Etude du rôle de la kinésine KIF21B au cours du développement cortical

Laure Asselin

▶ **To cite this version:**

Laure Asselin. Etude du rôle de la kinésine KIF21B au cours du développement cortical. Biologie du développement. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT : 2019STRAJ032 . tel-02414344

HAL Id: tel-02414344
https://theses.hal.science/tel-02414344

Submitted on 16 Dec 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.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ (ED414)

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC)

THÈSE présentée par :

Laure ASSELIN

Soutenue le : **jeudi 5 septembre 2019**

En vue de l'obtention du grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/Spécialité : **Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

Etude du rôle de la kinésine Kif21b au cours du développement cortical

THÈSE dirigée par :

Dr. Juliette GODIN	CR, INSERM, IGBMC, Illkirch
Dr. Jamel CHELLY	Professeur, INSERM, IGBMC, Illkirch

RAPPORTEURS :

Dr. Annie ANDRIEUX	DR, INSERM, GIN, Grenoble
Dr. Carlos CARDOSO	DR, INSERM, INMED, Marseille

EXAMINATEUR EXTERNE :

Dr. Julien COURCHET	CR, INSERM, INMG, Lyon
Dr. Sandrine HUMBERT	DR, INSERM, GIN, Grenoble

EXAMINATEUR INTERNE :

Dr. Amélie PITON	MCUPH, IGBMC, Illkirch

Remerciements

C'est avec une profonde satisfaction (et également un petit pincement au cœur) que s'achève mon travail de thèse. C'est ainsi l'occasion pour moi de me remémorer les différentes embûches qu'il a fallu surmonter mais aussi et surtout toutes les personnes qui m'ont permis d'en arriver là.

Mes remerciements vont tout d'abord au Dr. Juliette Godin, qui m'a donné la chance d'intégrer son équipe de recherche lors de sa création et qui m'a si soigneusement encadrée tout au long de ma thèse. Juliette, je tiens à te remercier sincèrement pour ton investissement, ta confiance, ta patience, ta disponibilité permanente et pour tes nombreux encouragements tout au long de ces quatre années. Je souhaite également te remercier pour ton aide inestimable lors de la relecture de ce manuscrit.

J'adresse ensuite mes profonds remerciements aux membres du jury : Dr. Annie Andrieux, Dr. Carlos Cardoso, Dr. Julien Courchet et Dr. Amélie Piton qui ont accepté d'évaluer ce travail. Je remercie le Dr. Sandrine Humbert et le Dr. Binnaz Yalcin pour avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse. Merci à vous pour vos conseils avisés et vos remarques constructives.

Je tiens à remercier chaleureusement le Pr. Jamel Chelly pour ses précieux conseils scientifiques tout au long de ma thèse.

I would like to express my gratitude to all the members of the team Godin, for all their scientific (and non-scientific) assistance during these four years! Many thanks for your kindness, support, advices and for the great atmosphere that you bring in the lab ☺. I am deeply grateful to all of you and I really loved to work with you! Merci Peggy pour ton aide précieuse et ton soutien technique dans les manips et pour m'avoir appris la technique de l'électroporation in utero (et pas que !). Je te remercie également pour ta disponibilité, ton écoute et pour tes conseils lors de la relecture du papier. I would like to thank Efil for her interest in every step of my project. You were always available for discussion and you provided support and valuable advice throughout my doctorate. Thank you for accepting to correct the paper and a part of my thesis manuscript. I particularly want to thank you José for your involvement in the project and in the paper. It was a real pleasure to work with you. I'm sure the Kif21b story will be in good hands with you! Merci Hakima pour tous tes conseils techniques et scientifiques et surtout pour tous les délicieux gâteaux que tu as apportés. Thank you Jordi for your scientific and (mostly) non-scientific input and for all the good products (and sun!) that you bring back from Barcelona.

Je remercie toute l'équipe Chelly/Mandel pour leur aide scientifique, technique et humaine ainsi que pour nos intenses discussions non-scientifiques du midi. J'ai adoré passer du temps avec vous, dans les manips et en dehors. Un grand merci à Gaby pour avoir accepté de relire ce manuscrit et pour ses précieux conseils scientifiques et techniques.

Je tiens à adresser mes chaleureux remerciements à l'ensemble de nos collaborateurs pour leur implication dans ce projet. Un grand merci à l'ensemble de l'équipe Yalcin et plus particulièrement au Dr. Binnaz Yalcin et à Marie-Christine Fisher. Un grand merci également au Dr. Christelle Golzio, à Camille Bonnet et à Chantal Weber pour leur superbe travail sur le poisson zèbre. Je remercie également le Dr. Solveig Heide, le Dr. Christel Depienne, le Dr. Frédéric Saudou et Hélène Vitet.

Je souhaite remercier l'ensemble des membres de la plateforme d'imagerie et tout particulièrement Elvire Guiot et Erwan Grandgirard, pour leur aide et leur intérêt dans ce projet. Merci également à Jean-Marie Garnier, Thierry Lerouge et Paola Rossililo pour leur aide inestimable dans les clonages. Enfin, merci à l'ensemble du personnel de l'équipe du service de culture cellulaire et de l'animalerie IGBMC et ICS.

Je souhaite adresser un grand merci à mes copines de labo Sirine, Karima, Ekat et Helin, pour leur soutien et leurs encouragements durant cette longue (et fastidieuse) épreuve. Merci pour tous ces supers moments qui ont illuminés le quotidien des manips. Merci également pour vos conseils pas toujours (jamais ?) scientifiques et pour tous les cafés/thés/barres chocolatées que vous m'avez payés. Un grand merci également à Marion et Carole, pour votre gentillesse et pour leur écoute ;) et merci Marion pour avoir pris le temps de relire une partie de ce manuscrit. Un grand merci à vous toutes!

Mes remerciements vont ensuite à tous mes amis, qui ont su m'apporter confiance et écoute à tous les moments. Dimat, Dahlet, Camille, Charline et Husson, je vous remercie pour notre belle amitié pendant ces années d'études, qui va continuer bien évidemment ! Je remercie également Maïlys et Cyrielle mes amies de toujours, avec qui j'ai également eu la chance de faire de très beaux voyages durant cette thèse et qui ont eu la lourde tâche de composer avec un emploi du temps de thésarde.

*Un énorme merci à vous tous et toutes! J'vous **KIF** !*

Je voudrai remercier de tout cœur mes parents, sans qui je n'aurai jamais réussi à venir à bout de cette thèse ! Je vous remercie pour votre soutien, votre disponibilité et votre écoute durant tout mon cursus universitaire. Ce mémoire vous est 100% dédié ! Je remercie également toute ma famille qui a contribué de près ou de loin à mon bonheur. Je souhaite également exprimer ma profonde gratitude à mon frère pour ses nombreux encouragements et pour m'avoir supporté durant ces nombreuses années de coloc étudiante!

Enfin, je remercie Thomas ♥ pour son soutien, sa patience, son écoute, ses encouragements, sa compréhension, son intérêt dans mon projet de thèse et pour plein d'autres choses.

Table des matières

Remerciements 1

Table des matières 3

Liste des principales abréviations 7

Liste des figures 11

INTRODUCTION 15

Introduction générale 17

CHAPITRE 1 : LE DEVELOPPEMENT CORTICAL 19
I. Généralités sur le cortex cérébral adulte 19
A. Structure et fonctions du cortex cérébral 19
B. Composition cellulaire du cortex cérébral 20
II. Origine embryonnaire du cortex cérébral 21
III. La neurogenèse 23
A. Génération des interneurones corticaux 23
1. Spécification des éminences ganglionnaires 25
a. Les EGM 25
b. Les EGC 25
c. L'APO 26
2. Régulation spatio-temporelle de la génération des interneurones 26
B. Génération des neurones de projection corticaux 27
1. Les cellules de Cajal-Retzius (CR) 28
2. Les différents types de progéniteurs corticaux 28
a. Les progéniteurs apicaux 29
i. Les cellules souches neuroépithéliales (NE) 29
ii. Les cellules gliales radiaires apicales (GRa) 31
iii. Les progéniteurs intermédiaires apicaux (PIa) 32
b. Les progéniteurs basaux 33
i. Les progéniteurs intermédiaires (PI) 33
ii. Les cellules gliales radiaires basales (GRb) 34
3. Mécanismes moléculaires la régulation de la neurogenèse 34
a. L'orientation du fuseau mitotique 35
b. Le centrosome 36
c. Le cil primaire 37
d. La durée du cycle cellulaire 38
e. Les facteurs épigénétiques 39
f. Les signaux extracellulaires 39
g. La microcéphalie 41
4. Origine génétique de la diversité neuronale 42
IV. La migration neuronale 45
A. La migration tangentielle 45
1. Routes migratoires 45
2. Dynamique et régulation de la migration tangentielle 46
a. Morphologie de l'interneurone en migration 46
b. Régulation moléculaire de la nucléokinèse 48
c. Les facteurs extrinsèques impliqués dans la migration tangentielle 50
d. Régulation de l'intégration des interneurones dans les couches corticales 51
B. Migration radiaire 52
1. Mise en place de la lamination corticale 52
2. La translocation somale 54
3. Les étapes de la migration radiaire par locomotion 54
a. Naissance du neurone bipolaire et transition bipolaire-multipolaire 55
b. Transition multipolaire-bipolaire 55
c. Phase de locomotion 56

d. Translocation somale terminale 59
4. Rôles des cytosquelettes d'actine et de microtubule dans la régulation la migration radiaire 59
a. Le cytosquelette de microtubule et ses protéines associées 59
i. Généralités sur le cytosquelette de MT 59
ii. Les tubulines 62
iii. Les modifications post-traductionnelles des tubulines 64
iv. Les protéines associées aux MTs (MAPs) 65
b. Le cytosquelette d'actine et ses protéines associées 69
i. Généralités sur le cytosquelette d'actine 69
ii. Dynamique de l'actine au cours de la migration radiaire 71
iii. Les myosines 73
c. Rôles de la voie de signalisation Reelin dans le remodelage des cytosquelettes d'actine et de microtubules 74
V. Mise en place des connectivités par croissance et guidage axonale 76
A. Les principaux types de neurones de projection 76
B. Axogenèse et branchements collatéral 78
1. Etablissement de la polarité neuronale 78
2. Formation des branches collatérales 82
3. Le cône de croissance 84
4. Régulation de l'élongation axonale et de la formation des branches collatérales 86
a. Régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine 86
b. Régulation de la dynamique du cytosquelette de MTs 88
i. Les MAPs stabilisatrices du réseau de MTs 88
ii. Les MAPs déstabilisatrices du réseau de MTs 91
iii. Les MAPs liées aux extrémités (+) des MTs 91
C. Un exemple de guidage axonal : la formation du corps calleux 94
1. Développement des projections callosales et branchement contralatéral 94
2. Mécanisme du guidage axonal des neurones de projection callosal 95
a. Rôle des molécules sécrétées par la ligne médiane 95
b. Rôle des axones pionniers et des interactions axonales 96
3. Développement des branches callosales intra-corticales dans la couche V 97
4. L'agénésie du corps calleux (ACC) 99

CHAPITRE 2 : LES KINESINES ET LE DEVELOPPEMENT CORTICAL 101
I. Généralités sur les kinésines 101
A. Structure et familles des kinésines 101
B. Fonctions générales des kinésines dans les neurones 104
1. Régulation du transport intracellulaire 104
a. Régulation de l'attachement/détachement des cargos 105
b. Régulation de l'attachement aux MTs 106
c. L'auto-inhibition 111
i. Mécanismes de l'auto-inhibition 111
ii. Rôles de l'auto-inhibition dans la fonction cellulaire 113
iii. Levée de l'auto-inhibition 115
2. Rôles des kinésines sur la dynamiques des MTs 116
II. Fonctions des kinésines au cours du développement cortical 117
A. Régulation de la neurogenèse 118
a. La migration nucléaire intercinétique 118
b. Les divisions symétriques/asymétriques et devenir cellulaire 119
c. Ciliogenèse et neurogenèse 121
B. Régulation de la migration neuronale 122
C. Régulation de l'axogenèse, de la guidance axonale et de la formation des branches axonales collatérales 123
III. La kinésine KIF21B 128
A. Structure et expression de KIF21B 128
B. Fonctions de KIF21B au sein des neurones 129
1. Le transport de cargos 129
2. La dynamique du réseau de MTs 131
3. Le domaine d'auto-inhibition 132
4. Le développement et la fonction neuronale 133

OBJECTIFS 137

RESULTATS 141

ARTICLE 1 : MUTATIONS IN THE KIF21B KINESIN GENE ARE ASSOCIATED WITH INTELLECTUAL DISABILITY AND CAUSE NEURODEVELOPMENTAL ABNORMALITIES THROUGH IMBALANCED CANONICAL MOTOR ACTIVITY. 143

ARTICLE 2 : THE KINESIN KIF21B IS A MAJOR EFFECTOR OF MOUSE NEURONAL MIGRATION DURING CORTICOGENESIS. 189

RESULTATS PRELIMINAIRES : CHARACTERISATION OF THE KIF21B KNOCK-OUT MICE 209

DISCUSSION 217

I. Effets des variants faux-sens sur l'auto-inhibition de KIF21B 219

A. Notions de dominant-négatif (DN) et de gain de fonction (GF) 219

B. Les variants conduisent à une atténuation de l'auto-inhibition 221

1. Quels sont les mécanismes moléculaires impliqués dans l'atténuation de l'auto-inhibition ? 222

2. D'autres mécanismes indépendants de la fonction d'auto-inhibition pourraient-ils être impliqués ? 225

C. Deux mécanismes, même phénotype ? 225

D. Un niveau minimal d'auto-inhibition est requis pour le développement cortical normal 226

II. Rôles du variant p.Ile678Leu dans l'axogenèse et le branchement axonal 228

A. p.Ile678Leu exerce un effet dominant-négatif sur le branchement axonal ipsilatéral dans la couche corticale V 229

B. p.Ile678Leu exerce un effet « gain de fonction » sur l'axogenèse 231

III. Kif21b et microcéphalie 233

A. La microcéphalie des souris *Kif21b*$^{-/-}$ semble apparaître au cours du développement post-natal 233

B. L'expression ectopique du variant p.Gln313Lys entraîne une réduction globale de la taille de la tête chez le poisson zèbre. 234

IV. Rôles de Kif21b dans la migration neuronale 236

V. Conclusion générale 238

BIBLIOGRAPHIES 239

PUBLICATIONS ANNEXES 264

Liste des principales abréviations

5HT3aR : récepteur à la sérotonine ionotropique

ABP : Actin Binding Protein
ACC : agénésie du corps calleux
Actine-F/G : Actine filamenteuse/globulaire
ADP : Adénosine-DiphosPhate
AIS : axon initial segment
APC: Adenomatous Polyposis Coli
aPKC: atypical Protein Kinase C
APO : aire pré-optique
ApoER2: Apolipoprotein E Receptor 2
Arf6 : ADP ribosylation factor
Arl13b : ADP-ribosylation factor-like 13b
Arp2/3 : Actin-Related Proteins 2/3
ASMP : Abnormal Spindle-like Microcephaly-associated
ATAT1 : Alpha Tubulin Acetyltransferase 1
ATP : Adénosine-TriphosPhate

BLBP : Brain Lipid-Binding Protein
BMP : Bone Morphogenetic Protein
BP: bipolaire

CAMKII : calmoduline kinase II
cc: coiled-coil
CC: corps calleux
CDK : Cyclin Dependant Kinase
CDK5RAP2 : Cyclin-Dependent Kinase 5 Regulatory subunit-Associated Protein 2
CENP : Centromere Protein
CEP : centrosomal protein
CFEOM1 : fibrose congénitale des muscles oculomoteurs de type-1
CITK : Citron kinase
CLASP: CLIP-Associated Proteins
CLIP : Cytoplasmic Linker Proteins
Co-IP: co-immunoprecipitation
CR: Cajal-Retzius
CRMP-2 : Collapsin Response Mediator Protein 2
DCC : Deleted in Colorectal Carcinoma
Dclk : doublecortin-like kinase
DCX : doublecortine
DENN : Differentially Expressed in Normal and Neoplastic cells
DHC: dynein heavy chain
DI : déficience intelectuelle
DLK : Dual Leucine zipper Kinase
DYNC1H1 : cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1

E : jour embryonnaire
EB : End Binding protein
EG : éminence ganglionnaire
EGC : éminence ganglionnaire caudale
EGL : éminence ganglionnaire latérale
EGM : éminence ganglionnaire médiane
EIU : électroporation in utero
Ena : enabled
Eph : Ephrine

FGF : Fibroblast Growth Factor
FHA : forkhead-associated
FLNA : filamine-A
FMR2 : Formine-2

GABA : acide gamma-aminobutyrique
GABAR : récepteur à l'acide gamma-aminobutyrique
GAP : GTPase activating protein

GDNF : Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor
GEF: guanine nucleotide exchange factor
GFAP : Glial fibrillary acidic protein
GFP : green fluorescent protein
GFRα1 : GDNF Family Receptor α1
GLAST : Glutamate-aspartate transporter
GRa/b: gliale radiaire apicale/basale
GTP : guanosine triphosphate
GS: glial sling
GSK-3β : Glycogen Synthase Kinase-3 β
GW: glial wedge

