. (2011). Nde1-mediated inhibition of ciliogenesis affects cell cycle re-entry. Nat. Cell Biol. *13*, 351–360.

Kim, S., Lee, K., Choi, J.-H., Ringstad, N., and Dynlacht, B.D. (2015). Nek2 activation of Kif24 ensures cilium disassembly during the cell cycle. Nat. Commun. *6*, 8087.

Kim, W.-Y., Wang, X., Wu, Y., Doble, B.W., Patel, S., Woodgett, J.R., and Snider, W.D. (2009). GSK-3 is a master regulator of neural progenitor homeostasis. Nat. Neurosci. *12*, 1390–1397.

Kirkham, M., Müller-Reichert, T., Oegema, K., Grill, S., and Hyman, A.A. (2003). SAS-4 is a C. elegans centriolar protein that controls centrosome size. Cell *112*, 575–587.

Kishi, Y., Fujii, Y., Hirabayashi, Y., and Gotoh, Y. (2012). HMGA regulates the global chromatin state and neurogenic potential in neocortical precursor cells. Nat. Neurosci. *15*, 1127–1133.

Knoblich, J.A. (2008). Mechanisms of Asymmetric Stem Cell Division. Cell *132*, 583–597.

Knoepfler, P.S., Cheng, P.F., and Eisenman, R.N. (2002). N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. Genes Dev. *16*, 2699–2712.

Kobayashi, T., Tsang, W.Y., Li, J., Lane, W., and Dynlacht, B.D. (2011). Centriolar kinesin Kif24 interacts with CP110 to remodel microtubules and regulate ciliogenesis. Cell *145*, 914–925.

Komada, M., Saitsu, H., Kinboshi, M., Miura, T., Shiota, K., and Ishibashi, M. (2008). Hedgehog signaling is involved in development of the neocortex. Development *135*, 2717–2727.

Konno, D., Yoshimura, S., Hori, K., Maruoka, H., and Sobue, K. (2005). Involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase/Rac1 and Cdc42 pathways in radial migration of cortical neurons. J. Biol. Chem. *280*, 5082–5088.

Konno, D., Shioi, G., Shitamukai, A., Mori, A., Kiyonari, H., Miyata, T., and Matsuzaki, F. (2008). Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. Nat. Cell Biol. *10*, 93–U78.

Koo, B.-K., Lim, H.-S., Song, R., Yoon, M.-J., Yoon, K.-J., Moon, J.-S., Kim, Y.-W., Kwon, M.-C., Yoo, K.-W., Kong, M.-P., et al. (2005). Mind bomb 1 is essential for

generating functional Notch ligands to activate Notch. Development *132*, 3459–3470.

Kosodo, Y., Röper, K., Haubensak, W., Marzesco, A.-M., Corbeil, D., and Huttner, W.B. (2004). Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells. EMBO J. *23*, 2314–2324.

Kosodo, Y., Suetsugu, T., Suda, M., Mimori-Kiyosue, Y., Toida, K., Baba, S. a, Kimura, A., and Matsuzaki, F. (2011). Regulation of interkinetic nuclear migration by cell cycle-coupled active and passive mechanisms in the developing brain. EMBO J. *30*, 1690–1704.

Kowalczyk, T., Pontious, A., Englund, C., Daza, R.A.M., Bedogni, F., Hodge, R., Attardo, A., Bell, C., Huttner, W.B., and Hevner, R.F. (2009). Intermediate neuronal progenitors (basal progenitors) produce pyramidal-projection neurons for all layers of cerebral cortex. Cereb. Cortex *19*, 2439–2450.

Kriegstein, A.R., and Götz, M. (2003). Radial glia diversity: A matter of cell fate. Glia *43*, 37–43.

Kriegstein, A., Noctor, S., and Martínez-cerdeño, V. (2006). Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion. Neuroscience *7*, 883–890.

Kumar, R.A., Pilz, D.T., Babatz, T.D., Cushion, T.D., Harvey, K., Topf, M., Yates, L., Robb, S., Uyanik, G., Mancini, G.M.S., et al. (2010). TUBA1A mutations cause wide spectrum lissencephaly (smooth brain) and suggest that multiple neuronal migration pathways converge on alpha tubulins. Hum. Mol. Genet. *19*, 2817–2827.

Kunda, P., and Baum, B. (2009). The actin cytoskeleton in spindle assembly and positioning. Trends Cell Biol. *19*, 174–179.

Kuo, G., Arnaud, L., Kronstad-O'Brien, P., and Cooper, J. a (2005). Absence of Fyn and Src causes a reeler-like phenotype. J. Neurosci. *25*, 8578–8586.

Kupferman, J. V, Basu, J., Russo, M.J., Guevarra, J., Cheung, S.K., and Siegelbaum, S. a (2014). Reelin Signaling Specifies the Molecular Identity of the Pyramidal Neuron Distal Dendritic Compartment. Cell *158*, 1335–1347.

Kuwahara, A., Hirabayashi, Y., Knoepfler, P.S., Taketo, M.M., Sakai, J., Kodama, T., and Gotoh, Y. (2010). Wnt signaling and its downstream target N-myc regulate basal progenitors in the developing neocortex. Development *137*, 1035–1044.

Kwiatkowski, A. V., Rubinson, D.A., Dent, E.W., Edward van Veen, J., Leslie, J.D., Zhang, J., Mebane, L.M., Philippar, U., Pinheiro, E.M., Burds, A.A., et al. (2007). Ena/VASP Is Required for Neuritogenesis in the Developing Cortex. Neuron *56*, 441–455.

Lakomá, J., Garcia-Alonso, L., Juque, J.M., and Luque, J.M. (2011). Reelin sets the pace of neocortical neurogenesis. Development *138*, 5223–5234.

LaMonica, B.E., Lui, J.H., Hansen, D. V, and Kriegstein, A.R. (2013). Mitotic spindle orientation predicts outer radial glial cell generation in human neocortex. Nat. Commun. *4*, 1665.

Lancaster, M.A., and Gleeson, J.G. (2009). The primary cilium as a cellular signaling center: lessons from disease. Curr. Opin. Genet. Dev. *19*, 220–229.

Lancaster, M.A., Gopal, D.J., Kim, J., Saleem, S.N., Silhavy, J.L., Louie, C.M., Thacker, B.E., Williams, Y., Zaki, M.S., and Gleeson, J.G. (2011). Defective Wnt-dependent cerebellar midline fusion in a mouse model of Joubert syndrome. Nat. Med. *17*, 726–731.

Lange, C., Huttner, W.B., and Calegari, F. (2009). Cdk4/CyclinD1 Overexpression in Neural Stem Cells Shortens G1, Delays Neurogenesis, and Promotes the Generation and Expansion of Basal Progenitors. Cell Stem Cell *5*, 320–331.

Latasa, M.J., Cisneros, E., and Frade, J.M. (2009). Cell cycle control of Notch signaling and the functional regionalization of the neuroepithelium during vertebrate neurogenesis. Int. J. Dev. Biol. *53*, 895–908.

Lawrenson, I.D., Krebs, D.L., Linossi, E.M., Zhang, J.-G., McLennan, T.J., Collin, C., McRae, H.M., Kolesnik, T.B., Koh, K., Britto, J.M., et al. (2015). Cortical Layer Inversion and Deregulation of Reelin Signaling in the Absence of SOCS6 and SOCS7. Cereb. Cortex bhv253.

Lee, J.H., Huynh, M., Silhavy, J.L., Kim, S., Dixon-Salazar, T., Heiberg, A., Scott, E., Bafna, V., Hill, K.J., Collazo, A., et al. (2012a). De novo somatic mutations in components of the PI3K-AKT3-mTOR pathway cause hemimegalencephaly. Nat. Genet. *44*, 941–945.

Lee, J.H., Huynh, M., Silhavy, J.L., Kim, S., Dixon-Salazar, T., Heiberg, A., Scott, E., Bafna, V., Hill, K.J., Collazo, A., et al. (2012b). De novo somatic mutations in components of the PI3K-AKT3-mTOR pathway cause hemimegalencephaly. Nat. Genet. *44*, 941–945.

Lehtinen, M.K., and Walsh, C.A. (2011). Neurogenesis at the brain-cerebrospinal fluid interface. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *27*, 653–679.

Lehtinen, M.K., Zappaterra, M.W., Chen, X., Yang, Y.J., Hill, A.D., Lun, M., Maynard, T., Gonzalez, D., Kim, S., Ye, P., et al. (2011). The Cerebrospinal Fluid Provides a Proliferative Niche for Neural Progenitor Cells. Neuron *69*, 893–905.

Letourneau, P.C., Shattuck, T. a, and Ressler, a H. (1987). "Pull" and "push" in neurite elongation: observations on the effects of different concentrations of cytochalasin B and taxol. Cell Motil. Cytoskeleton *8*, 193–209.

Lewis, T.L., Courchet, J., and Polleux, F. (2013). Cell biology in neuroscience: Cellular and molecular mechanisms underlying axon formation, growth, and branching. J. Cell Biol. *202*, 837–848.