HMG : High Mobility Group
HNP : hétérotopie nodulaire périventriculaire
HTT: Huntingtin

IG : indusium griseum
ISVZ/OSVZ : zone sous-ventriculaire interne/externe

JIP: JNK-interacting protein
JNK : c-Jun N-terminal Kinase

cKO: conditional knock-out
KANK1 : KN motif and ankyrin repeat domains 1
KAP : Kinesin-Associated Protein
KPB : Kinesin Binding Protein
KHC : kinesin heavy chain
KIF : Kinesin family
KLC : kinesin light chain
KO : knock-out

LC : light chain
LIM : Lin11/Isl1/Mec3
Lis1 : Lissencephaly-1
LKB1: Liver Kinase B1

MADD : MAPK-activating death domain
MADM (mosaic analysis with double markers)
MAP: microtubule-associated protein
MAPK : mitogen-activated protein kinase
MCPH1 : Microcephalin 1
MDC: malformation du développement cortical
MLC : Myosin Light Chain
MLCK : Myosin Light Chain Kinase
MLCP : Myosin Light Chain Phosphatase
MNI : migration nucléaire intercinétique
MP : multipolaire
MPS1 : monopolar spindle protein 1
MT : microtubule
MTOC : centre organisateur des MTs
MZ : midline zipper

NBEA : neurobeachin
Ndel1 : nuclear distribution gene E-like homolog 1
NE : cellule neuroépithéliale
Nf1a : nuclear factor 1A
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
NUAK1: NUAK family kinase 1
NuMA : Nuclear mitotic apparatus protein

P : jour post-natal
PA : progéniteur apical
PAK1 : P21 Activated Kinase 1
PB : progéniteur basal
PC : plaque corticale
PI3k : phosphoinositide 3-kinase
PIa/b : progéniteur intermédiaire apical/basal
Plk4 : Polo Like Kinase
PMG : polymicrogyrie
POSH : plenty of SH3s
PV : Parvalbumine
Prc2 : Polycomb repressor complex 2

PTPN21 : Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 21

RAC1/2/3: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1/2/3
rCC : regulatory coiled-coil
RE: reticulum endoplasmique
Reln: Reelin
ROCK : Rho-associated protein kinase

SAD-A/B: Synapses of the Amphid Defective A/B
SAP : subapical progenitor
SFK : Src family kinase
Shh : Sonic hedgehog
SNP : short neural precursors
SP: sous-plaque
Srpx2 : Sushirepeat containing protein,X-linked 2 STOP : stable tubule-only polypeptide
STT: Somatostatine
SVBP : small vasohibin-binding protein

+TIP : Microtubule plus-end tracking protein
Tbc1d24 : TCB1 domain family member 24
TRAK1/2 : Trafficking Kinesin Protein 1/2
TRIM3: Tripartite motif-containing protein 3
TrkBR : Tyrosin Kinase B Receptor
TSA : trouble du spectre autistique
TTL : tubuline-tyrosine-ligase
TUBA/B/G : Tubuline α/β/γ

VAMP3 : vesicle-associated membrane protein 3
Vasp : Vasodilator-stimulated phosphoprotein
VIP : vasoactive intestinal polypeptide

WAVE : WASP family verprolin-homologous protein
Wnt : Wingless-related integration site

ZI: zone intermédiaire
ZM : zone marginale
ZSV : zone sous-ventriculaire
ZV : zone ventriculaire

Liste des figures

Figure 1 : Représentation d'un cerveau adulte humain (gyrencéphalique) et murin (lissencéphalique). 19

Figure 2 : Organisation du cortex cérébral humain. 20

Figure 3 : Organisation histologique du néocortex. 21

Figure 4 : Vue d'ensemble schématique du développement embryonnaire du système nerveux central. 22

Figure 5 : Mise en place du système nerveux. 22

Figure 6 : Origine embryonnaire du cortex cérébral. 23

Figure 7 : Les différents types d'interneurones du cortex cérébral et leur origine embryonnaire. 24

Figure 8 : Vue d'ensemble du développement cortical chez la souris. 27

Figure 9 Diversité morphologique et distribution des progéniteurs corticaux chez la souris et le primate. 29

Figure 10 : Migration nucléaire intercinétique (MNI) chez les progéniteurs apicaux 30

Figure 11 : Les différents modes de division des progéniteurs corticaux. 32

Figure 12 : Deux modèles ont initialement été proposés pour expliquer la spécification des neurones de projection du cortex cérébral. 42

Figure 13 : Modèle proposé par Telley et coll., en 2019. 45

Figure 14: Les différents modes de migration des neurones du cortex cérébral. 46

Figure 15: Morphologie de l'interneurone en migration et nucléokinèse. 47

Figure 16 : Le complexe Elongator participe à la migration des interneurones corticaux en contrôlant la nucléokinèse et la dynamique du branchement. 49

Figure 17 : Organisation laminaire des différents types de neurones de projection du cortex cérébral. 53

Figure 18 : Les différents modes de migration des neurones pyramidaux. 53

Figure 19 : Les étapes séquentielles de la migration neuronale radiaire. 54

Figure 20 : La transmission synaptique des neurones de la sous-plaque contrôle la migration radiaire des neurones de projection. 56

Figure 21 : Modifications morphologiques des neurones de projection et des interneurones en migration. 57

Figure 22 : Structure et dynamique des micrtotubules. 60

Figure 23 : Organisation du cytosquelette de MTs et distribution des modifications post-traductionnelles au sein des neurones matures. 62

Figure 24 : Complexes protéiques impliqués au niveau de la membrane nucléaire et permettant le couplage entre le centrosome et le noyau lors de la migration. 66

Figure 25 : Les chaines légères intermédiaires de la dynéine LIC1 et LIC2 jouent des rôles distincts au cours du développement cortical. 67

Figure 26 : Structure et assemblage du filament d'actine. 69

Figure 27 : Organisation de l'actine dans l'axone de neurones issus de cultures primaires. 70

Figure 28 : Principales molécules et voies de signalisation impliquées dans la régulation de la migration radiaire. 73

Figure 29 : La voie de signalisation Reelin-Dab1 et les acteurs moléculaires impliqués dans la migration radiaire. 74

Figure 30 : Les différents types de neurones de projection du cortex cérébral. 76

Figure 31 : L'interaction entre les différents facteurs de transcription régule la spécification neuronale. 77

Figure 32 : Mise en place de la polarité neuronale in vitro et au cours du développement cortical. 78

Figure 33 : Position du centrosome au cours de la polarisation neuronale. 80

Figure 34 : Formation des branches axonales collatérales. 82

Figure 35 : Réorganisation des cytosquelettes au cours de la formation d'une branche collatérale. 83

Figure 36 : Organisation des cytosquelettes d'actine et de microtubules dans le cône de croissance. 84

Figure 37 : Schéma récapitulatif des principaux processus de régulation du guidage axonal. 85

Figure 38 : Régulation des protéines GTPases par les GEFs et les GAPs. 86

Figure 39 : Remodelage du cytosquelette d'actine par les protéines GTPase, dans le cône de croissance. 87

Figure 40 : Développement du corps calleux. 94

Figure 41 : Mécanisme du guidage axonale au niveau de la ligne médiane. 96

Figure 42 : Rôle des axones pionniers et des interactions axonales dans le développement du corps calleux chez la souris. 97

Figure 43 : Connexions intra-corticales établies par les neurones callosaux des couches corticales II/III dans la couche V. 97

Figure 44 : Les différents types de moteurs moléculaires et leurs structures. 101

Figure 45 : Diversité des kinésines. 102

Figure 46 : Régulation de la liaison kinésine-cargos pat trois mécanismes différents. 106

Figure 47 : La polarité du réseau de MTs, les modifications post-traductionnelles et les MAPs sont distribuées de façon hétérogène dans les différents compartiments neuronaux. 110

Figure 48 : Mécanisme de filtrage sélectif opéré par le segment initial pour empêcher l'entrée de Kif17 dans le compartiment axonal. 111

Figure 49 : Exemples de mécanismes de l'auto-inhibition des kinésines. 112

Figure 50 : Schéma récapitulatif des kinésines impliquées dans le développement cortical. 118

Figure 51 : Régulation de la migration nucléaire intercinétique par les moteurs moléculaires Kif1a et dynéine. 119

Figure 52 : Fonctions de Kif20a durant la division des progéniteurs neuraux. 120

Figure 53 : Régulation de la migration neuronale par Kif11 (kinésine-5). 123

Figure 54 : Conséquence de l'inhibition de Kif20b dans la polarisation des neurones de cultures primaires. 124

Figure 55 : Structure de la protéine KIF21B humaine. 128

Figure 56 : Profil d'expression de Kif21b chez la souris. 129

Figure 57: KIF21B est un facteur de pause des MTs. 132

Figure 58 : Schéma récapitulatif des fonctions de Kif21b au sein des neurones. 135

Figure 59 : Les mutations dominantes peuvent avoir un effet gain de fonction ou dominant négatif. 221

Figure 60 : Un niveau minimal d'auto-inhibition est requis pour le développement cortical normal. 227

Introduction

Introduction générale

Le développement du cortex cérébral résulte de processus successifs finement régulés qui impliquent la prolifération des progéniteurs corticaux, la migration neuronale, la maturation des neurones et l'établissement des connections neuronales. La perturbation de l'un ou plusieurs de ces processus (prolifération, migration, maturation) peut conduire à des maladies neuro-développementales telles que les malformations du développement cortical (MDC ; les microcéphalies, les lissencéphalies, les hétérotopies, les polymicrogyries), les tubulinopathies, des agénésies du corps calleux ou encore de la déficience intellectuelle (DI).

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux fonctions de la kinésine **Kif21b** dans le développement cortical. Kif21b appartient à la superfamille des kinésines (KIF), moteurs moléculaires qui utilisent le cytosquelette de microtubules (MT) pour transporter diverses organelles et vésicules dans la cellule. Plusieurs études utilisant des modèles murins génétiquement inactivés (knock-out, KO) pour des gènes codant pour différentes kinésines ou bien utilisant des shRNAs ont mis en lumière le rôle essentiel de ces kinésines dans plusieurs étapes clés du développement cortical. Par ailleurs, de nombreuses mutations génétiques conduisant à des MDCs chez l'humain ont été identifiées dans des gènes codant pour des kinésines, suggérant un rôle clé de ces moteurs moléculaires dans la corticogenèse. Une meilleure connaissance du rôle des kinésines au cours du développement cortical est donc essentielle pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires conduisant à ces pathologies neuro-développementales.

L'introduction de cette thèse se divise en deux chapitres: en chapitre 1, je présenterai les principales étapes du **développement du cortex cérébral** et détaillerai les mécanismes cellulaires moléculaires impliqués, en me concentrant sur plus particulièrement sur les rôles des cytosquelettes d'actine et de MTs dans ces différents processus. Dans un deuxième temps (chapitre 2), je présenterai les **kinésines** et leurs rôles au cours du développement cortical. Je présenterai d'abord quelques généralités sur les grandes fonctions et les principaux mécanismes de régulation de ces moteurs moléculaires, puis je détaillerai plusieurs études récentes qui mettent en évidence le rôle de ces kinésines dans le développement cortical. Enfin, je terminerai cette introduction en décrivant les fonctions actuellement connues de **KIF21B**.

Chapitre 1 : Le développement cortical

I. Généralités sur le cortex cérébral adulte

A. Structure et fonctions du cortex cérébral

Le cortex cérébral (ou néocortex) est une structure complexe du cerveau des mammifères qui désigne la couche externe supérieure de l'encéphale. Il est le siège principal des fonctions nerveuses sensorielles et cognitives complexes telles que la motricité volontaire, la sensibilité, la mémoire, la conscience ou encore le langage. Au cours de l'évolution, le cortex cérébral a augmenté sa surface de façon considérable conduisant ainsi à l'apparition de sillons (ou scissures), délimitant des crêtes appelées circonvolutions cérébrales (Sousa et al., 2017) : on parle alors d'espèce gyrencéphale, par opposition aux espèces lissencéphales (rat, souris) qui présentent un cortex lisse, dépourvu de circonvolutions (**Figure 1**).

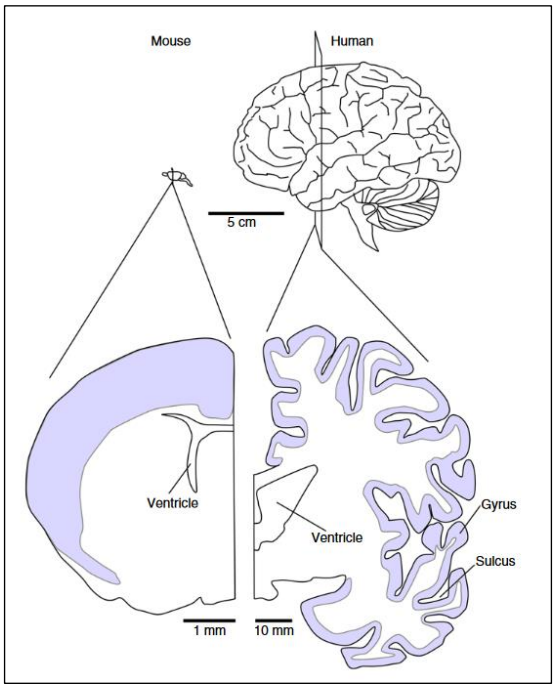


Figure 1 : Représentation d'un cerveau adulte humain (gyrencéphalique) et murin (lissencéphalique).
Schéma d'un cerveau de souris (gauche) et d'un cerveau humain (droite) et sections coronales respectives. La substance grise (contenant les corps cellulaires des neurones) est colorée en violet. (Namba and Huttner, 2017).

Le cortex cérébral est divisé en zones fonctionnelles appelées « aires » qui se distinguent les unes des autres par l'épaisseur relative de leur couche cellulaire. On distingue trois types d'aires corticales : 1) les aires motrices, 2) les aires sensitives et 3) les aires associatives (illustrées en **Figure 2**), chacune assurant une fonction cognitive précise (Jabaudon, 2017). Les aires motrices participent au contrôle des mouvements volontaires des muscles du corps. Elles sont situées dans la partie postérieure du lobe frontal. Les aires sensitives participent aux fonctions des sensations et sont situées dans les lobes pariétaux, temporaux et occipitaux. Enfin, les aires associatives sont impliquées dans le traitement de l'information et les processus cognitifs complexes comme la

mémoire, le langage, la planification etc... Elles sont situées au niveau des lobes frontaux et pariétaux (Jabaudon, 2017).

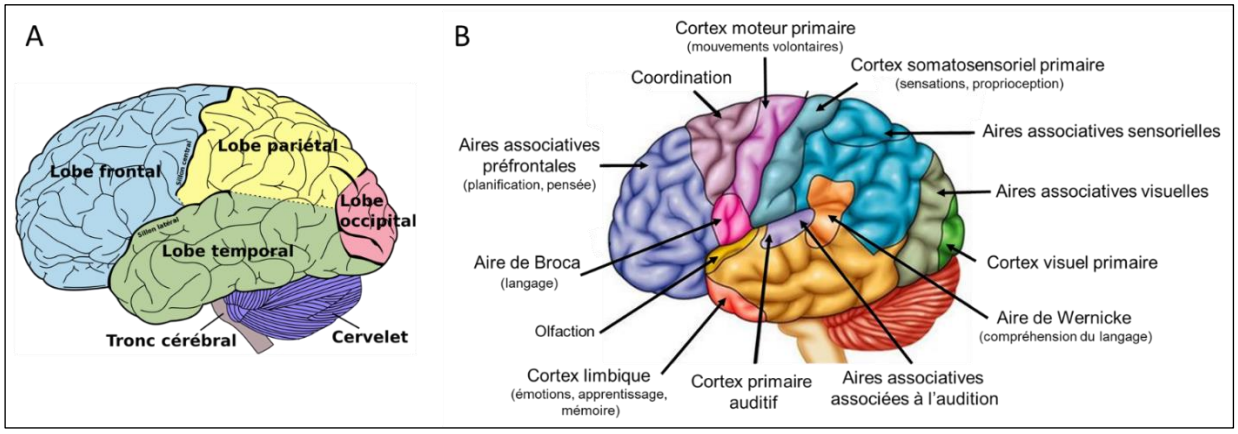


Figure 2 : Organisation du cortex cérébral humain.
(A) Les sillons les plus profonds du cortex cérébral le divisent en 4 lobes : lobe frontal, lobe pariétal, lobe occipital et lobe temporal (Image issue de wikipedia.org). (B) Le cortex cérébral est divisé en aires fonctionnelles assurant chacune une fonction cognitive précise.

B. Composition cellulaire du cortex cérébral

Le cortex cérébral contient des centaines de classes différentes de **neurones corticaux** et de **cellules gliales.**

Les cellules gliales comprennent : 1) les astrocytes, qui assurent en grande partie l'approvisionnement en nutriments et le métabolisme énergétique des neurones; 2) les oligodendrocytes, qui produisent la gaine de myéline entourant les axones du système nerveux central et qui sont donc essentiels à la propagation de l'influx nerveux, et 3) les cellules microgliales qui assurent la défense immunitaire du système nerveux central (Allen and Lyons, 2018).