Leyva-Díaz, E., and López-Bendito, G. (2013). In and out from the cortex: Development of major forebrain connections. Neuroscience *254*, 26–44.

Li, A., Saito, M., Chuang, J.-Z., Tseng, Y.-Y., Dedesma, C., Tomizawa, K., Kaitsuka, T., and Sung, C.-H. (2011). Ciliary transition zone activation of phosphorylated Tctex-1 controls ciliary resorption, S-phase entry and fate of neural progenitors. Nat. Cell Biol. *13*, 402–411.

Li, J., Lee, W.-L., and Cooper, J. a (2005). NudEL targets dynein to microtubule ends through LIS1. Nat. Cell Biol. *7*, 686–690.

Li, L., Wei, D., Wang, Q., Pan, J., Liu, R., Zhang, X., and Bao, L. (2012a). MEC-17 Deficiency Leads to Reduced -Tubulin Acetylation and Impaired Migration of Cortical Neurons. J. Neurosci. *32*, 12673–12683.

Li, S., Jin, Z., Koirala, S., Bu, L., Xu, L., Hynes, R.O., Walsh, C. a, Corfas, G., and Piao, X. (2008). GPR56 regulates pial basement membrane integrity and cortical lamination. J. Neurosci. *28*, 5817–5826.

Li, V.S.W., Ng, S.S., Boersema, P.J., Low, T.Y., Karthaus, W.R., Gerlach, J.P., Mohammed, S., Heck, A.J.R., Maurice, M.M., Mahmoudi, T., et al. (2012b). Wnt Signaling through Inhibition of β-Catenin Degradation in an Intact Axin1 Complex. Cell *149*, 1245–1256.

Lim, J.S., Kim, W., Kang, H.-C., Kim, S.H., Park, A.H., Park, E.K., Cho, Y.-W., Kim, S., Kim, H.M., Kim, J.A., et al. (2015). Brain somatic mutations in MTOR cause focal cortical dysplasia type II leading to intractable epilepsy. Nat. Med. *21*, 395–400.

Lipton, J.O., and Sahin, M. (2014). The Neurology of mTOR. Neuron *84*, 275–291.

Liu, G., Thomas, L., Warren, R.A., Enns, C.A., Cunningham, C.C., Hartwig, J.H., and Thomas, G. (1997). Cytoskeletal protein ABP-280 directs the intracellular trafficking of furin and modulates proprotein processing in the endocytic pathway. J. Cell Biol. *139*, 1719–1733.

Louvi, A., and Grove, E.A. (2011). Cilia in the CNS: The quiet organelle claims center stage. Neuron *69*, 1046–1060.

Lowery, L.A., and Van Vactor, D. (2009). The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 332–343.

Lucas, F.R., Goold, R.G., Gordon-Weeks, P.R., and Salinas, P.C. (1998). Inhibition of GSK-3beta leading to the loss of phosphorylated MAP-1B is an early event in axonal remodelling induced by WNT-7a or lithium. J. Cell Sci. *111 (Pt 1*, 1351–1361.

Ma, S., Kwon, H.J., Johng, H., Zang, K., and Huang, Z. (2013). Radial Glial Neural Progenitors Regulate Nascent Brain Vascular Network Stabilization Via Inhibition of Wnt Signaling. PLoS Biol. *11*.

Ma, X., Kawamoto, S., Hara, Y., and Adelstein, R.S. (2004). A point mutation in the motor domain of nonmuscle myosin II-B impairs migration of distinct groups of neurons. Mol. Biol. Cell *15*, 2568–2579.

Magri, L., Cambiaghi, M., Cominelli, M., Alfaro-Cervello, C., Cursi, M., Pala, M., Bulfone, A., Garcìa-Verdugo, J.M., Leocani, L., Minicucci, F., et al. (2011). Article Sustained Activation of mTOR Pathway in Embryonic Neural Stem Cells Leads to Development of Tuberous Sclerosis Complex-Associated Lesions. Cell Stem Cell *9*, 447–462.

Malatesta, P., Hack, M.A., Hartfuss, E., Kettenmann, H., Klinkert, W., Kirchhoff, F., and Götz, M. (2003). Neuronal or glial progeny: Regional differences in radial glia fate.

Neuron *37*, 751–764.

Marín, O., and Rubenstein, J.L.R. (2003). Cell migration in the forebrain. Annu. Rev. Neurosci. *26*, 441–483.

Marsh, L., and Letourneau, P.C. (1984). Growth of neurites without filopodial or lamellipodial activity in the presence of cytochalasin B. J. Cell Biol. *99*, 2041–2047.

Marthiens, V., and Ffrench-Constant, C. (2009). Adherens junction domains are split by asymmetric division of embryonic neural stem cells. EMBO Rep. *10*, 515–520.

Marthiens, V., Kazanis, I., Moss, L., Long, K., and Ffrench-Constant, C. (2010). Adhesion molecules in the stem cell niche--more than just staying in shape? J. Cell Sci. *123*, 1613–1622.

Marthiens, V., Rujano, M. a, Pennetier, C., Tessier, S., Paul-Gilloteaux, P., and Basto, R. (2013). Centrosome amplification causes microcephaly. Nat. Cell Biol. *15*, 731–740.

Martynoga, B., Drechsel, D., and Guillemot, F. (2012). Molecular control of neurogenesis: A view from the mammalian cerebral cortex. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *4*.

Maskey, D., Marlin, M.C., Kim, S., Kim, S., Ong, E.-C., Li, G., and Tsiokas, L. (2015). Cell cycle-dependent ubiquitylation and destruction of NDE1 by CDK5-FBW7 regulates ciliary length. EMBO J. *34*, 2424–2440.

Matsuzaki, F., and Shitamukai, A. (2015). Cell division modes and cleavage planes of neural progenitors during mammalian cortical development. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *7*.

McConnell, S.K., and Kaznowski, C.E. (1991). Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex. Science *254*, 282–285.

McKenney, R.J., Vershinin, M., Kunwar, A., Vallee, R.B., and Gross, S.P. (2010). LIS1 and NudE induce a persistent dynein force-producing state. Cell *141*, 304–314.

Mesngon, M.T., Tarricone, C., Hebbar, S., Guillotte, A.M., Schmitt, E.W., Lanier, L., Musacchio, A., King, S.J., and Smith, D.S. (2006). Regulation of cytoplasmic dynein ATPase by Lis1. J. Neurosci. *26*, 2132–2139.

Meyer, G., Goffinet, A., Fairén, a, and Namur, B. (1999). What is a Cajal – Retzius Cell ? A Reassessment of a Classical Cell Type Based on Recent Observations in the Developing Neocortex. Cereb. Cortex *9*, 765–775.

Mihalas, A.B., Elsen, G.E., Bedogni, F., Daza, R.A.M., Ramos-Laguna, K.A., Arnold, S.J., Hevner Correspondence, R.F., and Hevner, R.F. (2016). Intermediate Progenitor Cohorts Differentially Generate Cortical Layers and Require Tbr2 for Timely Acquisition of Neuronal Subtype Identity. Cell Rep. *16*, 92–105.

Mirzaa, G.M., Conway, R.L., Gripp, K.W., Lerman-Sagie, T., Siegel, D.H., deVries, L.S., Lev, D., Kramer, N., Hopkins, E., Graham, J.M., et al. (2012). Megalencephaly-capillary malformation (MCAP) and megalencephaly-polydactyly-polymicrogyria-hydrocephalus (MPPH) syndromes: Two closely related disorders of brain overgrowth and abnormal brain and body morphogenesis. Am. J. Med. Genet. Part A *158 A*, 269–291.

Mirzaa, G.M., Campbell, C.D., Solovieff, N., Goold, C.P., Jansen, L.A., Menon, S., Timms, A.E., Conti, V., Biag, J.D., Olds, C., et al. (2016). Association of MTOR Mutations With Developmental Brain Disorders, Including Megalencephaly, Focal Cortical Dysplasia, and Pigmentary Mosaicism. JAMA Neurol. *73*, 836–845.

Miyamoto, T., Hosoba, K., Ochiai, H., Royba, E., Izumi, H., Sakuma, T., Yamamoto, T., Dynlacht, B., and Matsuura, S. (2015a). The Microtubule-Depolymerizing activity of a mitotic kinesin protein KIF2A drives primary cilia disassembly coupled with cell proliferation. Cell Rep. *10*, 664–673.

Miyamoto, Y., Sakane, F., and Hashimoto, K. (2015b). N-cadherin-based adherens junction regulates the maintenance, proliferation, and differentiation of neural progenitor cells during development. Cell Adh Migr *9*, 183–192.

Miyata, T. (2008). Development of three-dimensional architecture of the neuroepithelium: Role of pseudostratification and cellular “community.” Dev. Growth Differ. *50*.

Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H., and Ogawa, M. (2001). Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. Neuron *31*, 727–741.

Miyata, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Kawano, M., Muto, T., and Ogawa, M. (2004). Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor

cells. Development *131*, 3133.

Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Hirata, T., Hibi, M., and Macklis, J.D. (2005). Fezl is required for the birth and specification of corticospinal motor neurons. Neuron *47*, 817–831.

Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Menezes, J.R.L., and Macklis, J.D. (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. Nat. Rev. Neurosci. *8*, 427–437.

Moon, H.M., and Wynshaw-Boris, A. (2013). Cytoskeleton in action: Lissencephaly, a neuronal migration disorder. Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol. *2*, 229–245.

Moon, U.Y., Park, J.Y., Park, R., Cho, J.Y., Hughes, L.J., McKenna, J., Goetzl, L., Cho, S.H., Crino, P.B., Gambello, M.J., et al. (2015). Impaired Reelin-Dab1 signaling contributes to neuronal migration deficits of tuberous sclerosis complex. Cell Rep. *12*, 965–978.

Moore, A., and Wordeman, L. (2004). The mechanism, function and regulation of depolymerizing kinesins during mitosis. Trends Cell Biol. *14*, 537–546.

Morin, X., Jaouen, F., and Durbec, P. (2007). Control of planar divisions by the G-protein regulator LGN maintains progenitors in the chick neuroepithelium. Nat. Neurosci. *10*, 1440–1448.

Morris, N.R. (2000). Nuclear migration: From fungi to the mammalian brain. J. Cell Biol. *148*, 1097–1101.

Munji, R.N., Choe, Y., Li, G., Siegenthaler, J.A., and Pleasure, S.J. (2011). Wnt Signaling Regulates Neuronal Differentiation of Cortical Intermediate Progenitors. J. Neurosci. *31*, 1676–1687.

Murakami, M., Ichisaka, T., Maeda, M., Oshiro, N., Hara, K., Edenhofer, F., Kiyama, H., Yonezawa, K., and Yamanaka, S. (2004). mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. Mol. Cell. Biol. *24*, 6710–6718.

MURCIANO, A., ZAMORA, J., LOPEZSANCHEZ, J., and FRADE, J. (2002). Interkinetic Nuclear Movement May Provide Spatial Clues to the Regulation of Neurogenesis. Mol. Cell. Neurosci. *21*, 285–300.

Nadarajah, B., Brunstrom, J.E., Grutzendler, J., Wong, R.O., and Pearlman, a L. (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. Nat. Neurosci. *4*, 143–150.

Nagano, T., Morikubo, S., and Sato, M. (2004). Filamin A and FILIP (Filamin A-Interacting Protein) regulate cell polarity and motility in neocortical subventricular and intermediate zones during radial migration. J Neurosci *24*, 9648–9657.

Nakamura, F., Osborn, T.M., Hartemink, C.A., Hartwig, J.H., and Stossel, T.P. (2007). Structural basis of filamin A functions. J. Cell Biol. *179*, 1011–1025.

Nakashima, M., Saitsu, H., Takei, N., Tohyama, J., Kato, M., Kitaura, H., Shiina, M., Shirozu, H., Masuda, H., Watanabe, K., et al. (2015). Somatic Mutations in the MTOR gene cause focal cortical dysplasia type IIb. Ann. Neurol. *78*, 375–386.

Namihira, M., Kohyama, J., Semi, K., Sanosaka, T., Deneen, B., Taga, T., and Nakashima, K. (2009). Committed Neuronal Precursors Confer Astrocytic Potential on Residual Neural Precursor Cells. Dev. Cell *16*, 245–255.

Narayanan, R., Pirouz, M., Kerimoglu, C., Pham, L., Wagener, R.J., Kiszka, K.A., Rosenbusch, J., Seong, R.H., Kessel, M., Fischer, A., et al. (2015). Loss of BAF (mSWI/SNF) Complexes Causes Global Transcriptional and Chromatin State Changes in Forebrain Development. Cell Rep. *13*, 1842–1854.

Nicholas, A.K., Khurshid, M., Désir, J., Carvalho, O.P., Cox, J.J., Thornton, G., Kausar, R., Ansar, M., Ahmad, W., Verloes, A., et al. (2010). WDR62 is associated with the spindle pole and is mutated in human microcephaly. Nat. Genet. *42*, 1010–1014.

Niethammer, M., Smith, D.S., Ayala, R., Peng, J., Ko, J., Lee, M.S., Morabito, M., and Tsai, L.H. (2000). NUDEL is a novel Cdk5 substrate that associates with LIS1 and cytoplasmic dynein. Neuron *28*, 697–711.

Nishimura, Y. V, Shikanai, M., Hoshino, M., Ohshima, T., Nabeshima, Y., Mizutani, K.-I., Nagata, K.-I., Nakajima, K., and Kawauchi, T. (2014). Cdk5 and its substrates, Dcx and p27kip1, regulate cytoplasmic dilation formation and nuclear elongation in migrating neurons. Development *141*, 3540–3550.

Noctor, S.C. (2011). Time-lapse imaging of fluorescently labeled live cells in the embryonic mammalian forebrain. Cold Spring Harb. Protoc. *6*, 1350–1361.

Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Dammerman, R.S., and Kriegstein, A.R. (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. Nature *409*, 714–720.

Noctor, S.C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L., Kriegstein, A.R., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L., and Kriegstein, A.R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. Nat Neurosci *7*, 136–144.

Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R.A., and Downing, K.H. (1999). High-resolution model of the microtubule. Cell *96*, 79–88.

Nott, A., Nitarska, J., Veenvliet, J. V, Schacke, S., Derijck, A. a H. a, Sirko, P., Muchardt, C., Pasterkamp, R.J., Smidt, M.P., and Riccio, A. (2013). S-nitrosylation of HDAC2 regulates the expression of the chromatin-remodeling factor Brm during radial neuron migration. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 3113–3118.

Ochiai, W., Nakatani, S., Takahara, T., Kainuma, M., Masaoka, M., Minobe, S., Namihira, M., Nakashima, K., Sakakibara, A., Ogawa, M., et al. (2009). Periventricular notch activation and asymmetric Ngn2 and Tbr2 expression in pair-generated neocortical daughter cells. Mol. Cell. Neurosci. *40*, 225–233.

Ogawa, M., Miyata, T., Nakajimat, K., Yagyu, K., Seike, M., Ikenaka, K., Yamamoto, H., and Mikoshibat, K. (1995). The reeler gene-associated antigen on cajal-retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. Neuron *14*, 899–912.

Ohshima, T., Ward, J.M., Huh, C.G., Longenecker, G., Veeranna, Pant, H.C., Brady, R.O., Martin, L.J., and Kulkarni, A.B. (1996). Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *93*, 11173–11178.

Ohshima, T., Hirasawa, M., Tabata, H., Mutoh, T., Adachi, T., Suzuki, H., Saruta, K., Iwasato, T., Itohara, S., Hashimoto, M., et al. (2007). Cdk5 is required for multipolar-to-bipolar transition during radial neuronal migration and proper dendrite development of pyramidal neurons in the cerebral cortex. Development *134*, 2273–2282.

Oishi, K., Nakagawa, N., Tachikawa, K., Sasaki, S., Aramaki, M., Hirano, S., Yamamoto, N., Yoshimura, Y., and Nakajima, K. (2016). Identity of neocortical layer 4 neurons is specified through correct positioning into the cortex. Elife *5*.

Okada, Y., Yamazaki, H., Sekine-Aizawa, Y., and Hirokawa, N. (1995). The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a uniqye monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors. Cell *81*, 769–780.

Okamoto, M., Namba, T., and Shinoda, T. (2013). TAG-1-assisted progenitor elongation streamlines nuclear migration to optimize subapical crowding. Nat. Neurosci. *16*, 1556–1565.

Ossipova, O., Ezan, J., and Sokol, S.Y. (2009). PAR-1 Phosphorylates Mind Bomb to Promote Vertebrate Neurogenesis. Dev. Cell *17*, 222–233.

Ostrem, B.E.L., Lui, J.H., Gertz, C.C., and Kriegstein, A.R. (2014). Control of outer radial glial stem cell mitosis in the human brain. Cell Rep. *8*, 656–664.

Osumi, N., Shinohara, H., Numayama-Tsuruta, K., and Maekawa, M. (2008). Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. Stem Cells *26*, 1663–1672.

Pacary, E., Heng, J., Azzarelli, R., Riou, P., Castro, D., Lebel-Potter, M., Parras, C., Bell, D.M., Ridley, A.J., Parsons, M., et al. (2011). Proneural transcription factors regulate different steps of cortical neuron migration through rnd-mediated inhibition of RhoA signaling. Neuron *69*, 1069–1084.

Pacary, E., Azzarelli, R., and Guillemot, F. (2013). Rnd3 coordinates early steps of cortical neurogenesis through actin-dependent and -independent mechanisms. Nat. Commun. *4*, 1–12.

Paridaen, J.T., and Huttner, W.B. (2014). Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. EMBO Rep. *15*, 351–364.

Paridaen, J.T.M.L., Wilsch-Bräuninger, M., and Huttner, W.B. (2013). XAsymmetric inheritance of centrosome-associated primary cilium membrane directs ciliogenesis after cell division. Cell *155*, 333–344.

Park, T.J., and Curran, T. (2010). Alternative Splicing Disabled by Nova2. Neuron *66*, 811–813.