Les neurones corticaux sont divisés en deux grandes classes : 1) les neurones pyramidaux (ou de projection) et 2) les interneurones. Les **neurones de pyramidaux**, aussi appelés neurones glutamatergiques excitateurs, constituent la population majoritaire de neurones corticaux (70-80%) du cortex cérébral (Florio and Huttner, 2014). Histologiquement, le cortex cérébral est divisé en 6 couches (I-VI) basées sur la distribution, la densité et la taille des corps cellulaires des neurones pyramidaux qui les composent (**Figure 3**). Chaque couche corticale contient un ou plusieurs sous-type(s) de neurone pyramidal qui expriment des facteurs de transcription spécifiques et dont l'axone projette vers des régions cérébrales distinctes : les neurones des couches corticales profondes (V et VI) expriment les facteurs de transcription Tbr1 et Fezf2 et projettent vers des structures sub-corticales (moelle épinière, le tronc cérébral, le thalamus) tandis que les neurones des couches superficielles (II, III, IV) expriment le facteur de transcription Satb2 et projettent au sein du cortex cérébral (connections intra- et inter- hémisphériques) mais jamais en dehors (Molyneaux et al., 2007a) (voir § V-A). Les neurones de projections sont indispensables à la transmission de l'information entre les régions corticales et extra-corticales. Au contraire des neurones de projection, les **interneurones** corticaux sont principalement inhibiteurs et sécrètent l'acide gamma-

aminobutyrique (GABA). Leurs axones ne quittent pas le cortex et se limitent à un environnement local, modulant ainsi les réponses des cellules pyramidales (Faux et al., 2012; Wamsley and Fishell, 2017). Ces deux classes de neurones ont des origines embryonnaires différentes : les neurones de projection naissent dans les zones ventriculaires (ZV) et sous-ventriculaires (ZSV) du télencéphale dorsal, tandis que les interneurones naissent dans les éminences ganglionnaires (EG). Du fait de leurs origines distinctes, ils entreprennent des types de migration différents pour rejoindre le cortex : la migration radiale pour les neurones de projection et la migration tangentielle pour les interneurones.

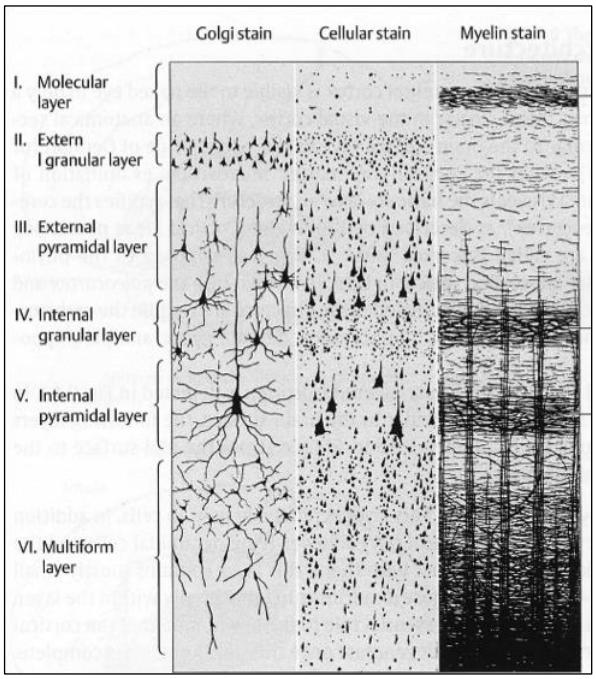


Figure 3 : Organisation histologique du néocortex. Le cortex cérébral est composé de 6 couches corticales (de la plus superficielle à la plus profonde) : I, Moléculaire (contient essentiellement des fibres axonales et dendritiques mais aussi quelques neurones de Cajal-Retzius) ; II, Granulaire externe (neurones granulaires récepteurs) ; III, Pyramidale externe (cellules pyramidales effectrices, qui projettent leurs axones vers d'autres régions corticales) ; IV, Granulaire interne ; V, Pyramidale interne (cellules pyramidales qui projettent vers la moelle épinière, le tronc cérébral et vers d'autres structures de l'encéphale et VI, Polymorphe (neurones qui projettent en direction du thalamus). (Issue de *www.learnneurosurgery.com*).

II. Origine embryonnaire du cortex cérébral

Le développement du cerveau débute durant la gastrulation par l'apparition de la plaque neurale. Celle-ci s'épaissit pour former des bourrelets neuraux qui se rejoignent pour donner le tube neural au jour embryonnaire 9 (E9) chez la souris (Colas and Schoenwolf, 2001; Eom et al., 2013). La partie antérieure du tube neural se divise en trois puis en cinq vésicules (**Figure 4**). La vésicule la plus antérieure (le prosencéphale) donne naissance au télencéphale qui se divise en deux vésicules télencéphaliques (à l'origine des futurs hémisphères cérébraux).

Le télencéphale (vésicule la plus antérieure) se régionalise selon un axe dorso-ventral sous l'influence de différents gradients de morphogènes. Dans un premier temps, le signal Shh (sonic hedgehog) est sécrété ventralement par le plancher du tube neural et la notochorde et diffuse vers la partie dorsale (Ericson et al., 1995). Il supprime le devenir dorsal des cellules en réprimant l'expression des gènes *Pax7, Pax3, Msx1* et *Msx2* et en augmentant l'expression de gènes ventraux tels que *Nkx2.1* (**Figure 5 B, C**). A l'inverse, les facteurs BMP (bone morphogenetic protein) (Furuta et al., 1997) et Wnt (Wingless-related integration site) (Lee et al., 2000), sécrétés dorsalement par l'ectoderme, suppriment les devenirs cellulaires ventraux et imposent un devenir dorsal (**Figure 5**

C). Ainsi, la combinaison des actions dorsalisantes (BMP/Wnt) et ventralisantes (Shh) des gradients morphogéniques conduit les cellules à exprimer des facteurs de transcriptions spécifiques.

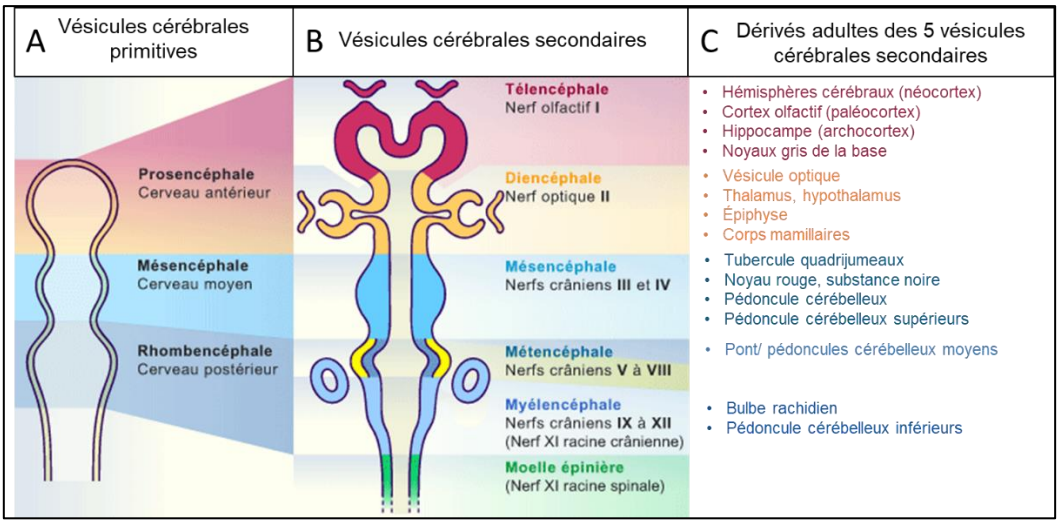


Figure 4 : Vue d'ensemble schématique du développement embryonnaire du système nerveux central. Le tube neural primitif se régionalise en 3 vésicules cérébrales primitives (A) qui se diviseront en 5 vésicules secondaires (B), dont les dérivés adultes sont détaillés en (C). (Adapté de www.embryology.ch).

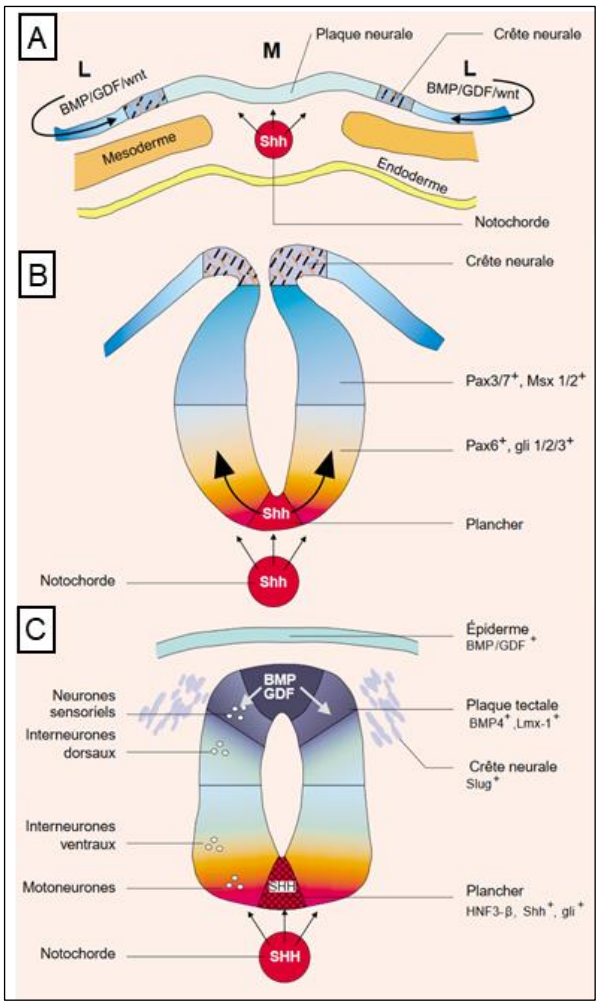


Figure 5 : Mise en place du système nerveux.
(A) La plaque neurale s'épaissit puis se creuse pour former la gouttière neurale par un relèvement de ses bords latéraux (B). Puis, les bords de la plaque neurale se rejoignent dorsalement formant le tube neural qui se ferme à partir de E9 chez la souris (C). L'établissement de l'axe dorso-ventral nécessite l'action de deux gradients de morphogènes opposés : le gradient Shh, qui diffuse ventralement à partir du plancher du tube neural et de la notochorde, et les gradients BMP/GDF et Wnt, qui diffusent dorsalement à partir de l'ectoderme neural. L'action opposée des signaux BMP/Wnt et Shh conduit à l'expression de différents facteurs de transcriptions représentés sur le schéma en (C). (Adapté de Hemmati-Brivanlou, 2000).

A E11, le télencéphale murin est alors divisé en trois grandes régions : 1) la région dorsale (aussi appelée pallium) à l'origine du cortex cérébral ; 2) la région latérale, d'où dérivent les éminences ganglionnaires latérales (EGL) et 3) la région ventrale, d'où dérivent les éminences ganglionnaires médianes (EGM) (**Figure 6**) (Rallu et al., 2002). La neurogenèse débute alors dans les parties dorsales et ventrales du télencéphale qui génèrent respectivement les neurones de projection et les interneurones (**Figure 6 B**) (Florio and Huttner, 2014; Welagen and Anderson, 2011).

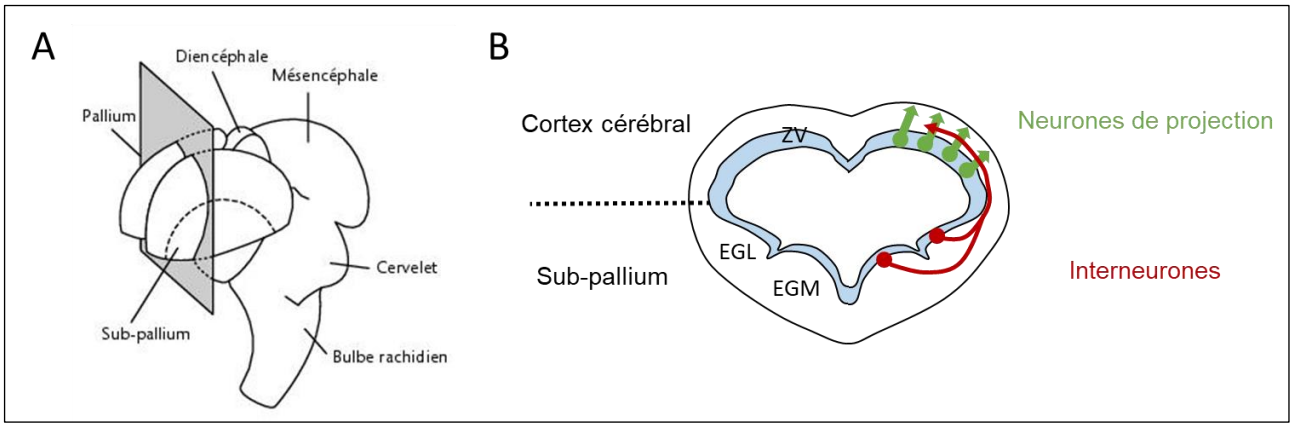


Figure 6 : Origine embryonnaire du cortex cérébral.
(A) Le télencéphale est subdivisé en pallium et sub-pallium. (B) Coupe coronale selon le plan indiqué en (A) : la région dorsale donne naissance au cortex cérébral et la région ventrale donne naissance aux éminences ganglionnaires latérales (EGL) et médianes (EGM). Les neurones de projection excitateurs (en vert) naissent dans la zone ventriculaire (ZV) du cortex cérébral dorsal tandis que les interneurones inhibiteurs (en rouge) naissent la ZV des EGL et EGM. Ces deux types de neurones migrent vers leurs couches corticales appropriées selon deux modes de migration représentées par des flèches : migration radiaire pour les neurones de projection et migration tangentielle pour les interneurones. (Adapté de Narboux-Nême and Gaspar, 2008).

III. La neurogenèse

Le développement cortical est un processus qui nécessite la génération d'un grand nombre de neurones et de cellules gliales, la migration des neurones jusqu'à leur couche corticale appropriée et enfin la mise en place de la connectivité neuronale. Après la spécification dorso-ventrale du cortex, différents types de progéniteurs sont générés et vont donner naissance aux neurones (**Figure 6 B**) et aux cellules gliales. Les progéniteurs d'interneurones se distinguent des progéniteurs corticaux par leurs caractéristiques moléculaires et morphologiques propres qui ne seront pas présentées en détail dans cette partie, puisque mon travail de thèse s'est principalement concentré sur les mécanismes de la migration radiaire des neurones de projection et sur la mise en place des connectivités corticales.

A. Génération des interneurones corticaux

Chez la souris, les interneurones corticaux naissent dans le sous-pallium embryonnaire à partir de trois sources principales: l'éminence médiane ganglionnaire (EGM), l'éminence ganglionnaire caudale (EGC) et l'aire pré-optique (APO) (**Figure 7 A**) (Welagen and Anderson,

2011). Chacune de ces régions contient des progéniteurs neuronaux qui donnent naissance à des populations d'interneurones très hétérogènes. Environ 50 sous-types d'interneurones ont été identifiés et classés selon leurs caractéristiques morphologiques et moléculaires (Lim et al., 2018a). Classiquement, les interneurones sont divisés en 3 classes suivant l'expression d'un marqueur spécifique : la parvalbumine (PV), la somatostatine (SST) et le récepteur à la sérotonine ionotropique (5HT3aR) (Miyoshi et al., 2010; Rudy et al., 2011; Xu et al., 2008) (**Figure 7 B**). Ces trois classes d'interneurones sont sous-divisées en plusieurs groupes selon leurs caractéristiques morphologiques, cellulaires et subcellulaires, l'expression de marqueurs additionnels spécifiques (comme par exemple la calrétinine, la Reelin, le neuropeptide Y, la protéine VIP), leurs propriétés synaptiques ou électrophysiologiques (Lim et al., 2018a).