Parrini, E., Ramazzotti, A., Dobyns, W.B., Mei, D., Moro, F., Veggiotti, P., Marini, C., Brilstra, E.H., Bernardina, B.D., Goodwin, L., et al. (2006). Periventricular heterotopia: Phenotypic heterogeneity and correlation with Filamin a mutations. Brain *129*, 1892–1906.

Parrini, E., Ferrari, A.R., Dorn, T., Walsh, C.A., and Guerrini, R. (2009). Bilateral frontoparietal polymicrogyria, Lennox-Gastaut syndrome, and GPR56 gene mutations. Epilepsia *50*, 1344–1353.

Paul, L.K., Brown, W.S., Adolphs, R., Tyszka, J.M., Richards, L.J., Mukherjee, P., and Sherr, E.H. (2007). Agenesis of the corpus callosum: genetic, developmental and functional aspects of connectivity. Nat. Rev. Neurosci. *8*, 287–299.

Pawlisz, A.S., Mutch, C., Wynshaw-Boris, A., Chenn, A., Walsh, C.A., and Feng, Y. (2008). Lis1-Nde1-dependent neuronal fate control determines cerebral cortical size and lamination. Hum. Mol. Genet. *17*, 2441–2455.

Pereira, J.D., Sansom, S.N., Smith, J., Dobenecker, M.-W., Tarakhovsky, A., and Livesey, F.J. (2010). Ezh2, the histone methyltransferase of PRC2, regulates the balance between self-renewal and differentiation in the cerebral cortex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 15957–15962.

Perlini, L.E., Szczurkowska, J., Ballif, B.A., Piccini, A., Sacchetti, S., Giovedí, S., Benfenati, F., and Cancedda, L. (2015). Synapsin III acts downstream of semaphorin 3A/CDK5 signaling to regulate radial migration and orientation of pyramidal neurons in vivo. Cell Rep. *11*, 234–248.

Peyre, E., Jaouen, F., Saadaoui, M., Haren, L., Merdes, A., Durbec, P., and Morin, X. (2011). A lateral belt of cortical LGN and NuMA guides mitotic spindle movements and planar division in neuroepithelial cells. J. Cell Biol. *193*, 141–154.

Piao, T., Luo, M., Wang, L., Guo, Y., Li, D., Li, P., Snell, W.J., and Pan, J. (2009). A microtubule depolymerizing kinesin functions during both flagellar disassembly and flagellar assembly in Chlamydomonas. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 4713–4718.

Piao, X., Hill, R.S., Bodell, A., Chang, B.S., Basel-Vanagaite, L., Straussberg, R., Dobyns, W.B., Qasrawi, B., Winter, R.M., Innes, A.M., et al. (2004). G protein-coupled receptor-dependent development of human frontal cortex. Science *303*, 2033–2036.

Pierfelice, T., Alberi, L., and Gaiano, N. (2011). Notch in the Vertebrate Nervous System: An Old Dog with New Tricks. Neuron *69*, 840–855.

di Pietro, F., Echard, A., and Morin, X. (2016). Regulation of mitotic spindle orientation: an integrated view. EMBO Rep. *17*, 1106–1130.

Pilaz, L.-J., Patti, D., Marcy, G., Ollier, E., Pfister, S., Douglas, R.J., Betizeau, M., Gautier, E., Cortay, V., Doerflinger, N., et al. (2009). Forced G1-phase reduction alters mode of division, neuron number, and laminar phenotype in the cerebral cortex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 21924–21929.

Pilz, D.T., Matsumoto, N., Minnerath, S., Mills, P., Gleeson, J.G., Allen, K.M., Walsh, C.A., Barkovich, A.J., Dobyns, W.B., Ledbetter, D.H., et al. (1998). LIS1 and XLIS (DCX) mutations cause most classical lissencephaly, but different patterns of malformation. Hum Mol Genet *7*, 2029–2037.

Pilz, G.A., Shitamukai, A., Reillo, I., Pacary, E., Schwausch, J., Stahl, R., Ninkovic, J., Snippert, H.J., Clevers, H., Godinho, L., et al. (2013). Amplification of progenitors in the mammalian telencephalon includes a new radial glial cell type. Nat. Commun. *4*, 1–11.

Poduri, A., Evrony, G.D., Cai, X., Elhosary, P.C., Beroukhim, R., Lehtinen, M.K., Hills, B.L., Heinzen, E.L., Hill, A., Hill, S.R., et al. (2012). Somatic Activation of AKT3 Causes Hemispheric Developmental Brain Malformations. Neuron *74*, 41–48.

Poirier, K., Keays, D.A., Francis, F., Saillour, Y., Bahi, N., Manouvrier, S., Fallet-Bianco, C., Pasquier, L., Toutain, A., Tuy, F.P.D., et al. (2007). Large spectrum of lissencephaly and pachygyria phenotypes resulting from de novo missense mutations in tubulin alpha 1A (TUBA1A). Hum. Mutat. *28*, 1055–1064.

Poirier, K., Saillour, Y., Bahi-Buisson, N., Jaglin, X.H., Fallet-Bianco, C., Nabbout, R., Castelnau-Ptakhine, L., Roubertie, A., Attie-Bitach, T., Desguerre, I., et al. (2010). Mutations in the neuronal β-tubulin subunit TUBB3 result in malformation of cortical development and neuronal

migration defects. Hum. Mol. Genet. *19*, 4462–4473.

Poirier, K., Lebrun, N., Broix, L., Tian, G., Saillour, Y., Boscheron, C., Parrini, E., Valence, S., Saint Pierre, B., Oger, M., et al. (2013). Mutations in TUBG1, DYNC1H1, KIF5C and KIF2A cause malformations of cortical development and microcephaly. Nat. Publ. Gr. *45*, 639–647.

Porter, F.D., Drago, J., Xu, Y., Cheema, S.S., Wassif, C., Huang, S.P., Lee, E., Grinberg, A., Massalas, J.S., Bodine, D., et al. (1997). Lhx2, a LIM homeobox gene, is required for eye, forebrain, and definitive erythrocyte development. Development *124*, 2935–2944.

Des Portes, V., Francis, F., Pinard, J.M., Desguerre, I., Moutard, M.L., Snoeck, I., Meiners, L.C., Capron, F., Cusmai, R., Ricci, S., et al. (1998). Doublecortin is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia (SCLH). Hum. Mol. Genet. *7*, 1063–1070.

Radakovits, R., Barros, C.S., Belvindrah, R., Patton, B., and Müller, U. (2009). Regulation of radial glial survival by signals from the meninges. J. Neurosci. *29*, 7694–7705.

Radmanesh, F., Caglayan, A.O., Silhavy, J.L., Yilmaz, C., Cantagrel, V., Omar, T., Rosti, B., Kaymakcalan, H., Gabriel, S., Li, M., et al. (2013). Mutations in LAMB1 cause cobblestone brain malformation without muscular or ocular abnormalities. Am. J. Hum. Genet. *92*, 468–474.

Rago, L., Beattie, R., Taylor, V., and Winter, J. (2014). MiR379-410 cluster miRNAs regulate neurogenesis and neuronal migration by fine-tuning N-cadherin. EMBO J. *33*, 906–920.

Rakic, P. (1971). Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus. J Comp Neurol. *141*, 283–312.

Rakic, P. (1995). A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. Trends Neurosci. *18*, 383–388.

Rakic, P. (2009). Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. Nat. Rev. Neurosci. *10*, 724–735.

van Reeuwijk, J., Janssen, M., van den Elzen, C., Beltran-Valero de Bernabé, D., Sabatelli, P., Merlini, L., Boon, M., Scheffer, H., Brockington, M., Muntoni, F., et al. (2005). POMT2 mutations cause alpha-dystroglycan hypoglycosylation and Walker-Warburg syndrome. J. Med. Genet. *42*, 907–912.

Reillo, I., De Juan Romero, C., García-Cabezas, M.Á., and Borrell, V. (2011). A Role for intermediate radial glia in the tangential expansion of the mammalian cerebral cortex. Cereb. Cortex *21*, 1674–1694.

Reiner, O., and Sapir, T. (2013). LIS1 functions in normal development and disease. Curr. Opin. Neurobiol. *23*, 951–956.

Reiner, O., Carrozzo, R., Shen, Y., Wehnert, M., Faustinella, F., Dobyns, W.B., Caskey, C.T., and Ledbetter, D.H. (1993). Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. Nature *364*, 717–721.

Ridley, A.J. (2015). Rho GTPase signalling in cell migration. Curr. Opin. Cell Biol. *36*, 103–112.

Del Río, J. a, Heimrich, B., Borrell, V., Förster, E., Drakew, A., Alcántara, S., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., et al. (1997). A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. Nature *385*, 70–74.

Del Río, J.A., Martinez, A., Fonseca, M., Auladell, C., and Soriano, E. (1995). Glutamate-like immunoreactivity and fate of cajal-retzius cells in the murine cortex as identified with calretinin antibody. Cereb. Cortex *5*, 13–21.

Rivière, J.-B., Mirzaa, G.M., O'Roak, B.J., Beddaoui, M., Alcantara, D., Conway, R.L., St-Onge, J., Schwartzentruber, J. a, Gripp, K.W., Nikkel, S.M., et al. (2012). De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. Nat. Genet. *44*, 934–940.

Rodriguez-Martinez, G., Molina-Hernandez, A., and Velasco, I. (2012). Activin A promotes neuronal differentiation of cerebrocortical neural progenitor cells. PLoS One *7*, e43797.

Roll, P., Rudolf, G., Pereira, S., Royer, B., Scheffer, I.E., Massacrier, A., Valenti, M.P., Roeckel-Trevisiol, N., Jamali, S., Beclin, C., et al. (2006). SRPX2 mutations in disorders of language cortex and cognition. Hum. Mol. Genet. *15*, 1195–1207.

Rooryck, C., Pelras, S., Chateil, J.-F., Cances, C., Arveiler,

B., Verloes, a, Lacombe, D., and Goizet, C. (2007). Bardet-biedl syndrome and brain abnormalities. Neuropediatrics *38*, 5–9.

Roscioli, T., Kamsteeg, E.-J., Buysse, K., Maystadt, I., van Reeuwijk, J., van den Elzen, C., van Beusekom, E., Riemersma, M., Pfundt, R., Vissers, L.E.L.M., et al. (2012). Mutations in ISPD cause Walker-Warburg syndrome and defective glycosylation of α-dystroglycan. Nat. Genet. *44*, 581–585.

Rousso, D.L., Pearson, C.A., Gaber, Z.B., Miquelajauregui, A., Li, S., Portera-Cailliau, C., Morrisey, E.E., and Novitch, B.G. (2012). Foxp-Mediated Suppression of N-Cadherin Regulates Neuroepithelial Character and Progenitor Maintenance in the CNS. Neuron *74*, 314–330.

Roy, K., Kuznicki, K., Wu, Q., Sun, Z., Bock, D., Schutz, G., Vranich, N., and Monaghan, A.P. (2004). The Tlx gene regulates the timing of neurogenesis in the cortex. J Neurosci *24*, 8333–8345.

Ryu, H.-W., Park, C.-W., and Ryu, K.-Y. (2014). Disruption of polyubiquitin gene Ubb causes dysregulation of neural stem cell differentiation with premature gliogenesis. Sci. Rep. *4*, 7026.

Sahara, S., and O'Leary, D.D.M. (2009). Fgf10 regulates transition period of cortical stem cell differentiation to radial glia controlling generation of neurons and basal progenitors. Neuron *63*, 48–62.

Saillour, Y., Broix, L., Bruel-Jungerman, E., Lebrun, N., Muraca, G., Rucci, J., Poirier, K., Belvindrah, R., Francis, F., and Chelly, J. (2014). Beta tubulin isoforms are not interchangeable for rescuing impaired radial migration due to Tubb3 knockdown. Hum. Mol. Genet. *23*, 1516–1526.

Salmi, M., Bruneau, N., Cillario, J., Lozovaya, N., Massacrier, A., Buhler, E., Cloarec, R., Tsintsadze, T., Watrin, F., Tsintsadze, V., et al. (2013). Tubacin prevents neuronal migration defects and epileptic activity caused by rat Srpx2 silencing in utero. Brain *136*, 2457–2473.

Sánchez, I., and Dynlacht, B.D. (2016). Cilium assembly and disassembly. Nat. Publ. Gr. *18*, 711–717.

Sansom, S.N., Griffiths, D.S., Faedo, A., Kleinjan, D.J., Ruan, Y., Smith, J., Van Heyningen, V., Rubenstein, J.L., and Livesey, F.J. (2009). The level of the transcription factor Pax6 is essential for controlling the balance between neural stem cell self-renewal and neurogenesis. PLoS Genet. *5*.

Sapir, T., Elbaum, M., and Reiner, O. (1997). Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit. EMBO J. *16*, 6977–6984.

Sarkisian, M.R., Bartley, C.M., Chi, H., Nakamura, F., Hashimoto-Torii, K., Torii, M., Flavell, R.A., and Rakic, P. (2006). MEKK4 Signaling Regulates Filamin Expression and Neuronal Migration. Neuron *52*, 789–801.

Sasaki, S., Mori, D., Toyo-oka, K., Chen, A., Garrett-beal, L., Muramatsu, M., Miyagawa, S., Hiraiwa, N., Yoshiki, A., Wynshaw-boris, A., et al. (2005). Complete Loss of Ndel1 Results in Neuronal Migration Defects and Early Embryonic Lethality. Mol. Cell. Biol. *25*, 7812–7827.

SAUER, M.E., and WALKER, B.E. (1959). Radioautographic study of interkinetic nuclear migration in the neural tube. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *101*, 557–560.

Schaar, B.T., and McConnell, S.K. (2005). Cytoskeletal coordination during neuronal migration. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 13652–13657.

Schenk, J., Wilsch-Bräuninger, M., Calegari, F., and Huttner, W.B. (2009). Myosin II is required for interkinetic nuclear migration of neural progenitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 16487–16492.

Schmidt, E.F., Togashi, H., and Strittmatter, S.M. (2010). Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. Handb. Cell Signaling, 2/e *2*, 1961–1966.

Schuurmans, C., Armant, O., Nieto, M., Stenman, J.M., Britz, O., Klenin, N., Brown, C., Langevin, L.-M., Seibt, J., Tang, H., et al. (2004). Sequential phases of cortical specification involve Neurogenin-dependent and -independent pathways. EMBO J. *23*, 2892–2902.

Schweitzer, J.K., Sedgwick, A.E., and D'Souza-Schorey, C. (2011). ARF6-mediated endocytic recycling impacts cell movement, cell division and lipid homeostasis. Semin. Cell Dev. Biol. *22*, 39–47.

Seeley, E.S., and Nachury, M. V (2010). The perennial organelle: assembly and disassembly of the primary cilium. J. Cell Sci. *123*, 511–518.

Sekine, K., Honda, T., Kawauchi, T., Kubo, K. -i., and

Nakajima, K. (2011). The Outermost Region of the Developing Cortical Plate Is Crucial for Both the Switch of the Radial Migration Mode and the Dab1-Dependent "Inside-Out" Lamination in the Neocortex. J. Neurosci. *31*, 9426–9439.

Sekine, K., Kawauchi, T., Kubo, K.I., Honda, T., Herz, J., Hattori, M., Kinashi, T., and Nakajima, K. (2012). Reelin Controls Neuronal Positioning by Promoting Cell-Matrix Adhesion via Inside-Out Activation of Integrin ??5??1. Neuron *76*, 353–369.

Sessa, A., Mao, C.A., Colasante, G., Nini, A., Klein, W.H., and Broccoli, V. (2010). Tbr2-positive intermediate (basal) neuronal progenitors safeguard cerebral cortex expansion by controlling amplification of pallial glutamatergic neurons and attraction of subpallial GABAergic interneurons. Genes Dev. *24*, 1816–1826.

Sharma, N., Kosan, Z.A., Stallworth, J.E., Berbari, N.F., and Yoder, B.K. (2011). Soluble levels of cytosolic tubulin regulate ciliary length control. Mol. Biol. Cell *22*, 806–816.

Sheen, V.L., Dixon, P.H., Fox, J.W., Hong, S.E., Kinton, L., Sisodiya, S.M., Duncan, J.S., Dubeau, F., Scheffer, I.E., Schachter, S.C., et al. (2001). Mutations in the X-linked filamin 1 gene cause periventricular nodular heterotopia in males as well as in females. Hum. Mol. Genet. *10*, 1775–1783.

Sheen, V.L., Ganesh, V.S., Topcu, M., Sebire, G., Bodell, A., Hill, R.S., Grant, P.E., Shugart, Y.Y., Imitola, J., Khoury, S.J., et al. (2004). Mutations in ARFGEF2 implicate vesicle trafficking in neural progenitor proliferation and migration in the human cerebral cortex. Nat. Genet. *36*, 69–76.

Sheldon, M., Rice, D.S., D'Arcangelo, G., Yoneshima, H., Nakajima, K., Mikoshiba, K., Howell, B.W., Cooper, J. a, Goldowitz, D., Curran, T., et al. (1997). Scrambler and yotari disrupt the disabled gene and produce a reeler-like phenotype in mice. Nature *389*, 730–733.

Shen, Q., Wang, Y., Dimos, J.T., and Fasano, C.A. (2006). The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. Nature *9*, 743–751.

Shi, Y., Kirwan, P., Smith, J., Robinson, H.P.C., and Livesey, F.J. (2012). Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. Nat. Neurosci. *15*, 477–486, S1.

Shikanai, M., Nakajima, K., and Kawauchi, T. (2011). N-cadherin regulates radial glial fiber-dependent migration of cortical locomoting neurons. Commun. Integr. Biol. *4*, 326–330.

Shikata, Y., Okada, T., Hashimoto, M., Ellis, T., Matsumaru, D., Shiroishi, T., Ogawa, M., Wainwright, B., and Motoyama, J. (2011). Ptch1-mediated dosage-dependent action of Shh signaling regulates neural progenitor development at late gestational stages. Dev. Biol. *349*, 147–159.