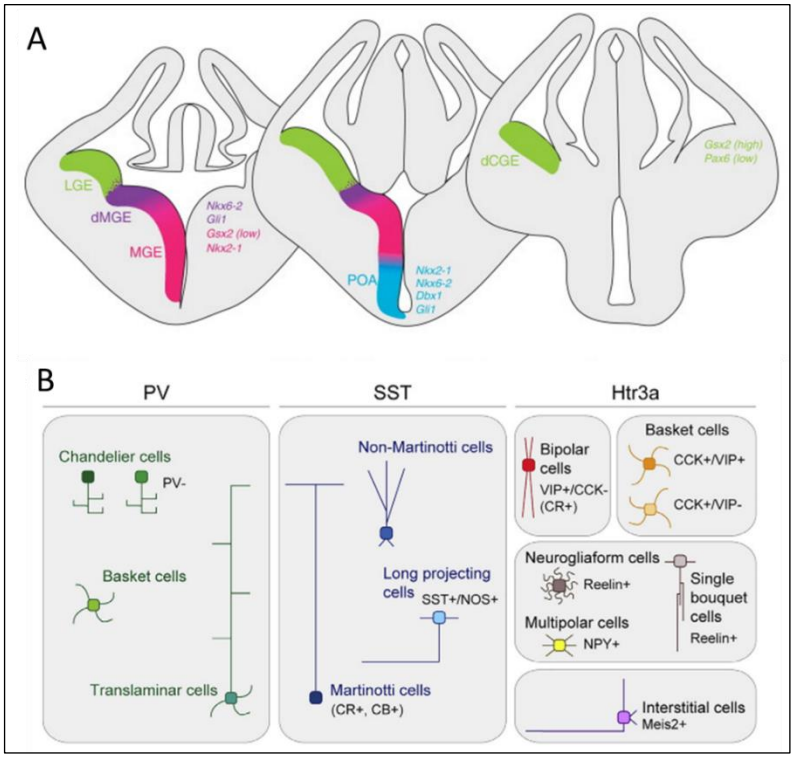


Figure 7 : Les différents types d'interneurones du cortex cérébral et leur origine embryonnaire.
(A) Les interneurones naissent dans les éminences ganglionnaires médianes (MGE) et caudales (CGE) et dans l'aire pré-optique (POA). Ces différentes zones progénitrices sont identifiées par l'expression de différents facteurs de transcription représentés sur le schéma. (B) Les différents sous-types d'interneurones corticaux peuvent être divisés en trois groupes selon l'expression de marqueurs moléculaires spécifiques : la parvalbumine (PV), la somatostatine (SST) et le récepteur à la sérotonine ionotropique (5HT3aR). Ces trois classes d'interneurones sont elles-mêmes sous divisées en plusieurs groupes selon différents critères morphologiques et moléculaires. (Adapté de Kessaris et al., 2014; Lim et al., 2018).

Contrairement aux EGM, EGC et à l'APO, il a été proposé que les EGL ne génèrent pas d'interneurones corticaux (Miyoshi et al., 2010; Wonders and Anderson, 2006). Cependant, puisqu'il n'existe pas de souris conditionnelle génétiquement modifiée permettant de suivre le devenir des interneurones corticaux dérivés de l'EGL, la contribution des EGL dans la génération des interneurones corticaux reste peu connue à l'heure actuelle.

Il est intéressant de noter que l'ensemble de ces EG génère, en plus des interneurones corticaux, des interneurones qui vont migrer vers d'autres régions du cerveau comme le cortex piriforme, l'hippocampe, le striatum et le bulbe olfactif (Potter et al., 2009; Xu et al., 2008). De plus, bien que la majorité des interneurones issus des EG soient de type GABAergique, les EG génèrent également des interneurones de type cholinergique et dopaminergique ainsi que des oligodendrocytes (Fragkouli et al., 2009; Hoch et al., 2015; Petryniak et al., 2007).

1. Spécification des éminences ganglionnaires

a. Les EGM

La majorité des interneurones nait dans les EGM entre E11 et E17 et migre tangentiellement vers le cortex. La neurogenèse dans les EGM débute autour de E9,5 et le pic de neurogenèse est atteint à E13,5. Les EGM sont responsables de la génération de 50 à 60 % des interneurones et produisent en majorité deux classes d'interneurones : les interneurones exprimant la SST (STT+) et les interneurones exprimant la PV (PV+) (Butt et al., 2005; Fogarty et al., 2007; Xu et al., 2004).

Les gènes *Dlx1* et *2*, exprimés par les progéniteurs de la zone ventriculaire (ZV), sont essentiels à la génération et à la migration de l'ensemble des interneurones corticaux. Des souris inactivées pour ces gènes présentent un défaut de migration tangentielle et donc une diminution du nombre d'interneurones GABAergiques (Anderson et al., 1997). Les EGM sont spécifiées dès E9,5 par l'expression des facteurs de transcription Nkx2-1 (Nk2 homeobox 1) et Otx2 (orthodenticle homeobox 2) (Butt et al., 2008; Hoch et al., 2015). Nkx2-1 induit l'expression des gènes *Lhx6* et *Lhx8* dans la ZSV, qui sont requis pour l'expression de Shh et impliqués dans la génération et la survie des interneurones générés tardivement (Flandin et al., 2011). Par ailleurs, l'expression de *Lhx6* dans les progéniteurs et dans les interneurones induit l'expression de gènes spécifiques (tels que *Sox6, Satb1, Arx*), essentiels à la spécification (différenciation en neurones PV+ et SST+) et à la migration tangentielle (Close et al., 2012; Liodis et al., 2007; Vogt et al., 2014; Zhao et al., 2008).

La ZV des EGM est constituée de 5 zones progénitrices différentes selon leur profil d'expression génique (Flames et al., 2007) qui divisent les EGM en trois grands domaines : dorsaux, intermédiaires et caudo-ventraux. De manière intéressante, ces différentes régions donnent naissance à différents types d'interneurones corticaux : la région la plus dorsale des EGM génère des interneurones STT+ tandis que la région la plus ventrale génère des interneurones PV+ (Flames et al., 2007). Puisque le facteur de transcription Nkx2-1 est exprimé uniquement dans les progéniteurs de la ZV, cette subdivision pourrait être médiée par le gradient dorso-ventral de Shh. L'induction du signal Shh dans la partie ventrale contribue en effet à la génération des interneurones STT+ aux dépens des interneurones PV+ (Xu et al., 2010).

b. Les EGC

La neurogenèse dans les EGC débute plus tard, autour de E12,5, avec un pic de la neurogenèse à E15,5 (Butt et al., 2005). Cette région est à l'origine de 30 à 40% des interneurones du cortex. Il existe au moins 9 sous-types d'interneurones générés à partir des EGC dont les interneurones exprimant la PV et/ou la calrétinine, la Reelin et la protéine VIP (vasoactive intestinal polypeptide) (Butt et al., 2005; Lee et al., 2010; Miyoshi et al., 2010; Xu et al., 2004). Le facteur de transcription Gsx2, fortement exprimé dans les EGC, joue un rôle important dans la génération des interneurones corticaux exprimant la calrétinine (Xu et al., 2010). Gsx2 induit par ailleurs l'expression de Ascl1 et de Dlx2 qui contribuent à la maturation et à la spécification des interneurones. D'autres facteurs de transcription tels que Nr2f1 et 2 (aussi connus sous les noms de Couptf1 et 2) (Kanatani

et al., 2008; Lodato et al., 2011a) et Sp8 (Ma et al., 2012) sont également exprimés dans les EGC, mais ils ne sont pas spécifiques des EGC puisqu'on les retrouve également dans les EGM dorsales et l'APO. Il a été montré cependant que le récepteur à la sérotonine ionotropique (5HT3aR) est sélectivement exprimé dans les interneurones issus des EGC (Lee et al., 2010) et qu'il est essentiel à leur migration tangentielle vers le cortex (Murthy et al., 2014).

c. L'APO

Enfin, l'APO est à l'origine de 10% des interneurones corticaux (Gelman et al., 2009), caractérisés par l'expression du facteur de transcription Dbx1 (Gelman et al., 2011). La partie la plus dorsale de l'APO exprime spécifiquement *Hmx3*, tandis que les cellules de la partie ventrale expriment *Dbx1* et *Nkx6.2* (Flames et al., 2007; Gelman et al., 2011, 2009).

2. Régulation spatio-temporelle de la génération des interneurones

Flames et coll. ont proposé que la diversité des interneurones puisse s'expliquer par leur localisation différentielle dans les EG. Les auteurs suggèrent que les différents groupes de progéniteurs présents dans les EGM et EGC donneront naissance à différents types d'interneurones suivant leur profil transcriptionnel. Ainsi, la région la plus dorsale des EGM génère des interneurones STT+ tandis que la région la plus ventrale génère des interneurones PV+ (Flames et al., 2007).

En plus de ce contrôle spatial, il a été montré que la date de naissance des interneurones contribue également à leur identité et pouvait influencer leur profil physiologique intrinsèque dans le cortex mature (Butt et al., 2005). Les interneurones générés dans les EGM colonisent ainsi les différentes couches corticales selon un mécanisme « Inside-out » : les interneurones générés précocement occupent les couches corticales profondes (couches V) tandis que les interneurones générés plus tardivement occupent les couches superficielles (couches II et III). Par ailleurs, chaque cohorte d'interneurones possède ses propres propriétés électrophysiologiques selon leur date de naissance (Miyoshi et al., 2007; Yozu et al., 2004). Contrairement aux interneurones issus des EGM, il a été montré que les différents sous-types d'interneurones générés par les EGC ne présentent pas de différences au cours du temps. De plus, la date de naissance des interneurones dérivés des EGC n'a pas d'effet sur leur position au sein du cortex comme c'est le cas pour les interneurones dérivés des EGM. La majorité des interneurones dérivés des EGC colonise les couches superficielles (Miyoshi et al., 2010).

Une étude récente a montré que le mode de division cellulaire des progéniteurs d'interneurones pouvait également influencer leur destin cellulaire. Tout comme pour les progéniteurs corticaux, les cellules progénitrices du sous-pallium s'organisent en zones ventriculaires (ZV) et sous-ventriculaires (ZSV). La ZV contient de nombreuses cellules gliales radiaires (GR) à morphologie bipolaire, qui étendent un prolongement basal et apical et dont le noyau entreprend une migration nucléaire intercinétique (MNI) et se divise à la surface ventriculaire. Les cellules GR peuvent se diviser de façon symétrique (pour augmenter la population de progéniteurs) ou bien de façon asymétrique générant une cellule GR et un progéniteur basal (PB)

qui se positionne alors dans la ZSV. Les PB se divisent alors de façon symétrique pour générer deux interneurones (Pilz et al., 2013). Petros et coll., ont montré qu'au cours du développement précoce, les divisions asymétriques dans la ZV des EGM génèrent principalement des interneurones STT+ tandis que les interneurones PV+ sont générés plus tardivement à partir de PB localisés dans la ZSV (Petros et al., 2015).

B. Génération des neurones de projection corticaux

Le développement du cortex cérébral résulte de processus successifs finement régulés mettant en jeu : 1) la prolifération des progéniteurs corticaux (E8,5-E11), 2) la génération des neurones pyramidaux (neurogenèse, E11-E17) et des cellules gliales (gliogenèse, E17-naissance), 3) la migration radiaire de ces neurones jusqu'à leurs couches corticales appropriées et 4) la maturation des neurones (axogenèse, dendritogenèse, synaptogenèse) et l'établissement de leurs connections (**Figure 8**).

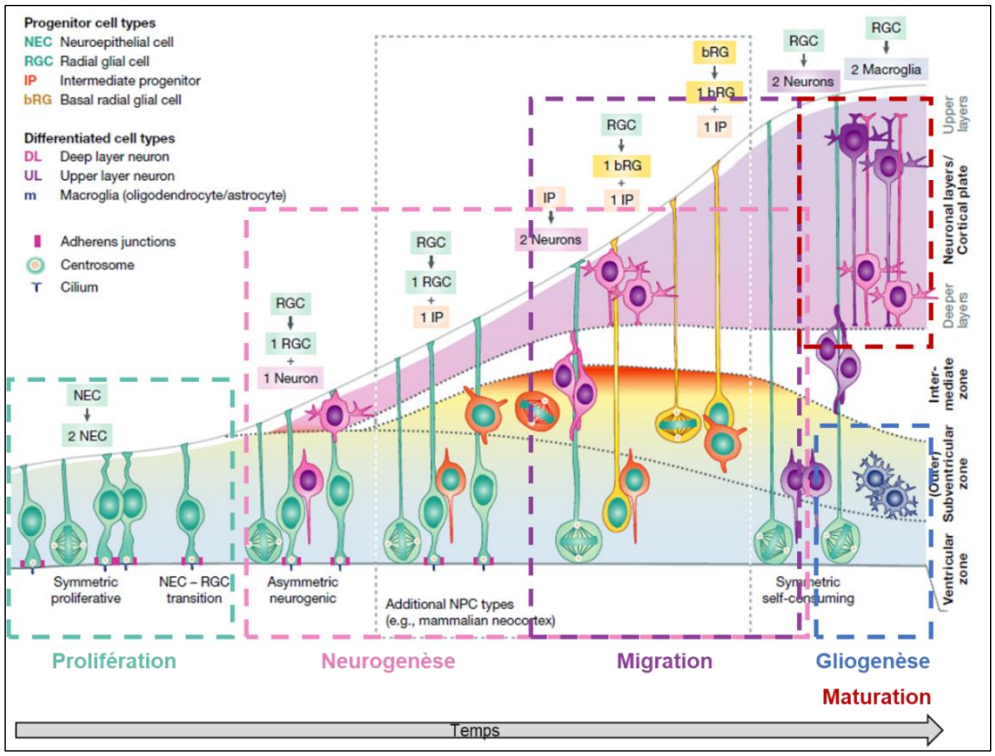


Figure 8 : Vue d'ensemble du développement cortical chez la souris.
Durant la phase d'extension latérale, les cellules neuroépithéliales (NEC) se divisent pour donner naissance à deux cellules NECs. Les NEC deviennent progressivement des cellules gliales radiaires (RGC) qui, par divisions asymétriques, génèrent un RGC et un progéniteur intermédiaire (IP), un RGC et un neurone (N) ou bien un RGC et une cellule gliale radiaire basale (bRG). Les IP génèrent deux neurones. Les neurones migrent vers les régions supérieures du cortex et forment les couches corticales. Durant la phase de gliogenèse, les RGC génèrent des astrocytes et des oligodendrocytes. (Adapté de Paridaen and Huttner, 2014).

Dans cette partie, je détaillerai dans un premier temps les différents types de progéniteurs corticaux identifiés ainsi que leur mode de division. Dans un second temps, je décrirai les différents mécanismes moléculaires impliqués dans la neurogenèse.

1. Les cellules de Cajal-Retzius (CR)

Les premiers neurones glutamatergiques générés dans le télencéphale sont les cellules de Cajal-Retzius (CR) qui colonisent la zone marginale (future couche I) et la sous-plaque corticale dès E11 chez la souris. L'origine des cellules de CR est extra-corticale : on distingue au moins trois sous-populations de cellules de CR qui migrent tangentiellement à partir de trois régions qui sont l'hème cortical, le pallium ventral, et la région du septum (Bielle et al., 2005; Ledonne et al., 2016; Takiguchi-Hayashi et al., 2004). Une étude récente a montré que les différentes sous-populations de cellules de CR ne présentent pas les mêmes cinétiques de migration, ce qui détermine leur positionnement spécifique à la surface du cortex en développement (Barber et al., 2015). L'analyse du transcriptome des différents sous-types de cellules de CR a mis en évidence 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, ce qui va influencer la taille et le degré de connectivité des aires corticales d'ordre supérieur au niveau du cortex cérébral adulte (Barber et al., 2015).

Les cellules de CR sont avant tout connues pour sécréter une glycoprotéine extracellulaire chemo-attractive, la Reelin, qui est essentielle à la migration radiaire et qui influence le positionnement des neurones de la plaque corticale (D'Arcangelo, 2005) (voir § IV-B pour le rôle des cellules de CR dans la migration radiaire). En plus de leur rôle essentiel dans la lamination du cortex au cours du développement, les cellules CR sont également impliquées dans la régulation de l'identité et la fonction des cellules de GR (Supèr et al., 2000), la différenciation des neurones occupant la plaque corticale (Kupferman et al., 2014), la mise en place des connexions hippocampiques (Del Río et al., 1997) et le contrôle temporel de la migration des interneurones (Caronia-Brown and Grove, 2011).

Les cellules de CR sont transitoires puisque chez la souris, la majorité de ces cellules disparaissent dans les semaines suivant la naissance par mort cellulaire programmée (Derer and Derer, 1990; del Río et al., 1995). De manière intéressante, les différentes sous-populations de cellules de CR ne meurent pas de façon synchrone et utilisent des mécanismes différents de mort cellulaire. En effet, les auteurs ont montré que l'expression du facteur pro-apoptotique Bax permet de réguler l'apoptose des cellules de CR issus du septum cortical, mais celle pas des cellules de CR issus de l'hème (Ledonne et al., 2016).

2. Les différents types de progéniteurs corticaux

Les progéniteurs corticaux sont classés en deux groupes selon leur morphologie et la localisation de leur division au sein du cortex. Les **progéniteurs apicaux** (PA) se divisent au niveau de la ZV qui borde le ventricule. Ils comprennent les cellules neuroépithéliales (NE), les cellules gliales radiaires apicales (GRa) et les cellules progéniteurs intermédiaires apicaux (PIa). Par opposition aux PA, les **progéniteurs basaux** (PB) sont plus hétérogènes d'un point de vue

morphologique. Ils se divisent au niveau de la ZSV et comprennent les progéniteurs intermédiaires basaux (PIb) et les cellules gliales radiaires basales (GRb) (**Figure 9**).