Shiota, C., Woo, J.T., Lindner, J., Shelton, K.D., and Magnuson, M.A. (2006). Multiallelic Disruption of the rictor Gene in Mice Reveals that mTOR Complex 2 Is Essential for Fetal Growth and Viability. Dev. Cell *11*, 583–589.

Shitamukai, A., Konno, D., and Matsuzaki, F. (2011). Oblique radial glial divisions in the developing mouse neocortex induce self-renewing progenitors outside the germinal zone that resemble primate outer subventricular zone progenitors. J Neurosci *31*, 3683–3695.

Shu, T., Ayala, R., Nguyen, M.D., Xie, Z., Gleeson, J.G., and Tsai, L.H. (2004). Ndel1 operates in a common pathway with LIS1 and cytoplasmic dynein to regulate cortical neuronal positioning. Neuron *44*, 263–277.

Sidman, R.L., and Rakic, P. (1973). Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. Brain Res. *62*, 1–35.

Siegenthaler, J.A., Ashique, A.M., Zarbalis, K., Patterson, K.P., Hecht, J.H., Kane, M.A., Folias, A.E., Choe, Y., May, S.R., Kume, T., et al. (2009). Retinoic Acid from the Meninges Regulates Cortical Neuron Generation. Cell *139*, 597–609.

Simó, S., and Cooper, J.A. (2013). Rbx2 Regulates Neuronal Migration through Different Cullin 5-RING Ligase Adaptors. Dev. Cell *27*, 399–411.

Simó, S., Jossin, Y., and Cooper, J. a (2010). Cullin 5 regulates cortical layering by modulating the speed and duration of Dab1-dependent neuronal migration. J. Neurosci. *30*, 5668–5676.

Singer, K., Luo, R., Jeong, S.J., and Piao, X. (2013). GPR56

and the developing cerebral cortex: Cells, matrix, and neuronal migration. Mol. Neurobiol. *47*, 186–196.

Smart, I. (1976). A pilot study of cell production by the ganglionic eminences of the developing mouse brain. J Anat *121*, 71–84.

Solecki, D.D.J., Trivedi, N., Govek, E.-E.E., Kerekes, R. a, Gleason, S.S., and Hatten, M.E. (2009). Myosin II motors and F-actin dynamics drive the coordinated movement of the centrosome and soma during CNS glial-guided neuronal migration. Neuron *63*, 63–80.

Sottocornola, R., Royer, C., Vives, V., Tordella, L., Zhong, S., Wang, Y., Ratnayaka, I., Shipman, M., Cheung, A., Gaston-Massuet, C., et al. (2010). ASPP2 Binds Par-3 and Controls the Polarity and Proliferation of Neural Progenitors during CNS Development. Dev. Cell *19*, 126–137.

Squier, W., and Jansen, A. (2014). Polymicrogyria: pathology, fetal origins and mechanisms. Acta Neuropathol. Commun. *2*, 80.

Stancik, E.K., Navarro-Quiroga, I., Sellke, R., and Haydar, T.F. (2010). Heterogeneity in ventricular zone neural precursors contributes to neuronal fate diversity in the postnatal neocortex. J. Neurosci. *30*, 7028–7036.

Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 513–525.

Stipursky, J., Francis, D., and Gomes, F.C.A. (2012). Activation of MAPK/PI3K/SMAD pathways by TGF-β1 controls differentiation of radial glia into astrocytes in vitro. Dev. Neurosci. *34*, 68–81.

Stipursky, J., Francis, D., Dezonne, R.S., Bérgamo de Araújo, A.P., Souza, L., Moraes, C.A., and Alcantara Gomes, F.C. (2014). TGF-β1 promotes cerebral cortex radial glia-astrocyte differentiation in vivo. Front. Cell. Neurosci. *8*, 393.

Stossel, T.P., Condeelis, J., Cooley, L., Hartwig, J.H., Noegel, a, Schleicher, M., and Shapiro, S.S. (2001). Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *2*, 138–145.

Stubbs, D., Deproto, J., Nie, K., Englund, C., Mahmud, I., Hevner, R., and Molnár, Z. (2009). Neurovascular congruence during cerebral cortical development. Cereb. Cortex *19*.

Supèr, H., Del Río, J.A., Martínez, A., Pérez-Sust, P., and Soriano, E. (2000). Disruption of neuronal migration and radial glia in the developing cerebral cortex following ablation of Cajal-Retzius cells. Cereb. Cortex *10*, 602–613.

Suter, D.M., and Miller, K.E. (2011). The emerging role of forces in axonal elongation. Prog. Neurobiol. *94*, 91–101.

Sütterlin, C., and Colanzi, A. (2010). The Golgi and the centrosome: Building a functional partnership. J. Cell Biol. *188*, 621–628.

Tabata, H., and Nakajima, K. (2003). Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. J. Neurosci. *23*, 9996–10001.

Tamai, H., Shinohara, H., Miyata, T., Saito, K., Nishizawa, Y., Nomura, T., and Osumi, N. (2007). Pax6 transcription factor is required for the interkinetic nuclear movement of neuroepithelial cells. Genes to Cells *12*, 983–996.

Tanaka, T., Serneo, F.F., Higgins, C., Gambello, M.J., Wynshaw-Boris, A., and Gleeson, J.G. (2004a). Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. J. Cell Biol. *165*, 709–721.

Tanaka, T., Serneo, F.F., Tseng, H.C., Kulkarni, A.B., Tsai, L.H., and Gleeson, J.G. (2004b). Cdk5 Phosphorylation of Doublecortin Ser297 Regulates Its Effect on Neuronal Migration. Neuron *41*, 215–227.

Tang, B.L. (2016). Rab, Arf, and Arl-Regulated Membrane Traffic in Cortical Neuron Migration. J. Cell. Physiol. *231*, 1417–1423.

Tang, C.J., Fu, R.H., Wu, K.S., Hsu, W.B., and Tang, T.K. (2009). CPAP is a cell-cycle regulated protein that controls centriole length. Nat Cell Biol *11*, 825–831.

Tarabykin, V., Stoykova, a, Usman, N., and Gruss, P. (2001). Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by Svet1 gene expression. Development *128*, 1983–1993.

Taverna, E., and Huttner, W.B. (2010). Neural progenitor nuclei IN motion. Neuron *67*, 906–914.

Taverna, E., Götz, M., and Huttner, W.B. (2014). The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of the development and evolution of the neocortex.

Taverna, E., Mora-Bermúdez, F., Strzyz, P.J., Florio, M., Icha, J., Haffner, C., Norden, C., Wilsch-Bräuninger, M.,

and Huttner, W.B. (2016). Non-canonical features of the Golgi apparatus in bipolar epithelial neural stem cells. Sci. Rep. *6*, 21206.

Teissier, A., Griveau, A., Vigier, L., Piolot, T., Borello, U., and Pierani, A. (2010). A novel transient glutamatergic population migrating from the pallial-subpallial boundary contributes to neocortical development. J. Neurosci. *30*, 10563–10574.

Teissier, A., Waclaw, R.R., Griveau, A., Campbell, K., and Pierani, A. (2012). Tangentially migrating transient glutamatergic neurons control neurogenesis and maintenance of cerebral cortical progenitor pools. Cereb. Cortex *22*, 403–416.

Tessier-Lavigne, M., and Goodman, C.S. (1996). The molecular biology of axon guidance. Science (80-.). *274*, 1123–1133.

Thomanetz, V., Angliker, N., Cloëtta, D., Lustenberger, R.M., Schweighauser, M., Oliveri, F., Suzuki, N., and Rüegg, M.A. (2013). Ablation of the mTORC2 component rictor in brain or Purkinje cells affects size and neuron morphology. J. Cell Biol. *201*, 293–308.

Thornton, G.K., and Woods, C.G. (2009). Primary microcephaly: do all roads lead to Rome? Trends Genet. *25*, 501–510.

Tian, G., Kong, X.-P., Jaglin, X.H., Chelly, J., Keays, D., and Cowan, N.J. (2008). A pachygyria-causing alpha-tubulin mutation results in inefficient cycling with CCT and a deficient interaction with TBCB. Mol. Biol. Cell *19*, 1152–1161.

Tian, G., Jaglin, X.H., Keays, D.A., Francis, F., Chelly, J., and Cowan, N.J. (2010). Disease-associated mutations in TUBA1A result in a spectrum of defects in the tubulin folding and heterodimer assembly pathway. Hum. Mol. Genet. *19*, 3599–3613.

Tint, I., Jean, D., Baas, P.W., and Black, M.M. (2009). Doublecortin associates with microtubules preferentially in regions of the axon displaying actin-rich protrusive structures. J. Neurosci. *29*, 10995–11010.

Tissir, F., and Goffinet, A.M. (2003). Reelin and brain development. Nat. Rev. Neurosci. *4*, 496–505.

Tong, C.K., Han, Y.-G., Shah, J.K., Obernier, K., Guinto, C.D., and Alvarez-Buylla, A. (2014). Primary cilia are required in a unique subpopulation of neural progenitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *111*, 1–6.