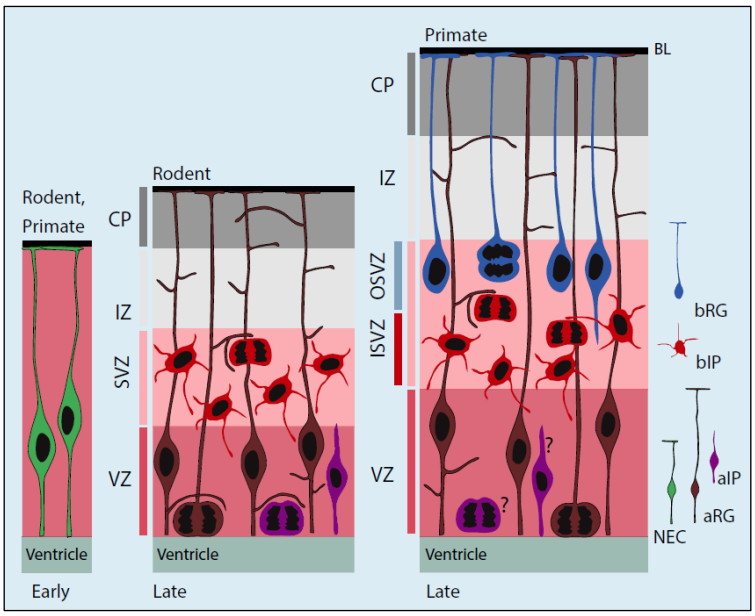


Figure 9 Diversité morphologique et distribution des progéniteurs corticaux chez la souris et le primate.
aIP, progéniteur intermédiaire apical; aRG, cellule gliale radiaire apicale; bIP, progéniteur intermédiaire basal; bRG, cellule gliale radiaire basale; CP, plaque corticale; ISVZ, zone sous-ventriculaire interne (inner subventricular zone); IZ, zone intermédiaire; NEC, cellule neuroépithéliale; OSVZ, zone sous-ventriculaire externe (outer subventricular zone); VZ, zone ventriculaire. (Govindan and Jabaudon, 2017).

a. Les progéniteurs apicaux

i. Les cellules souches neuroépithéliales (NE)

Les cellules neuroépithéliales (NE) sont des cellules progénitrices multipotentes à l'origine de toutes les cellules nerveuses et gliales du cortex cérébral adulte (à l'exception des cellules microgliales qui ont une origine extra-embryonnaire).

Avant le début de la neurogenèse (E8,5-E10,5), les cellules NE sont de forme cuboïde et constituent un épithélium pseudo-stratifié qui borde la lumière du ventricule. Elles sont reliées entre elles par des jonctions communicantes (« gap junctions », composées de sous-unités protéiques, les connexines, qui forment un pore central faisant communiquer deux cellules adjacentes) et des jonctions adhérentes (formées par les cadhérines et les caténines) et attachées à la surface ventriculaire par des jonctions serrées. Au fur et à mesure de leurs divisions, les cellules NE s'allongent et acquièrent une morphologie bipolaire, c'est à dire qu'elles sont polarisées selon un axe apico-basal : elles s'ancrent à la surface du ventricule via leur processus apical et à la membrane piale du cortex via leur processus basal plus long (**Figures 9 et 10 A**). Les cellules NE possèdent un cil primaire au niveau de la membrane apicale qui entre en contact avec le liquide céphalo-rachidien du ventricule. Le contact de la membrane basale des cellules NE avec les surfaces piale et apicale constitue une source de molécules extra-cellulaires essentielle au maintien de l'activité

proliférative des cellules NE mais également impliquée dans la régulation de la neurogenèse (Fietz et al., 2010; Raballo et al., 2000; Vaccarino et al., 1999).

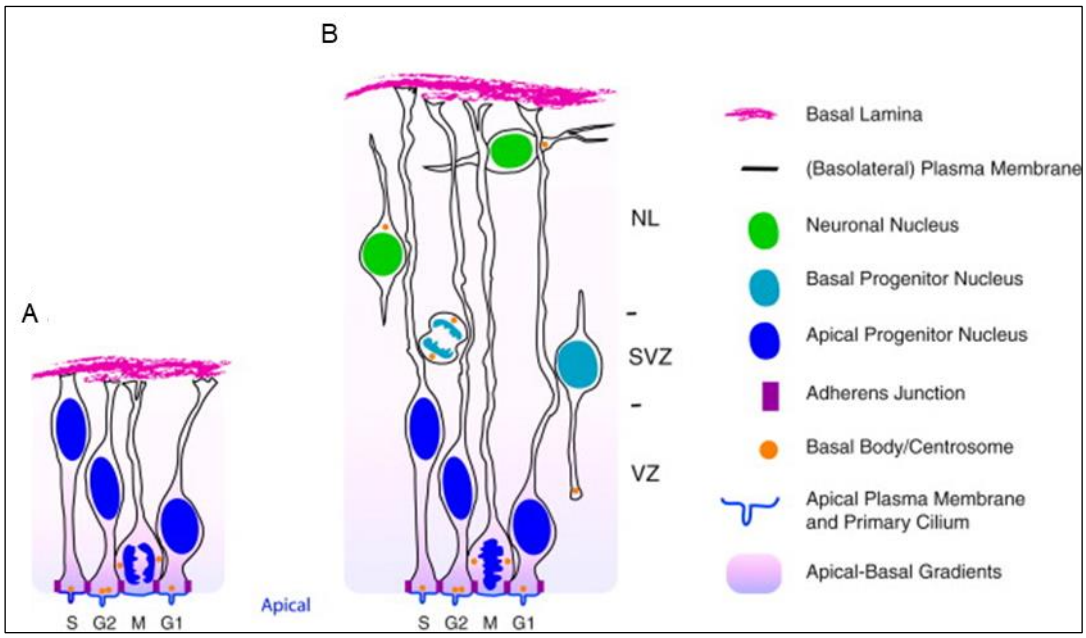


Figure 10 : Migration nucléaire intercinétique (MNI) chez les progéniteurs apicaux
Les progéniteurs apicaux (cellules neuroépithéliales (NE) (A) et cellules gliales radiaires apicales (GRa) (B)) ont une polarité apico-basale : ils s'attachent à la membrane apicale via leur processus apical et à la surface piale via leur processus basal. Ils possèdent un cil primaire à la surface de leur membrane apicale, qui entre en contact avec le liquide céphalorachidien du ventricule. Lors de leur divisions cellulaires, les noyaux des cellules NE et GRa réalisent une migration nucléaire intercinétique (MNI) au cours de laquelle leurs noyaux migrent le long de l'axe apico-basal. La mitose (M) a donc toujours lieu à la surface apicale tandis que la phase S se déroule au pôle basal. Le noyau subit donc une migration apico-basale en phase G1 et une migration baso-apicale en phase G2. Dans les cellules NE, la MNI s'étend tout le long de leur axe apico-basal. Par contraste, la MNI des cellules GRa est confinée dans la portion cellulaire qui réside dans la zone ventriculaire (VZ) ou sous-ventriculaire (SVZ) lorsque celle-ci est présente. BP, progéniteur basal ; NL, couche neuronale (Taverna and Huttner, 2010).

Les cellules NE prolifèrent par des divisions symétriques au niveau de la ZV générant deux cellules NE filles, contribuant ainsi à l'expansion latérale du tube neural. Lors de la mitose, les noyaux des cellules NE réalisent une migration nucléaire intercinétique (MNI) apico-basal, processus de migration nucléaire caractéristique des PA. Lors de ce processus, les noyaux migrent vers le pôle basal durant la phase G1 du cycle cellulaire puis vers le pôle apical durant la phase G2. La mitose a donc toujours lieu au pôle apical des cellules, au niveau de la surface ventriculaire (**Figure 10 A**) (Taverna and Huttner, 2010). La machinerie moléculaire de la MNI repose principalement sur la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine, des microtubules (MTs) et du centrosome. Les protéines associées aux MTs telles que Lis1 et les moteurs moléculaires kinésine et dynéine jouent un rôle crucial lors de la migration nucléaire (voir Chapitre 2, § II-A).

Bien que les mécanismes moléculaires de la MNI soient assez bien caractérisés, sa fonction précise dans le cerveau en développement (ou dans d'autres tissus) reste à élucider. Initialement, il a été proposé que la fonction de la MNI était d'optimiser au maximum la place occupée par les PA au niveau de la ZV en répartissant l'ensemble des noyaux sur une plus grande surface afin

d'augmenter le nombre de division des PA, conduisant ainsi à une expansion du pool de progéniteurs (Fish et al., 2008). L'inhibition de la MNI réduit la population de PA par une sortie prématurée du cycle cellulaire (Del Bene et al., 2008). De plus, il a été montré que la MNI influence indirectement le destin cellulaire des progéniteurs en contrôlant l'exposition des progéniteurs à différents signaux environnementaux le long de l'axe apico-basal. Par exemple, il existe un gradient de signalisation Notch dans la ZV avec un enrichissement au niveau la partie la plus apicale (Del Bene et al., 2008; Latasa et al., 2009). Les corps cellulaires des progéniteurs présents au niveau apical sont donc plus exposés au signal prolifératif Notch. Au contraire, les corps cellulaires les plus basaux sont moins exposés et vont donc préférentiellement se différencier (Del Bene et al., 2008; Latasa et al., 2009).

Entre E10,5 et E11,5, les cellules NE se différencient progressivement en cellules gliales radiaires apicales (GRa) ce qui marque le début de la neurogenèse (**Figure 8**). Les cellules NE perdent alors certaines de leurs propriétés épithéliales, notamment leurs jonctions serrées (Aaku-Saraste et al., 1997; Stoykova et al., 1997) et acquièrent des caractéristiques astrogliales (expression de marqueurs gliaux comme GLAST (glutamate-aspartate transporter), GFAP (Glial fibrillary acidic protein) et BLBP (Brain lipid-binding protein) (Benjelloun-Touimi et al., 1985; Levitt and Rakic, 1980). Elles gardent cependant l'expression de certains marqueurs épithéliaux (nestine) et leurs jonctions adhérentes (Hartfuss et al., 2001).

ii. Les cellules gliales radiaires apicales (GRa)

Tout comme les cellules NE, les cellules GRa sont polarisées selon un axe apico-basal, disposent d'un cil primaire au niveau de la membrane apicale et réalisent une MNI au cours de laquelle leurs noyaux reste confinés dans la portion cellulaire qui réside dans la ZV ou ZSV (**Figure 10 B**). Elles diffèrent cependant des cellules NE par la présence de granule de glycogène (Brückner and Biesold, 1981; Gadisseux and Evrard, 1985) et par l'expression de protéines spécifiques du lignage astrocytaire comme BLBP, GLAST, S100β et GFAP.

Les cellules GRa ont d'abord été décrites pour leur rôle d'échafaudage lors de la migration des neurones corticaux. Elles possèdent en effet un long prolongement basal, ancré à la surface piale, sur lequel les neurones corticaux nouvellement générés s'accrochent et migrent sur de longues distances à travers la plaque corticale (Rakic, 1971; Schmechel and Rakic, 1979). Plus tard, les cellules GRa ont été identifiées pour leur rôle de progéniteurs corticaux capables de générer directement ou indirectement les neurones pyramidaux (Malatesta et al., 2003; Noctor et al., 2001, 2002). Outre son rôle dans la locomotion des neurones corticaux, le prolongement basal des cellules GRa est une structure hautement dynamique dont le pied basal change de morphologie au cours du développement cortical (Yokota et al., 2010).

Les cellules GRa peuvent se diviser de façon **symétrique**, augmentant ainsi leur population de progéniteurs, ce qui contribue à l'expansion latérale de l'épithélium neural ou de façon **asymétrique**, donnant ainsi naissance aux progéniteurs basaux et aux neurones corticaux, ce qui

permet l'expansion radiale de l'épithélium neural (**Figure 11**). Les cellules GRa qui se divisent de façon symétrique (appelées cellules GR prolifératives) génèrent deux cellules GRa (Miyata et al., 2004; Noctor et al., 2004). Elles apparaissent vers E10,5 et expriment le facteur de transcription Pax6 (Englund et al., 2005; Heins et al., 2002). Ces cellules sont majoritaires vers E14 et disparaissent vers E17, par une division symétrique terminale générant deux neurones ou deux cellules gliales (Cai et al., 2002; Miyata et al., 2004; Takahashi et al., 1996). Il a été montré que le maintien de l'état prolifératif des cellules GRa est permis par l'activation de la voie de signalisation Notch dans ces progéniteurs (Mizutani et al., 2007). Les cellules GRa qui se divisent de façon asymétrique (appelées cellule GRa neurogénique) génèrent soit une cellule GRa et un PB (par neurogenèse indirecte), soit une cellule GRa et un neurone (par neurogenèse directe) (Miyata et al., 2004; Noctor et al., 2004) (**Figure 11 B**). Les cellules GRa qui génèrent un PB commencent à exprimer AP2γ, un facteur de transcription requis pour l'expression de Tbr2 dans le futur PB (Englund et al., 2005).

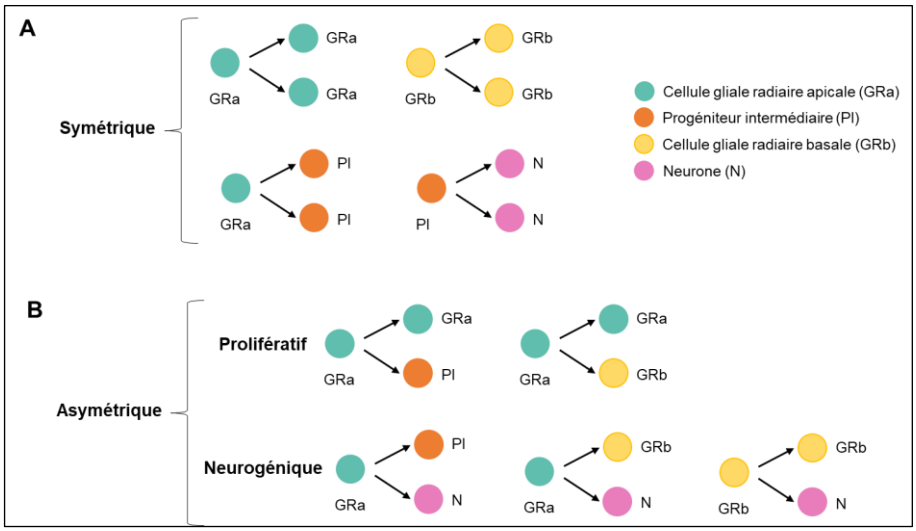


Figure 11 : Les différents modes de division des progéniteurs corticaux. Les divisions symétriques sont prolifératives (production de deux progéniteurs identiques au progéniteur de base) ou consommatrices (production de deux progéniteurs identiques mais différents du progéniteur de base ou deux neurones). Les divisions asymétriques peuvent également être prolifératives (génération d'un progéniteur identique au progéniteur de base et autre un progéniteur ou un neurone) ou neurogénique (génération d'un progéniteur différent et d'un neurone).

iii. Les progéniteurs intermédiaires apicaux (PIa)

Les progéniteurs intermédiaires apicaux (PIa), aussi appelés « short neural precursors » (SNP) représentent une petite population de progéniteurs à polarité apico-basale, localisés dans la ZV. Identifiés pour la première fois chez la souris, ils possèdent un processus apical comme les cellules GRa mais leur processus basal ne s'étend pas le long de l'épaisseur corticale et reste confinée dans la ZV (Gal et al., 2006) (**Figure 9**). Un type cellulaire similaire aux PIa corticaux a été décrit dans le télencéphale ventral murin, où il donne naissance aux interneurones (Tan et al., 2016).

Les PIa expriment la tubuline-α1 et le facteur de transcription Pax6 et très rarement Tbr2 ce qui permet de les classer comme une population de progéniteurs apicaux plutôt que basaux. Ils se divisent de manière apicale : ils sont bipolaires durant l'interphase et présentent un court processus basal dans la ZV qui se rétracte durant la mitose (Gal et al., 2006). Cependant, contrairement aux cellules GRa, les PIa n'activent pas la voie de signalisation Notch, qui assure le maintien de l'état

prolifératif des cellules GRa (Mizutani et al., 2007). De plus, les auteurs montrent que contrairement aux cellules GRa qui génèrent à la fois des neurones et des cellules gliales, les PIa génèrent principalement des neurones (Mizutani et al., 2007). Cependant, ils génèrent moins de PI que les cellules GRa et donnent naissance préférentiellement à des neurones des couches corticales profondes par neurogenèse directe (Stancik et al., 2010).

Un quatrième type de progéniteur apical appelé progéniteur sub-apical (SAP, subapical progenitor) a été identifié dans le télencéphale dorsal d'espèces gyrencéphales et dans le télencéphale ventral de la souris (Pilz et al., 2013). Les SAP s'attachent à la surface ventriculaire par leur prolongement apical mais contrairement aux PIa, ils se divisent de manière sub-apicale.

b. Les progéniteurs basaux

Les progéniteurs basaux (PB) sont issus des divisions des PA et comprennent deux sous-types de progéniteurs localisés dans la ZSV : 1) les progéniteurs intermédiaires basaux (PIb) et 2) les cellules radiale gliale basale (GRb) (**Figure 9**). Chez les primates, on retrouve ces deux types de PB en plus grande abondance dans une zone distincte appelée « outer sub-ventricular zone (oSVZ) » et localisée au-dessus de la ZSV (identique à celle retrouvée chez la souris) (**Figure 9**) (Fietz et al., 2010; Hansen et al., 2010; Kelava et al., 2012; Wang et al., 2011).

i. Les progéniteurs intermédiaires (PI)

Les progéniteurs intermédiaires (PI) sont générés à partir des NE et des cellules GRa et se détachent des jonctions adhérentes apicales présentes à la surface de ces cellules bordant le ventricule pour aller migrer dans la ZSV (**Figure 9**). Ils présentent une morphologie multipolaire et rétractent leurs processus apicaux et basaux juste avant l'entrée en mitose (Haubensak et al., 2004; Miyata et al., 2004; Noctor et al., 2004). Ils se différencient des progéniteurs apicaux en terme d'expression : ils n'expriment pas les marqueurs astrogliaux ni le facteur de transcription Pax6, mais expriment Tbr2 (Englund et al., 2005), Cux1 et Cux2 (Conti et al., 2005), Satb2 (Britanova et al., 2005, 2008) Insm1 (Farkas et al., 2008) et l'ARN non-codant Svet-1 (Tarabykin et al., 2001).

Les PI donnent naissance aux neurones de projection pyramidaux qui colonisent l'ensemble des couches corticales (Kowalczyk et al., 2009; Vasistha et al., 2015), et une perte de fonction du gène *Tbr2* montre que toutes les couches neuronales sont affectées (Sessa et al., 2008). La majorité des PI (80-90%) subit une seule division symétrique neurogénique terminale, générant ainsi deux neurones (**Figure 11**). Cependant, certains PI peuvent se diviser deux à trois fois de façon symétrique proliférative pour générer deux PI, avant de se diviser finalement en neurones. Ceci permet alors d'amplifier le pool final de neurones formés (Attardo et al., 2008; Kowalczyk et al., 2009).

ii. Les cellules gliales radiaires basales (GRb)

Initialement identifiés dans les cortex cérébraux d'espèces gyrencéphales (humain et furet), (Fietz et al., 2010; Hansen et al., 2010; Kelava et al., 2012; Reillo and Borrell, 2012) et plus récemment chez les marsupiaux (Sauerland et al., 2018) ces cellules sont également retrouvées en petite quantité dans le cortex lissencéphale de la souris (Shitamukai et al., 2011; Wang et al., 2011). Le nombre de cellules GRb a fortement augmenté chez les humains et d'autres espèces gyrencéphales au cours de l'évolution, conduisant ainsi à la génération de deux zones germinales distinctes chez ces espèces : la zone sous-ventriculaire interne (ISVZ, inner subventricular zone ; correspond à la zone sous-ventriculaire (ZSV) chez la souris) et la zone sous-ventriculaire externe (OSVZ, outer sub-ventricular zone) (Smart et al., 2002).

Comme les cellules GRa, les cellules GRb possèdent un long prolongement basal qui entre en contact avec la membrane piale mais n'émettent pas de prolongement apical (**Figure 9**). Elles sont détachées de la surface du ventricule et ne reçoivent donc pas les signaux provenant du liquide céphalo-rachidien. Elles expriment également le facteur Pax6 et se divisent essentiellement par mitoses symétriques neurogéniques au niveau de la ZSV (Fietz et al., 2010; Hansen et al., 2010; Wang et al., 2011).

Une étude a permis de mieux caractériser les signatures moléculaires des cellules GRb dans le cortex humain en développement (Pollen et al., 2015). Ces cellules expriment préférentiellement des gènes impliqués dans la formation de la matrice extracellulaire et dans le maintien de l'identité de cellule souche. Par ailleurs, les auteurs ont mis en évidence qu'une seule cellule GRb permettait de générer plus d'un millier de cellules neuronales et gliales différentes (Pollen et al., 2015) soulignant le potentiel prolifératif remarquable de ces cellules dans le cortex humain. Par comparaison, lors de la neurogenèse chez la souris, une cellule GRa génère 10 à 100 cellules filles seulement (Gao et al., 2014; Vasistha et al., 2015).

3. Mécanismes moléculaires la régulation de la neurogenèse

Une régulation fine de la balance entre la prolifération des progéniteurs et la neurogenèse est essentielle à la génération du nombre approprié de neurones corticaux du cortex cérébral et permet, en définitive de contrôler la taille du cerveau.

Au début du développement cortical, les PAs se divisent de manière symétrique afin d'assurer leur expansion, puis transitent vers une phase de divisions asymétriques neurogéniques permettant la génération des neurones corticaux (**Figure 8**). Des expériences d'analyses clonales *in vivo* menées chez la souris ont montré que cette transition dans le mode de division des PA (symétrique vers asymétrique) se déroule autour de E11-E12 et ce, de manière irréversible pour une lignée de cellule GRa donnée (Gao et al., 2014). En effet, une fois qu'une cellule GRa commence une division asymétrique, l'ensemble de ses cellules filles progénitrices issues de sa division s'engageront uniquement dans des divisions asymétriques (Gao et al., 2014).

La régulation de la transition entre le mode de division symétrique (prolifération) et asymétrique (neurogénique) est soumise à de nombreux mécanismes impliquant des facteurs d'origine intrinsèques et extrinsèques assez bien caractérisés. Mon travail de thèse s'étant essentiellement intéressé à la migration radiaire des neurones de projection, je décrirai de façon succincte les principaux mécanismes impliqués dans la régulation de la neurogenèse.

a. L'orientation du fuseau mitotique

L'orientation du plan de clivage est importante dans la régulation des divisions symétriques et asymétriques des progéniteurs en répartissant de manière égale ou inégale les différents composants cellulaires dans les deux cellules filles, contribuant ainsi la détermination du destin cellulaire des progéniteurs.

L'héritage du domaine apical des cellules GRa a initialement été proposé comme étant critique à la détermination de la destinée cellulaire des PA. Selon le modèle proposé par Huttner, la cellule fille qui hérite du domaine apical reste une cellule GR tandis que l'autre se différencie en neurone (Huttner and Brand, 1997). Ce modèle implique donc que le domaine apical doit être partagé équitablement entre les deux cellules filles pour permettre une division symétrique. Le domaine apical représente une infime proportion de la membrane plasmique, ainsi un léger changement dans l'orientation du fuseau mitotique suffit à générer une division asymétrique (Kosodo et al., 2004). La cellule fille qui hérite du domaine apical maintien son potentiel prolifératif, tandis que l'autre se différentie (Kosodo et al., 2004). Ce modèle est cependant remis en question. En effet, des études montrant que le domaine apical est uniquement hérité par l'une des cellules fille (Asami et al., 2011; Konno et al., 2008; Shitamukai et al., 2011) suggèrent que l'héritage du domaine apical seul ne suffit pas à contrôler la destinée cellulaire des progéniteurs apicaux. Le prolongement basal des cellules GRa pourrait donc jouer un rôle clé dans la détermination du destin cellulaire. Durant la neurogenèse, la division du prolongement basal est très asymétrique et est souvent hérité par l'une des cellules filles (Miyata et al., 2001a). La cellule fille qui hérite du prolongement basal garde sa capacité proliférative tandis que l'autre cellule fille se différencie (Konno et al., 2008; Shitamukai et al., 2011). Diverses études ont permis de mieux comprendre le rôle de l'héritage du prolongement basal dans le devenir cellulaire. L'héritage du prolongement basal pourrait maintenir les cellules GRa dans un état prolifératif grâce à l'héritage de divers facteurs de croissance, d'ARNm et de récepteurs d'adhésion cellulaire (intégrines) retrouvés spécifiquement dans le prolongement basal et dans le pied basal (Betizeau et al., 2013; Fietz et al., 2010; Hansen et al., 2010; Subramanian et al., 2017).

L'orientation de ce fuseau lors de la division des cellules GRa est finement contrôlée par le complexe LGN/Gαi/NuMa (Leucine-glycine-asparagine repeat protein/GDP-bound inhibitory α-subunits of heterotrimeric G proteins/Nuclear mitotic apparatus protein) et par la dynéine. L'altération de ce complexe de protéines conduit en effet à un défaut dans l'orientation du fuseau mitotique dans le neuroépithélium de souris (Konno et al., 2008; Saadaoui et al., 2017). La protéine Lis1 est connue

pour être mutée chez des patients présentant des lissencéphalies, MDC caractérisée par une simplification ou une absence des circonvolutions cérébrales (aspect d'un cerveau lisse), associée à une organisation anormale des couches corticales. Lis1 interagit avec la dynéine et Ndel1 pour permettre l'ancrage des MTs astraux au cortex cellulaire (Yingling et al., 2008). Des perturbations du complexe Lis1/Ndel1 altèrent l'orientation du fuseau mitotique conduisant à une diminution de la population de progéniteurs (Feng and Walsh, 2004; Yingling et al., 2008). Il a également été montré que la perte de fonction de la protéine Huntingtin (HTT) conduit à des défauts d'orientation du fuseau mitotique des cellules GRa et favorise leur différenciation neuronale (Godin et al., 2010), soulignant le rôle de cette protéine dans le positionnement correcte du fuseau mitotique pendant la division cellulaire. Par ailleurs, la forme mutée de la HTT (répétition du triplet CAG), à l'origine de la maladie de Huntington, perturbe également l'orientation du fuseau dans les cellules GRa en altérant la localisation de protéines telles que NuMA ou la dynéine (Molina-Calavita et al., 2014). Une étude récente a montré que les protéines CITK (citron kinase) et ASMP (Abnormal Spindle-like Microcephaly-associated), responsables de microcéphalies chez l'humain, sont essentielles à la maintenance du plan de clivage vertical et permettent ainsi l'amplification de la population de cellules NE au cours de la corticogenèse précoce (Gai et al., 2016).

b. Le centrosome

Le centrosome est le centre organisateur des MTs et participe à la formation et à la stabilité du fuseau mitotique lors de la division cellulaire. Il est composé de deux centrioles perpendiculaires l'un à l'autre et entourés d'un matériel péri-centriolaire. Dans les cellules GRa, il est localisé au niveau de la membrane plasmique apicale et sert de corps basal pour la formation du cil primaire.

De très nombreuses protéines associées à des malformations corticales sont impliquées dans l'orientation du fuseau mitotique. Par exemple, les gènes *ASPM* (Bond et al., 2002), *MCPH1* (microcephalin 1) (Jackson et al., 2002), *WDR62* (Bilgüvar et al., 2010; Chen et al., 2014; Nicholas et al., 2010), *CEP135* (Hussain et al., 2012), *CEP152* (Guernsey et al., 2010), *ZNF335* (Yang et al., 2012b), *CDK5RAP2* (Bond et al., 2005; Issa et al., 2013), *STIL* (Kumar et al., 2009) ou encore *CENPJ* (Centromere Protein J) (Bond et al., 2005), dont des mutations conduisent à des microcéphalies chez l'humain (voir § 3-g), codent pour des protéines centrosomales et permettent de réguler la balance entre divisions symétriques et asymétriques via le contrôle de l'orientation du fuseau mitotique. Ainsi, des défauts dans l'orientation du fuseau seraient à l'origine de la différenciation prématurée des progéniteurs conduisant à une diminution du nombre total de neurone et à la microcéphalie.

Ce modèle est cependant sujet à controverse. Par exemple, il a été montré que l'inactivation du *Wdr62* chez la souris n'altère pas l'orientation du fuseau mitotique mais que la progression dans le cycle cellulaire est dérégulée. Cette dérégulation mène à la mort cellulaire des progéniteurs et pourrait expliquer l'apparition de la microcéphalie (Chen et al., 2014). Une autre étude a montré que l'inactivation du gène *Tubb5* chez la souris (codant pour une isoforme de la tubuline-β et connu pour

être à l'origine de microcéphalies chez l'humain) n'altère pas l'orientation du fuseau mitotique mais dérégule la progression du cycle cellulaire ce qui induit l'apoptose des progéniteurs et donc conduit à la diminution du pool de progéniteurs (Breuss et al., 2016). Le rôle de la mort cellulaire des progéniteurs neuronaux dans la microcéphalie a été mis en évidence dans des expériences d'inactivation ou d'amplification des centrosomes durant la neurogenèse. Chez la souris, la déplétion ou l'amplification des centrosomes conduit au détachement des PA de la surface de la ZV et à leur mort par apoptose ce qui *in fine* diminue drastiquement la population de progéniteurs (Insolera et al., 2014; Marthiens et al., 2013). Plusieurs études ont par ailleurs montré qu'une altération de la duplication des centrioles, causée par des mutations dans le gène *PLK4* (Polo-like kinase 4, l'une des protéines centrosomales nécessaires à la duplication centriole), pourrait être impliquée dans l'étiologie de la microcéphalie. Des expériences menées chez la souris, le poisson zèbre et dans des cultures cellulaires montrent en effet que les mutations dans le gène *PLK4* conduisent à une réduction du nombre de centrioles, responsable des phénotypes observés (Martin et al., 2014; Tsutsumi et al., 2016).

c. Le cil primaire

Le cil primaire est un organite présent au niveau de la membrane plasmique apicale des cellules NE et GRa et qui sert de senseur de signaux extracellulaires localisés dans le liquide céphalo-rachidien du ventricule, tels que Shh (**Figure 10**) (Anderson and Stearns, 2009; Piotrowska-Nitsche and Caspary, 2012). Le cil primaire se forme à partir du centrosome, qui est alors appelé corps basal.

Il a initialement été proposé que 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 (Kim and Dynlacht, 2013; Seeley and Nachury, 2010). Dans les cellules GRa en mitose, les centrioles sont hérités de façon asymétrique par les cellules filles et le centriole mère retient la membrane du cil primaire (Wang et al., 2009). La cellule fille qui hérite du centriole mère est capable de reformer un cil primaire avant l'autre cellule fille, ce qui lui permet de mettre en place plus rapidement les voies de signalisation régulées au niveau du cil primaire et contribue ainsi à son maintien d'identité de progéniteur. 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 baso-latérale, au lieu de la membrane apicale, avant de se détacher de la paroi du ventricule (Wang et al., 2009). Ainsi, cette asymétrie temporelle et spatiale dans la ciliogenèse pourrait expliquer des destins cellulaires différents (prolifération vs. neurogenèse) pour les deux cellules filles (Wilsch-Bräuninger et al., 2012).

Cependant, ce modèle ne semble pas compatible avec les divisions symétriques nécessaires à l'étape précoce du développement, permettant l'augmentation de la population progénitrice. Paridaen et coll. ont donc proposé un nouveau modèle faisant intervenir l'appareil de Golgi. Au cours

de la division symétrique proliféatrice des PA, 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 (Paridaen et al., 2013). Puisqu'il a été montré que le trafic apical de la membrane dérivée de l'appareil de Golgi est diminué au début de la neurogenèse (Aaku-Saraste et al., 1997), les auteurs proposent que les PA perdent leur capacité à capturer la membrane dérivée de l'appareil de Golgi à mesure que la neurogènese progresse (Paridaen et al., 2013).

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 du développement du système nerveux appelés ciliopathies. Par exemple, la délétion du gène *Arl13b* (ADP-ribosylation factor-like 13b), qui code pour une petite GTPase spécifiquement localisée au niveau de la membrane du cil primaire, conduit à une inversion de la polarité apico-basale des cellules GR (Higginbotham et al., 2013). Des mutations dans le *ARL13B* ont également été retrouvées chez des individus atteint du syndrome de Joubert, ciliopathie caractérisée par une malformation congénitale du tronc cérébral et une agénésie ou une hypoplasie du vermis cérébelleux (Cantagrel et al., 2008).

d. La durée du cycle cellulaire

La durée du cycle cellulaire des progéniteurs permet une balance entre prolifération et différenciation des progéniteurs neuronaux. Des analyses de la longueur du cycle cellulaire ont initialement montrés, chez la souris, qu'un allongement de la durée du cycle cellulaire des cellules NE accompagne la progression de la neurogenèse (Takahashi et al., 1995).

Des analyses ultérieures ont distingué des différences de durée du cycle selon les types de progéniteurs : 1) les cellules GRa ont un cycle cellulaire plus long en milieu de neurogenèse qu'en début de neurogenèse, ce qui est dû à un allongement des phases G1 et S (Arai et al., 2011; Calegari et al., 2005); 2) les PIa et les PIb neurogéniques ont un cycle cellulaire plus long que les cellules GRa, ce qui est dû à un allongement de la phase G1 (Arai et al., 2011); 3) les cellules GRa et les PIb neurogéniques restent moins longtemps dans le cycle cellulaire que les cellules GRa et PIb proliféatifs, ce qui est dû au raccourcissement de la phase S (Arai et al., 2011).

Ces observations sont significatives car il a été démontré que la longueur du cycle cellulaire, en particulier la longueur de la phase G1, était un facteur déterminant du destin cellulaire (Calegari and Huttner, 2003). En effet, l'allongement forcé de la phase G1 des cellules NE conduit à une neurogenèse précoce, au détriment de la prolifération des cellules NE (Calegari and Huttner, 2003; Lange et al., 2009). A l'inverse, le raccourcissement forcé de la phase G1 favorise la prolifération des progéniteurs et retarde la neurogenèse (Lange et al., 2009). Il est également suggéré que l'allongement de la phase S chez les progéniteurs les plus précoces est requis pour 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).