Toropova, K., Zou, S., Roberts, A.J., Redwine, W.B., Goodman, B.S., Reck-Peterson, S.L., and Leschziner, A.E. (2014). Lis1 regulates dynein by sterically blocking its mechanochemical cycle. Elife *3*.

Toyo-Oka, K., Sasaki, S., Yano, Y., Mori, D., Kobayashi, T., Toyoshima, Y.Y., Tokuoka, S.M., Ishii, S., Shimizu, T., Muramatsu, M., et al. (2005). Recruitment of katanin p60 by phosphorylated NDEL1, an LIS1 interacting protein, is essential for mitotic cell division and neuronal migration. Hum. Mol. Genet. *14*, 3113–3128.

Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., Stockinger, W., Nimpf, J., Hammer, R.E., Richardson, J.A., and Herz, J. (1999). Reeler/disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. Cell *97*, 689–701.

Trotman, L.C., Wang, X., Alimonti, A., Chen, Z., Teruya-Feldstein, J., Yang, H., Pavletich, N.P., Carver, B.S., Cordon-Cardo, C., Erdjument-Bromage, H., et al. (2007). Ubiquitination Regulates PTEN Nuclear Import and Tumor Suppression. Cell *128*, 141–156.

Tsai, L.H., and Gleeson, J.G. (2005). Nucleokinesis in neuronal migration. Neuron *46*, 383–388.

Tsai, J.W., Chen, Y., Kriegstein, A.R., and Vallee, R.B. (2005). LIS1 RNA interference blocks neural stem cell division, morphogenesis, and motility at multiple stages. J. Cell Biol. *170*, 935–945.

Tsai, J.W., Bremner, K.H., and Vallee, R.B. (2007). Dual subcellular roles for LIS1 and dynein in radial neuronal migration in live brain tissue. Nat Neurosci *10*, 970–979.

Tsai, J.-W., Lian, W.-N., Kemal, S., Kriegstein, A.R., and Vallee, R.B. (2010). Kinesin 3 and cytoplasmic dynein mediate interkinetic nuclear migration in neural stem cells. Nat. Neurosci. *13*, 1463–1471.

Tsai, L.H., Takahashi, T., Caviness Jr., V.S., and Harlow, E. (1993). Activity and expression pattern of cyclin-dependent kinase 5 in the embryonic mouse nervous system 1. Development *119*, 1029–1040.

Tsai, V., Parker, W.E., Orlova, K.A., Baybis, M., Chi, A.W.S., Berg, B.D., Birnbaum, J.F., Estevez, J., Okochi, K., Sarnat, H.B., et al. (2014). Fetal brain mTOR signaling activation in

tuberous sclerosis complex. Cereb. Cortex *24*, 315–327.

Tsukada, M., Prokscha, A., Ungewickell, E., and Eichele, G. (2005). Doublecortin association with actin filaments is regulated by neurabin II. J. Biol. Chem. *280*, 11361–11368.

Tsunekawa, Y., Britto, J.M., Takahashi, M., Polleux, F., Tan, S.-S., and Osumi, N. (2012). Cyclin D2 in the basal process of neural progenitors is linked to non-equivalent cell fates. EMBO J. *31*, 1879–1892.

Tsunekawa, Y., Kikkawa, T., and Osumi, N. (2014). Asymmetric inheritance of Cyclin D2 maintains proliferative neural stem/progenitor cells: A critical event in brain development and evolution. Dev. Growth Differ. *56*, 349–357.

Tullio, A.N., Bridgman, P.C., Tresser, N.J., Chan, C.-C., Conti, M.A., Adelstein, R.S., and Hara, Y. (2001). Structural abnormalities develop in the brain after ablation of the gene encoding nonmuscle myosin II-B heavy chain. J. Comp. Neurol. *433*, 62–74.

Tuoc, T.C., and Stoykova, A. (2008). Trim11 modulates the function of neurogenic transcription factor Pax6 through ubiquitin-proteosome system. Genes Dev. *22*, 1972–1986.

Tuoc, T.C., Boretius, S., Sansom, S.N., Pitulescu, M.E., Frahm, J., Livesey, F.J., and Stoykova, A. (2013). Chromatin Regulation by BAF170 Controls Cerebral Cortical Size and Thickness. Dev. Cell *25*, 256–269.

Vallee, R.B., Seale, G.E., and Tsai, J.W. (2009). Emerging roles for myosin II and cytoplasmic dynein in migrating neurons and growth cones. Trends Cell Biol. *19*, 347–355.

Vasistha, N.A., García-Moreno, F., Arora, S., Cheung, A.F.P., Arnold, S.J., Robertson, E.J., and Molnár, Z. (2015). Cortical and clonal contribution of Tbr2 expressing progenitors in the developing mouse brain. Cereb. Cortex *25*, 3290–3302.

Vasudevan, K.K., Jiang, Y.-Y., Lechtreck, K.F., Kushida, Y., Alford, L.M., Sale, W.S., Hennessey, T., and Gaertig, J. (2014). Kinesin-13 regulates the quantity and quality of tubulin inside cilia. Mol. Biol. Cell *26*, 478–494.

Veleri, S., Manjunath, S.H., Fariss, R.N., May-Simera, H., Brooks, M., Foskett, T. a, Gao, C., Longo, T. a, Liu, P., Nagashima, K., et al. (2014). Ciliopathy-associated gene Cc2d2a promotes assembly of subdistal appendages on the mother centriole during cilia biogenesis. Nat. Commun. *5*, 4207.

Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., and Horwitz, A.R. (2009). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 778–790.

Villar-Cerviño, V., and Marín, O. (2012). Cajal-retzius cells. Curr. Biol. *22*, R179.

Villar-Cerviño, V., Molano-Mazón, M., Catchpole, T., Valdeolmillos, M., Henkemeyer, M., Martínez, L.M., Borrell, V., and Marín, O. (2013). Contact Repulsion Controls the Dispersion and Final Distribution of Cajal-Retzius Cells. Neuron *77*, 457–471.

Visintin, R., Prinz, S., and Amon, A. (1997). CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. Science (80-.). *278*, 460–463.

Volvert, M.L., Pr??vot, P.P., Close, P., Laguesse, S., Pirotte, S., Hemphill, J., Rogister, F., Kruzy, N., Sacheli, R., Moonen, G., et al. (2014). MicroRNA targeting of CoREST controls polarization of migrating cortical neurons. Cell Rep. *7*, 1168–1183.

Vulto-van Silfhout, A.T., Nakagawa, T., Bahi-Buisson, N., Haas, S.A., Hu, H., Bienek, M., Vissers, L.E.L.M., Gilissen, C., Tzschach, A., Busche, A., et al. (2015). Variants in CUL4B are associated with cerebral malformations. Hum. Mutat. *36*, 106–117.

Walcher, T., Xie, Q., Sun, J., Irmler, M., Beckers, J., Ozturk, T., Niessing, D., Stoykova, A., Cvekl, A., Ninkovic, J., et al. (2013). Functional dissection of the paired domain of Pax6 reveals molecular mechanisms of coordinating neurogenesis and proliferation. Development *140*, 1123–1136.

Walczak, C.E., Gayek, S., and Ohi, R. (2013). Microtubule-Depolymerizing Kinesins. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *29*, 417–441.

Wang, E.T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtukova, I., Zhang, L., Mayr, C., Kingsmore, S.F., Schroth, G.P., and Burge, C.B. (2008). Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. Nature *456*, 470–476.

Wang, H., Ge, G., Uchida, Y., Luu, B., and Ahn, S. (2011a). Gli3 is required for maintenance and fate specification of cortical progenitors. J. Neurosci. *31*, 6440–6448.

Wang, L., Piao, T., Cao, M., Qin, T., Huang, L., Deng, H., Mao, T., and Pan, J. (2013). Flagellar regeneration requires cytoplasmic microtubule depolymerization and kinesin-13. J. Cell Sci. *126*, 1531–1540.

Wang, L., Hou, S., and Han, Y.-G. (2016a). Hedgehog signaling promotes basal progenitor expansion and the growth and folding of the neocortex. Nat. Neurosci. *19*, 888–896.

Wang, X., Tsai, J., LaMonica, B., and Kriegstein, A. (2011b). A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex. Nat Neurosci *14*, 555–561.

Wang, Z., Dang, T., Liu, T., Chen, S., Li, L., Huang, S., and Fang, M. (2016b). NEDD4L protein catalyzes ubiquitination of PIK3CA protein and regulates PI3K-AKT signaling. J. Biol. Chem. *291*, 17467–17477.

Way, S.W., Rozas, N.S., Wu, H.C., Mckenna, J., Reith, R.M., Hashmi, S.S., Dash, P.K., and Gambello, M.J. (2012). The differential effects of prenatal and/or postnatal rapamycin on neurodevelopmental defects and cognition in a neuroglial mouse model of tuberous sclerosis complex. Hum. Mol. Genet. *21*, 3226–3236.

Westermann, S., and Weber, K. (2003). Post-translational modifications regulate microtubule function. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *4*, 938–947.