Ainsi, l'allongement de la durée de la phase G1 est associé à une transition vers un état plus différencié tandis que la maintenance d'une phase S plus longue est associée à l'expansion des progéniteurs.

e. Les facteurs épigénétiques

La méthylation de l'ADN ou les modifications post-traductionnelles des histones contrôlent l'expression spatiale et temporelle de très nombreux gènes au cours du développement dont les gènes de régulation de la neurogenèse et les gènes impliqués dans la transition entre la production de neurones et de cellules gliales. Aux stades précoces du développement, les progéniteurs expriment des protéines impliquées dans la régulation de l'état de la chromatine telles que les protéines nucléaires HMG (High mobility group), ou bien des méthyl-transférases qui permettent la modification des histones, si bien que la chromatine des progéniteurs précoces est moins condensée que dans les progéniteurs tardifs. La condensation de la chromatine et les modifications épigénétiques des progéniteurs sont associées à une transition entre neurogenèse et gliogenèse (Amberg et al., 2018).

f. Les signaux extracellulaires

Au cours du développement précoce, la signalisation **Notch** est activée dans les cellules GRa et permet 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; Mizutani et al., 2007). Ainsi, la voie Notch permet de maintenir le potentiel prolifératif de ces cellules et empêche leur différenciation en neurones ou en PI. L'activité de la voie Notch permet aux cellules progénitrices adjacentes d'établir des différences d'identité par échange réciproque de signaux inhibiteurs : c'est l'inhibition latérale. Une étude a montré que l'inhibition latérale est étroitement associée à la migration nucléaire intercinétique (MNI) et joue un rôle majeure dans la régulation de la neurogenèse via Notch (Del Bene et al., 2008). La signalisation Notch est également impliquée dans la régulation de la gliogenèse. Il a été montré par exemple que l'activation de Notch promeut l'induction du facteur de transcription Nf1a (nuclear factor 1A) qui permet la déméthylation (et donc l'activation) du promoteur de gènes spécifiques de la lignée astrocytaire tels que GFAP (Namihira et al., 2009). Notch intervient également dans la transition des cellules GRa qui permet de passer de la production des neurones à celle des oligodendrocytes (Rabadán et al., 2012).

Contrairement à Notch, la voie **Wnt** joue un double rôle durant la neurogenèse. Durant la neurogenèse précoce (vers E10), la signalisation Wnt/β-Caténine favorise les divisions symétriques des cellules GR et retarde l'apparition des PI (Chenn and Walsh, 2002). Au contraire, durant la neurogenèse un peu plus tardive (environ E13), la signalisation Wnt permet la formation des PI et la différenciation neuronale via l'augmentation de l'expression de N-Myc et de la Neurogénine-1

(Kuwahara et al., 2010; Munji et al., 2011). Une étude a permis de mieux comprendre les effets contradictoires de la voie Wnt dans la prolifération et dans la différenciation des progéniteurs. La β-caténine est l'acteur central de la voie Wnt. Après activation des récepteurs Wnt, la β-caténine est transloquée au noyau où elle active différents complexes de transcription et permet de réguler les gènes cibles de Wnt. Outre son rôle dans la voie Wnt, la β-caténine est également impliquée dans la mise en place des jonctions adhérentes. Dans cette étude, les auteurs ont généré une souris mutante pour la β-caténine, avec une activité d'adhésion intracellulaire normale, mais dont l'activité transcriptionnelle est altérée (Draganova et al., 2015). La délétion de l'activité de signalisation Wnt mène à une déplétion du pool de PA et à une augmentation du nombre de PIb. Les auteurs montrent que la dérégulation de la signalisation Wnt/β-caténine conduit à une neurogenèse plus précoce, ce qui mène à une réduction de la production de neurones des couches superficielles et profondes (Draganova et al., 2015).

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 GR et dans la production des PI (Komada et al., 2008). La signalisation Shh favorise les divisions prolifératives symétriques des cellules GR via la transcription de gènes cibles de Notch, soulignant ainsi des communications croisées entre les différentes voies de signalisation (Dave et al., 2011). Au cours de la neurogenèse, le signal Shh diminue et cette diminution est nécessaire pour la production des PI et la différenciation neuronale (Shikata et al., 2011). Par ailleurs, la signalisation Shh augmente la génération et le renouvellement des cellules GRb et la prolifération des PI ce qui conduit à la formation anormale de gyri à la surface du cerveau de souris (Wang et al., 2016a).

Au cours du développement cortical, le télencéphale est donc soumis à ces gradients de morphogènes qui permettent la régionalisation de l'expression des facteurs de transcription et par conséquent une organisation et une morphogenèse hautement structurées et spécialisées. Pax6 par exemple, est un facteur de transcription dont les effets opposés semblent régulés par des épissages alternatifs du gène mais également par son interaction avec d'autres facteurs de transcription. Ainsi, Pax6 favorise la prolifération des cellules GRa en jouant sur l'orientation du fuseau mitotique (Asami et al., 2011), mais il promeut également la neurogènese en activant l'expression de gènes pro-neuraux (Sansom et al., 2009). Ngn2, Insm1 et Ap2γ sont des facteurs de transcription qui induisent l'expression de Tbr2, requis pour la génération des PB (Farkas et al., 2008; Pinto et al., 2009). La différenciation neuronale est induite par l'expression de gènes pro-neuraux tels que les facteurs de transcription Sox4, SoxC et Sox11, les neurogénines Ngn1/2 et Ascl1 (Martynoga et al., 2012). Ascl1 par exemple est connu pour réguler la division des cellules GR et la migration radiaire des neurones post-mitotiques et assure ses fonctions par la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes cibles (Castro et al., 2011).

g. La microcéphalie

Une régulation précise de la prolifération des progéniteurs et de la neurogenèse est essentielle à la génération du nombre approprié de neurones corticaux. La perturbation de ces processus peut mener à l'apparition de microcéphalie, une malformation du développement corticale rare causée par une diminution de la prolifération (Bond et al., 2002, 2005; Jackson et al., 2002) ou une accélération de l'apoptose (Breuss et al., 2016; Chen et al., 2014) des cellules progénitrices, neuronales ou gliales. Ces défauts de prolifération/apoptoses conduisent alors à une diminution du nombre de neurones et de cellules gliales dans le cerveau.

La microcéphalie se caractérise par un périmètre crânien réduit (mesure inférieure à au moins 2,5 à 3 déviations standards pour un âge et un sexe donné) sans anomalies notables de l'architecture cérébrale (Woods and Parker, 2013). On peut cependant noter que les microcéphalies peuvent, dans certains cas, être associées à des altérations de la gyration corticale (Adachi et al., 2011; Yu et al., 2010). La microcéphalie peut être présente à la naissance (microcéphalie primaire) ou bien apparaitre au cours des premiers mois de vie chez l'enfant (microcéphalie secondaire) (Woods and Parker, 2013).

Les causes de la microcéphalie sont multiples et peuvent être d'origines génétiques ou environnementales. Parmi les causes non-génétiques les plus connues on peut citer par exemple les infections congénitales par des virus (Zika, cytomegalovirus, ou herpes simple virus etc..) ou encore la consommation d'alcool ou de drogues au cours de la grossesse. Dans une revue publiée en 2018, les auteurs répertorient 23 gènes dont il a été montré qu'ils étaient à l'origine de la microcéphalie primaire (Pirozzi et al., 2018). Parmi l'ensemble de ces gènes, les mutations dans le gène *ASPM* seraient à l'origine de 10 à 40% de la microcéphalie primaire autosomique récessive (MCPH), qui est une forme de microcéphalie congénitale associée à de la déficience intellectuelle (DI) modérée à sévère (Woods et al., 2005). Les gènes identifiés dans les MCPH codent principalement pour des protéines impliquées dans la régulation de l'orientation du fuseau mitotique (*ASPM, WDR62)* (Bilgüvar et al., 2010; Bond et al., 2002; Chen et al., 2014; Nicholas et al., 2010), la régulation de la transcription et la progression du cycle cellulaire et sa régulation (*MCPH1, CENPJ, CDK5RAP2*) (Bond et al., 2005; Issa et al., 2013; Jackson et al., 2002), la maturation du centrosome (*CEP135, CENPJ, PCNT, MCPH1*) (Bond et al., 2005; Hussain et al., 2012; Jackson et al., 2002), la réparation de l'ADN (*MCPH1*) (Jackson et al., 2002), la prolifération des progéniteurs (*ASPM, STIL*) (Bond et al., 2002; Kumar et al., 2009). Les fonctions de plusieurs de ces gènes dans la régulation de la division des progéniteurs et l'apparition de la microcéphalie ont été décrites plus haut (voir § I-B-3).

Plus récemment, des mutations *de novo* ou bien héritées dans les gènes codant pour les tubulines (les sous-unités des MTs, comme par exemple *TUBA1A, TUBB2B, TUBG1, TBCD*) (Fallet-Bianco et al., 2014; Poirier et al., 2013a) ou des moteurs moléculaires associées aux MTs (telles que les kinésines *KIF11, KIF2A* et *KIF14*, voir Chapitre 2, § II) ont été identifiés chez plusieurs individus présentant des microcéphalies associées à d'autres malformations cérébrales (comme par

exemple des agénésies du corps calleux, des lissencéphalies, des polymicrogyries, des pachygyries etc…) et associées (ou non) à de la DI et des épilepsies.

L'incidence de la MCPH varie de 1 à 8 pour 250 000 naissances (Zaqout et al., 2017) et est plus commune chez les populations asiatiques et du Moyen-Orient où les mariages consanguins sont mutuels, que chez les individus caucasiens (Muhammad et al., 2009) .

4. Origine génétique de la diversité neuronale

Bien que les différents types de neurones pyramidaux retrouvés dans le cortex cérébral soient assez bien caractérisés (voir § V-A pour les différent sous-types de neurones corticaux), les programmes génétiques et moléculaires à l'origine de cette grande diversité restent peu connus. Deux modèles opposés, bien que non mutuellement exclusifs ont été proposés pour expliquer la génération de différents types de neurones du cortex cérébral (Franco and Müller, 2013). Le premier modèle propose que la diversité des progéniteurs soit à l'origine de la diversité neuronale (**Figure 12 A**). Dans ce modèle, la population progénitrice est hétérogène et cette diversité est permise par le fait que ces cellules naissent à des endroits différents du cerveau et/ou à des stades différents. Dans le second modèle, la population progénitrice initiale est homogène et se spécifie au cours du développement pour donner naissance à des neurones différents qui se diversifient également à mesure du développement cortical grâce par exemple, à leurs interactions avec l'environnement (**Figure 12 B**).

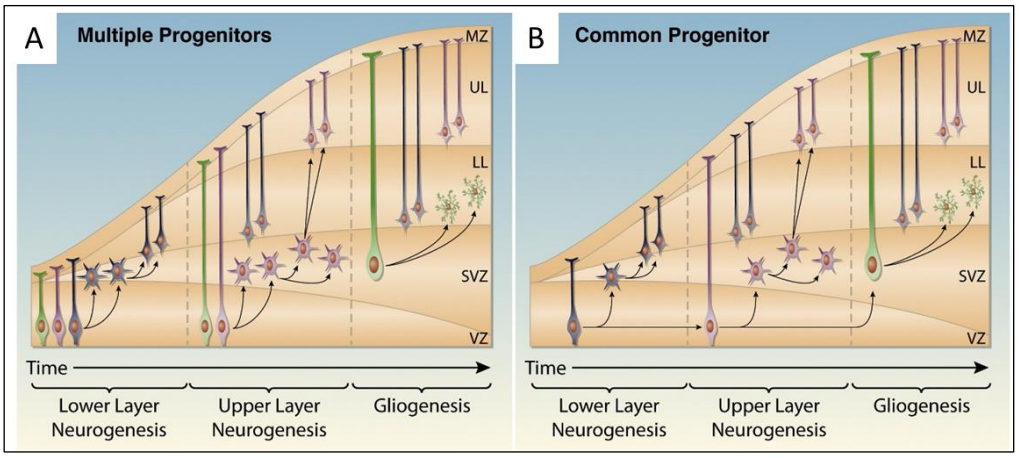


Figure 12 : Deux modèles ont initialement été proposés pour expliquer la spécification des neurones de projection du cortex cérébral.
(A) Premier modèle : différents types de progéniteurs existent et chaque type de progéniteurs est programmé pour générer un type particulier de neurone de projection ou de cellule gliale. (B) Second modèle : un seul type de progéniteur existe et est à l'origine de tous les types de neurones de projection et de cellules gliales. Les progéniteurs se spécifient progressivement au cours du temps pour générer l'ensemble des neurones de projection et de cellules gliales, dans un ordre temporel défini (Franco and Müller, 2013).

Etant donné que chaque couche corticale est occupée par des neurones qui sont nés plus ou moins au même moment, l'hypothèse selon laquelle le potentiel neurogénique des cellules GR est progressivement acquis au cours du temps a été largement acceptée (Second modèle). Des études de transplantations menées chez le furet ont montré que les progéniteurs précoces, qui

normalement produisent les neurones des couches profondes, sont capables de produire des neurones des couches superficielles quand ils sont transplantés dans un environnement cortical tardif. Par ailleurs, les progéniteurs tardifs ont un devenir cellulaire plus restreint que les progéniteurs précoces, et ils ne peuvent générer que des neurones des couches superficielles, même s'ils sont transplantés dans un environnement précoce (Frantz and McConnell, 1996; McConnell and Kaznowski, 1991). Des modèles de culture cellulaire sont venus renforcer ces observations et ont montré que les cellules corticales *in vitro* 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).

Des études plus récentes ont cependant montré qu'il existe différents programmes transcriptionnels qui contribuent à l'hétérogénéité des progéniteurs corticaux ce qui permet d'influencer la destinée de leurs descendances (Premier modèle). Par exemple, les facteurs de transcription Neurogenines 1 et 2 sont requis pour la spécification des cellules GR en neurones des couches profondes durant la neurogenèse précoce, alors que la spécification en neurones des couches superficielles requiert les facteurs de transcription Pax6 et Tlx (Schuurmans et al., 2004). Renforçant cette idée, un grand nombre de gènes spécifiques des couches corticales profondes ou bien des couches corticales superficielles ont été montrés comme enrichis dans certaines populations progénitrices au cours du développement. Les cellules GRa précoces expriment des marqueurs neuronaux des couches corticales profondes tels que Fezf2 et Sox2 (Bani-Yaghoub et al., 2006; Chen et al., 2005a). Au contraire, les PI de la ZSV expriment des gènes spécifiques des couches corticales superficielles tels que Cux1, Cux2 et Svet1 (Nieto et al., 2004; Tarabykin et al., 2001; Zimmer et al., 2004). Des expériences ont mis en évidence que certains gènes comme *Cux2* (marqueur des couches corticales superficielles) étaient exprimés très tôt au cours du développement dans une sous population de progéniteurs des ZV et ZSV. Ces progéniteurs exprimant *Cux2* seraient spécifiés pour générer uniquement des neurones des couches superficielles et ce de manière indépendante de leur date de naissance ou de leur environnement, tandis que les progéniteurs n'exprimant pas *Cux2* produiraient des neurones destinés aux couches corticales profondes (Franco et al., 2012). Cependant, deux nouvelles études sont venues contredire ces résultats. Dans ces études, les auteurs identifient deux populations de cellules GR exprimant Cux2 ou FeztF2 et montrent que ces cellules Cux2+ ou Fetzf2+ sont capable de générer des neurones des couches profondes et des couches superficielles ainsi que des cellules gliales (Eckler et al., 2015; Guo et al., 2013).

L'analyse transcriptomique sur cellule unique a constitué une avancée technique majeure dans la compréhension des signatures moléculaires à l'origine de la diversité neuronale. Contrairement aux précédentes approches qui consistent à analyser l'activité transcriptionnelle générale d'une population de cellules progénitrices, le séquençage ARN sur cellule unique permet

d'analyser le transcriptome de progéniteurs uniques à un temps donné et dans une région donnée, permettant d'affiner l'identité moléculaire de ces cellules et donc de mieux comprendre leur rôle dans la génération des neurones post-mitotiques (Johnson and Walsh, 2017). Le séquençage ARN sur cellule unique de progéniteurs corticaux de cortex de souris combiné à la technique du « Flash-tag » (qui permet de marquer et de suivre des cohortes de progéniteurs nés au même moment au cours du développement) a été réalisé pour la première fois en 2016 (Telley et al., 2016). Dans cette étude, les auteurs ont analysé le transcriptome des progéniteurs précoces à 6, 12, 24 et 48h après leur naissance à E14,5. Les auteurs ont montré que la différenciation des neurones destinés aux couches profondes est médiée par une série de vagues transcriptionnelles dont la séquence est critique pour une progression normale du développement. Ces vagues transcriptionnelles permettent de limiter une fenêtre temporelle au cours de laquelle plusieurs complexes transcriptionnels sont présent et peuvent interagir. Les auteurs proposent que ces combinaisons transcriptionnelles transitoires puissent agir comme des points de contrôle au cours de la différenciation neuronale permettant de réguler les différents destins cellulaires.