Wilkinson, K.D., Lee, K.M., Deshpande, S., Duerksen-Hughes, P., Boss, J.M., and Pohl, J. (1989). The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. Science *246*, 670–673.

Wilsch-Brauninger, M., Peters, J., Paridaen, J.T.M.L., and Huttner, W.B. (2012). Basolateral rather than apical primary cilia on neuroepithelial cells committed to delamination. Development *139*, 95–105.

Wong, K., Ren, X.R., Huang, Y.Z., Xie, Y., Liu, G., Saito, H., Tang, H., Wen, L., Brady-Kalnay, S.M., Mei, L., et al. (2001). Signal transduction in neuronal migration: Roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. Cell *107*, 209–221.

Wrobel, C.N., Mutch, C.A., Swaminathan, S., Taketo, M.M., and Chenn, A. (2007). Persistent expression of stabilized β-catenin delays maturation of radial glial cells into intermediate progenitors. Dev. Biol. *309*, 285–297.

Xia, C.H., Roberts, E.A., Her, L.S., Liu, X., Williams, D.S., Cleveland, D.W., and Goldstein, L.S.B. (2003). Abnormal neurofilament transport caused by targeted disruption of neuronal kinesin heavy chain KIF5A. J. Cell Biol. *161*, 55–66.

Yabe, J.T., Pimenta, a, and Shea, T.B. (1999). Kinesin-mediated transport of neurofilament protein oligomers in growing axons. J. Cell Sci. *112 (Pt 2*, 3799–3814.

Yabut, O.R., Fernandez, G., Huynh, T., Yoon, K., and Pleasure, S.J. (2015). Suppressor of Fused Is Critical for Maintenance of Neuronal Progenitor Identity during Corticogenesis. Cell Rep. *12*, 2021–2034.

Yamada, M., Toba, S., Yoshida, Y., Haratani, K., Mori, D., Yano, Y., Mimori-Kiyosue, Y., Nakamura, T., Itoh, K., Fushiki, S., et al. (2008). LIS1 and NDEL1 coordinate the plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein. EMBO J. *27*, 2471–2483.

Yang, G., Murashige, D.S., Humphrey, S.J., and James, D.E. (2015). A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. Cell Rep. *12*, 937–943.

Yano, M., Hayakawa-Yano, Y., Mele, A., and Darnell, R.B. (2010). Nova2 Regulates Neuronal Migration through an RNA Switch in Disabled-1 Signaling. Neuron *66*, 848–858.

Yao, B., and Jin, P. (2014). Unlocking epigenetic codes in neurogenesis. Genes Dev. *28*, 1253–1271.

Yao, B., Christian, K.M., He, C., Jin, P., Ming, G., and Song, H. (2016). Epigenetic mechanisms in neurogenesis. Nat. Rev. Neurosci. *17*, 537–549.

Yingling, J., Youn, Y.H., Darling, D., Toyo-oka, K., Pramparo, T., Hirotsune, S., and Wynshaw-Boris, A. (2008). Neuroepithelial Stem Cell Proliferation Requires LIS1 for Precise Spindle Orientation and Symmetric Division. Cell *132*, 474–486.

Yip, D.J., Corcoran, C.P., Alvarez-Saavedra, M., DeMaria, A., Rennick, S., Mears, A.J., Rudnicki, M.A., Messier, C., and Picketts, D.J. (2012). Snf2l Regulates Foxg1-Dependent Progenitor Cell Expansion in the Developing Brain. Dev. Cell *22*, 871–878.

Yoon, K.J., Koo, B.K., Im, S.K., Jeong, H.W., Ghim, J., Kwon, M. chul, Moon, J.S., Miyata, T., and Kong, Y.Y. (2008). Mind Bomb 1-Expressing Intermediate Progenitors Generate Notch Signaling to Maintain Radial Glial Cells. Neuron *58*, 519–531.

Yoshinaga, S., Ohkubo, T., Sasaki, S., Nuriya, M., Ogawa, Y., Yasui, M., Tabata, H., and Nakajima, K. (2012). A phosphatidylinositol lipids system, lamellipodin, and Ena/VASP regulate dynamic morphology of multipolar migrating cells in the developing cerebral cortex. J. Neurosci. *32*, 11643–11656.

Youn, Y.H., Pramparo, T., Hirotsune, S., and Wynshaw-Boris, A. (2009). Distinct dose-dependent cortical neuronal migration and neurite extension defects in Lis1 and Ndel1 mutant mice. J. Neurosci. *29*, 15520–15530.

Ypsilanti, A.R., and Rubenstein, J.L.R. (2016). Transcriptional and epigenetic mechanisms of early cortical development: An examination of how Pax6 coordinates cortical development. J. Comp. Neurol. *524*, 609–629.

Yu, J.S.L., Ramasamy, T.S., Murphy, N., Holt, M.K., Czapiewski, R., Wei, S.-K., and Cui, W. (2015). PI3K/mTORC2 regulates TGF-β/Activin signalling by modulating Smad2/3 activity via linker phosphorylation. Nat. Commun. *6*, 7212.

Yu, T.W., Mochida, G.H., Tischfield, D.J., Sgaier, S.K., Flores-Sarnat, L., Sergi, C.M., Topçu, M., McDonald, M.T., Barry, B.J., Felie, J.M., et al. (2010). Mutations in WDR62, encoding a centrosome-associated protein, cause microcephaly with simplified gyri and abnormal cortical architecture. Nat. Genet. *42*, 1015–1020.

Zhang, J., Woodhead, G.J., Swaminathan, S.K., Noles, S.R., McQuinn, E.R., Pisarek, A.J., Stocker, A.M., Mutch, C.A., Funatsu, N., and Chenn, A. (2010). Cortical neural precursors inhibit their own differentiation via N-cadherin maintenance of beta-catenin signaling. Dev. Cell *18*, 472–479.

Zhang, J., Neal, J., Lian, G., Shi, B., Ferland, R.J., and Sheen, V. (2012). Brefeldin A-inhibited Guanine Exchange Factor 2 Regulates Filamin A Phosphorylation and Neuronal Migration. J. Neurosci. *32*, 12619–12629.

Zhang, J., Shemezis, J.R., McQuinn, E.R., Wang, J., Sverdlov, M., and Chenn, A. (2013a). AKT activation by N-cadherin regulates beta-catenin signaling and neuronal differentiation during cortical development. Neural Dev *8*, 7.

Zhang, J., Neal, J., Lian, G., Hu, J., Lu, J., and Sheen, V. (2013b). Filamin A regulates neuronal migration through brefeldin A-inhibited guanine exchange factor 2-dependent Arf1 activation. J. Neurosci. *33*, 15735–15746.

Zhang, X., Lei, K., Yuan, X., Wu, X., Zhuang, Y., Xu, T., Xu, R., and Han, M. (2009). SUN1/2 and Syne/Nesprin-1/2 Complexes Connect Centrosome to the Nucleus during Neurogenesis and Neuronal Migration in Mice. Neuron *64*, 173–187.

Zhang, X., Chen, M.H., Wu, X., Kodani, A., Fan, J., Doan, R., Ozawa, M., Ma, J., Yoshida, N., Reiter, J.F., et al. (2016). Cell-Type-Specific Alternative Splicing Governs Cell Fate in the Developing Cerebral Cortex. Cell *166*, 1147–1162.e15.

Zhao, L., Li, J., Ma, Y., Wang, J., Pan, W., Gao, K., Zhang, Z., Lu, T., Ruan, Y., Yue, W., et al. (2015). Ezh2 is involved in radial neuronal migration through regulating Reelin expression in cerebral cortex. Sci. Rep. *5*, 15484.

Zhao, X., Heng, J.I.-T., Guardavaccaro, D., Jiang, R., Pagano, M., Guillemot, F., Iavarone, A., and Lasorella, A. (2008). The HECT-domain ubiquitin ligase Huwe1 controls neural differentiation and proliferation by destabilizing the N-Myc oncoprotein. Nat. Cell Biol. *10*, 643–653.

Zhao, X., D'Arca, D., Lim, W.K., Brahmachary, M., Carro, M.S., Ludwig, T., Cardo, C.C., Guillemot, F., Aldape, K., Califano, A., et al. (2009). The N-Myc-DLL3 Cascade Is Suppressed by the Ubiquitin Ligase Huwe1 to Inhibit Proliferation and Promote Neurogenesis in the Developing Brain. Dev. Cell *17*, 210–221.

Zheng, W., Geng, A.Q., Li, P.F., Wang, Y., and Yuan, X.B. (2012). Robo4 regulates the radial migration of newborn neurons in developing neocortex. Cereb. Cortex *22*, 2587–2601.

Zhou, F.Q., Zhou, J., Dedhar, S., Wu, Y.H., and Snider, W.D. (2004). NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3?? and functions of the microtubule plus end binding protein APC. Neuron *42*, 897–912.

Zong, H., Espinosa, J.S., Su, H.H., Muzumdar, M.D., and Luo, L. (2005). Mosaic analysis with double markers in mice. Cell *121*, 479–492.