Deux études récentes utilisant le séquençage ARN sur cellule unique ont permis d'affiner les modèles précédemment proposés (**Figure 12**). Nowakowski *et coll*. se sont intéressés aux neurones excitateurs retrouvés dans deux régions différentes du cerveau chez le fœtus humain (le cortex préfrontal et le cortex visuel) et ayant des rôles fonctionnels distincts (Nowakowski et al., 2017). En utilisant le séquençage ARN sur cellule unique, les auteurs ont mis en évidence qu'il existait de petites différences transcriptomiques entre les deux populations progénitrices et que ces petites différences étaient suffisantes pour générer deux populations neuronales distinctes. Une autre étude est venue confirmer ces observations. Dans cette étude, les chercheurs se sont intéressés au transcriptome des progéniteurs d'interneurones présents dans les EGM, EGL et EGC. En utilisant la même technique que les auteurs de la première étude, ils ont montré que les programmes transcriptionnels sont largement conservés dans les trois populations progénitrices et que l'expression d'un nombre très limité de gènes entre ces trois régions suffit à générer les différents sous-types d'interneurones (Mayer et al., 2018). Ces deux études mettent en évidence que, bien que les différentes populations progénitrices soient relativement homogènes en termes d'expression génique (deuxième modèle, **Figure 12 B**), l'expression différentielle d'un nombre restreint de gènes au sein de ces progéniteurs est à l'origine de la diversité neuronale (premier modèle, **Figure 12 A**).

En combinant la technique du Flash-tag au séquençage ARN sur cellule unique, Telley et coll. ont analysé le transcriptome des PA (et de leur descendance) à différents stades embryonnaires au cours de la neurogenèse chez la souris. Ils ont ainsi mis en évidence que les PA changeaient leur profil d'expression au cours de la neurogenèse (Telley et al., 2019) (**Figure 13**).

Au début de la neurogenèse (E12), les PA expriment majoritairement des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. Au cours de la neurogenèse, le profil transcriptomique des PA changent et ils expriment alors majoritairement des gènes codant pour des molécules impliquées dans la reconnaissance des signaux environnementaux comme des récepteurs membranaires ou

des protéines de signalisation cellulaire. Les auteurs montrent que l'expression dynamique des gènes est contrôlée épigénétiquement par la protéine Prc2 (Polycomb repressor complex 2) et est transmis par les PA à leur descendance neuronale (Telley et al., 2019). Ainsi, au cours de la corticogenèse, les PA deviennent progressivement plus réceptifs aux signaux environnementaux, ce qui suggère que des facteurs extrinsèques modulent la neurogenèse au cours du développement tardif.

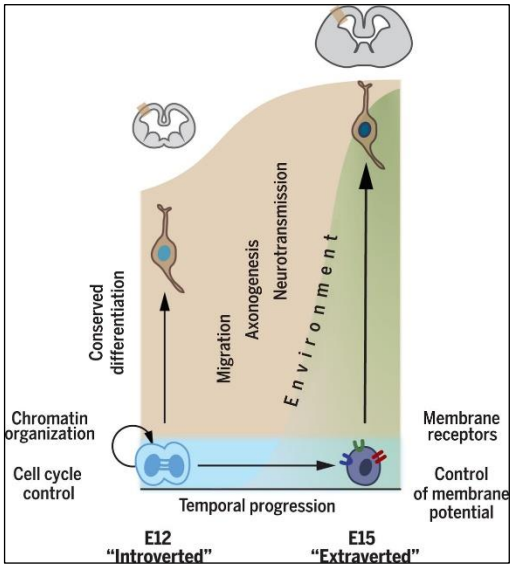


Figure 13 : Modèle proposé par Telley et coll., en 2019.
Les PA changent leur profil d'expression transcriptionnel au cours de la neurogenèse en devenant progressivement plus réceptifs aux signaux environnementaux. (Telley et al., 2019)

IV. La migration neuronale

Les neurones corticaux nouvellement générés dans les zones migrent pour rejoindre leurs couches corticales définitives. Les neurones de projection et les interneurones étant générés dans deux parties distinctes du télencéphale, ils entreprennent donc deux modes de migration différents : une migration tangentielle pour les interneurones et une migration radiaire pour les neurones de projection (**Figure 14**).

Mon travail de thèse s'étant essentiellement intéressé à la migration radiaire des neurones de projection, je décrirai succinctement le processus de la migration tangentielle et les principaux mécanismes moléculaires impliqués, avant de détailler le mécanisme de migration radiaire.

A. La migration tangentielle

1. Routes migratoires

Les interneurones générés dans les EG du télencéphale ventral migrent tangentiellement vers le cortex cérébral en développement. Cette migration est contrôlée par l'expression spatio-temporelle de diverses molécules extracellulaires qui agissent comme des signaux attractifs ou répulsifs et qui orientent la direction de migration des interneurones jusqu'au cortex cérébral. Les interneurones utilisent des routes migratoires spécifiques pour coloniser le cortex cérébral. Aux stades E12 à E14, les interneurones empruntent deux routes migratoires distinctes dans la zone

marginale (ZM) et la ZSV/zone intermédiaire (ZI). Plus tard, une troisième route migratoire se met en place entre les deux premières. Une fois dans le cortex, les interneurones se dispersent tangentiellement avant d'envahir les différentes couches corticales en changeant leur mode de migration pour une migration radiaire (**Figure 14**) (Tanaka and Nakajima, 2012).

Une étude récente a mis en évidence que les différents sous-types d'interneurones STT+ et PV+ utilisent des routes migratoires différentes pour rejoindre le cortex (Lim et al., 2018b). En particulier, les auteurs montrent que les cellules Martinotti (un sous-type de cellule STT+) et PV+ migrent préférentiellement dans la ZM, tandis que les cellules non-Martinotti se dispersent dans la ZSV. Ces résultats suggèrent ainsi que le choix des routes migratoires par les interneurones est définie précocement (avant leur entrée dans le cortex cérébral) et qu'il doit donc être programmé génétiquement dans ces cellules (Lim et al., 2018b). De façon cohérente avec cette hypothèse, une étude récente d'analyse du transcriptome des interneurones dérivés des EGC montre que l'identité cellulaire des interneurones dérivés de cette région dicte également le choix des différentes routes de migration empruntées par ces interneurones (Frazer et al., 2017).

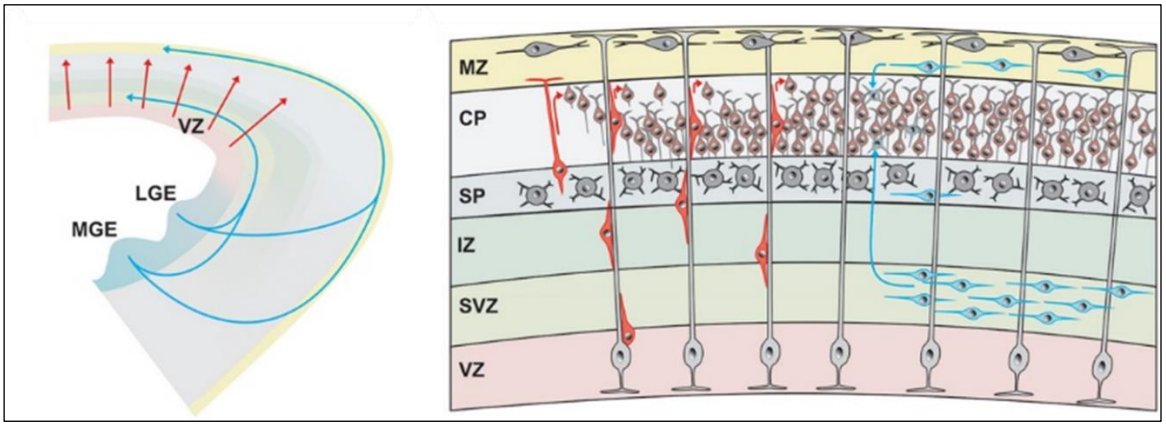


Figure 14: Les différents modes de migration des neurones du cortex cérébral.
Les neurones de projection (en rouge) naissent dans les zones ventriculaires (ZV) et sous-ventriculaires (SVZ) et rejoignent leurs couches corticales appropriées par migration radiaire (flèches rouges), tandis que les interneurones (en bleu) naissent dans les éminences ganglionnaires médianes (MGE) et latérales (LGE) et migrent vers le cortex par migration tangentielle (flèches bleues). Une fois présent dans le cortex, les interneurones migrent par trois principales voies : par la zone marginale (MZ) et les zones sous-ventriculaire (SVZ)/intermédiaires (ZI) aux stades précoces, et par la sous-plaque lors des stades tardifs (Luhmann et al., 2015).

2. Dynamique et régulation de la migration tangentielle

a. Morphologie de l'interneurone en migration

Les interneurones migrent sur de longues distances pour rejoindre le cortex cérébral et sont soumis à de nombreux signaux environnementaux. L'interprétation de ces signaux leur permet de modifier leur cytosquelette et de s'adapter aux changements de direction. L'interneurone en migration adopte une morphologie particulière bien caractérisée. Il projette en avant un prolongement antérieur dynamique appelé « prolongement guide » (leading process) qui arbore de

nombreux branchements au cours de la migration et à l'extrémité duquel des cônes de croissance se déploient. En avant du noyau et à la base du prolongement guide, l'interneurone possède un renflement (swelling) qui contient les petits organelles. A l'opposé du prolongement guide, l'interneurone possède un petit prolongement postérieur appelé « trailing process » (Bellion et al., 2005) (**Figure 15 A**).

La migration de l'interneurone s'effectue par une succession d'évènements cycliques permettant la translocation du noyau (nucléokinèse). Dans un premier temps, l'interneurone projette plusieurs branchements du prolongement guide vers l'avant, puis, sous l'effet de facteurs environnementaux, oriente l'un de ces branchements vers le signal attractif, tandis que les autres branches se rétractent. Puis, un renflement se forme à l'avant du noyau qui contient le centrosome et l'appareil de Golgi, et le noyau migre alors vers l'avant pour rejoindre le renflement, c'est la nucléokinèse (Bellion et al., 2005). L'interneurone rétracte son prolongement postérieur et un nouveau cycle peu alors commencer. La répétition de ces évènements couplés est responsable de l'aspect saltatoire de la migration de l'interneurone. Le trailing process des interneurones peut s'étendre et devenir un nouveau prolongement guide, permettant ainsi à l'interneurone de changer de direction de migration en inversant sa polarité (Nadarajah et al., 2002). L'ensemble de ces évènements reposent sur le remodelage du cytosquelette d'actine et de MTs de la cellule durant la migration.

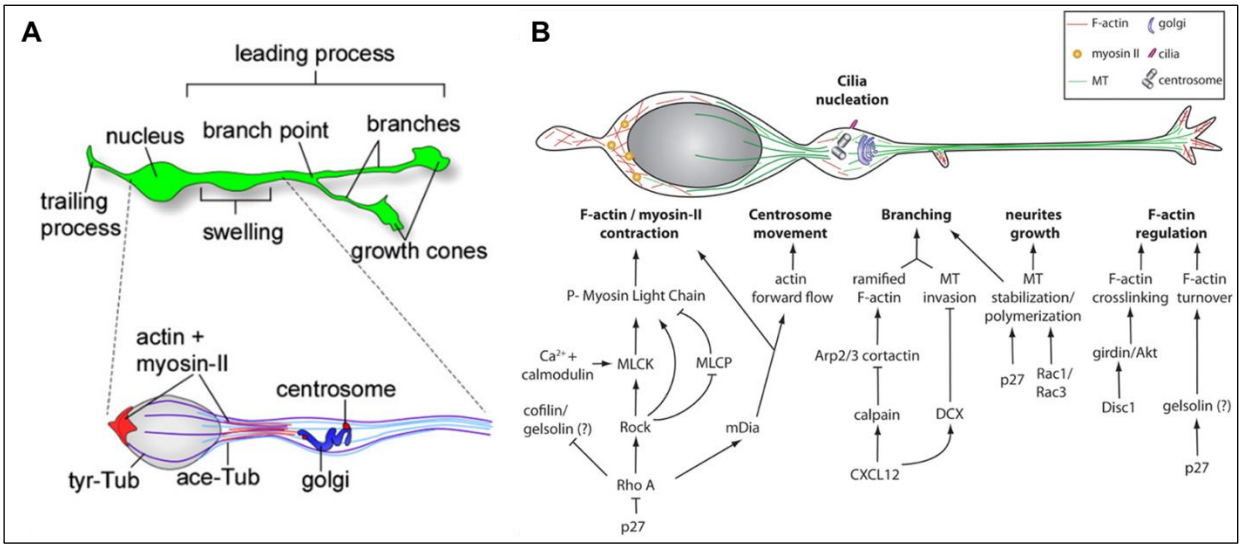


Figure 15: Morphologie de l'interneurone en migration et nucléokinèse.
(A) Morphologie de l'interneurone en migration (D'après Valiente and Marín, 2010). (B) Acteurs moléculaires permettant la migration tangentielle. (D'après Peyre et al., 2015).

Il a été mis en évidence que les interneurones possèdent un cil primaire qui contrôle leur direction de migration et leur réorientation vers la plaque corticale (Baudoin et al., 2012; Higginbotham et al., 2013). En effet, l'inhibition de la formation du cil spécifiquement dans les interneurones, entraîne une stabilisation des prolongements qui semble résulter d'un changement des propriétés dynamiques du cytosquelette de MTs et de l'adhésion cellulaire. Dans le cortex, les

interneurones dépourvus de cil forment des flux de migration tangentiels beaucoup plus denses que les neurones sauvages, et colonisent la plaque corticale plus tardivement. L'invalidation du cil primaire altère donc la capacité des interneurones à réorienter leur trajectoire dans le cortex (Baudoin et al., 2012). Les auteurs identifient par ailleurs le signal Shh (exprimé dans les routes migratoires des interneurones) comme contrôlant cette réorientation (Baudoin et al., 2012). Dans une autre étude, il a été montré que les interneurones mutés pour *Arl13b*, une GTPase de la membrane du cil, présentent, en plus des défauts de migration, un fort ralentissement de la migration (Higginbotham et al., 2013). Ainsi, bien que la ciliogenèse soit corrélée au cycle migratoire des interneurones, le comportement dynamique du cil pendant la migration tangentielle reste à caractériser.

b. Régulation moléculaire de la nucléokinèse

Lorsque l'interneurone migre, le réseau de MT forme une cage entourant le noyau et s'étend dans le centrosome et le processus antérieur (Bellion et al., 2005; Umeshima et al., 2007). Les MTs entourant le noyau sont tyrosinés et donc très dynamiques alors que ceux présent à l'avant du noyau et reliés au centrosome sont acétylés et donc plus stables (Baudoin et al., 2008; Umeshima et al., 2007) (**Figure 15 A**). Le réseau de MTs est impliqué dans le maintien du couplage entre le noyau et le centrosome via les MTs de la cage périnucléaire. Bien que la déstabilisation du réseau de MTs par des agents pharmacologiques conduit au raccourcissement du prolongement guide et altère la directionalité de la migration tangentielle, cela ne suffit pas pour inhiber la nucléokinèse *in vitro,* montrant ainsi que les forces de tractions et de pressions des MTs sur le noyau ne sont pas suffisantes à la migration du noyau (Baudoin et al., 2008; Schaar and McConnell, 2005). En revanche, le blocage de l'activité ATPasique de la myosine-II abolie la nucléokinèse montrant que la contraction de l'acto-myosine est nécessaire au mouvement nucléaire (Bellion et al., 2005; Schaar and McConnell, 2005).

La régulation des contractions de l'acto-myosine d'actine durant la migration tangentielle est indispensable et régulée par la protéine MLC (Myosin Light Chain). La phosphorylation de MLC par des protéines kinases est requise pour sa liaison aux filaments d'actine. Les GTPases de la famille Rho (comme par exemple RhoA, Rac1 ou Rac3) et leurs effecteurs ROCK (Rho-associated protein kinase) participent à la contraction de l'acto-myosine par plusieurs mécanismes (**Figure 15 B**). ROCK est capable de phosphoryler indirectement MLC, d'inhiber la protéine phosphatase MLCP (Myosin Light Chain Phosphatase) (Kimura et al., 1996) ou d'activer la protéine kinase MLCK (Myosin Light Chain Kinase) (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996), ce qui conduit *in fine* à la contraction de l'acto-myosine. Par ailleurs, RhoA est également capable d'inhiber la cofiline (une enzyme de dépolymérisation de l'actine) (**Figure 15 B**). Le remodelage du cytosquelette d'actine semble donc être essentiel dans la dynamique de l'acto-myosine au cours de la migration tangentielle. En effet, l'inhibition de la dépolymérisation de l'actine conduit à la stabilisation du prolongement guide et a pour conséquence un arrêt de la migration (Chai et al., 2009).

Par ailleurs, la modification des niveaux d'activation de RhoA par la perte de fonction de la protéine associée au MTs p27Kip1 conduit à une altération de la nucléokinèse (diminution de l'amplitude des nucléokinèses et augmentation de la fréquence des translocations nucléaires) qui conduisent à une diminution de la vitesse de migration des interneurones, mais également à une altération du branchement et une altération de la dynamique du cône de croissance, dues à une hyper-activation de la myosine-II (Godin et al., 2012) (**Figure 15 B**).

Tivodar et coll., ont montré que la double inactivation des gènes *Rac1* et *Rac3* chez la souris conduit à une altération de la migration tangentielle et à une diminution du nombre d'interneurones dérivés des EGM (Tivodar et al., 2015). *In vitro*, ces interneurones présentent des altérations majeures du cytosquelette d'actine et de MTs. La longueur du prolongement guide est réduite et les interneurones présentent une morphologie multipolaire anormale (Tivodar et al., 2015).

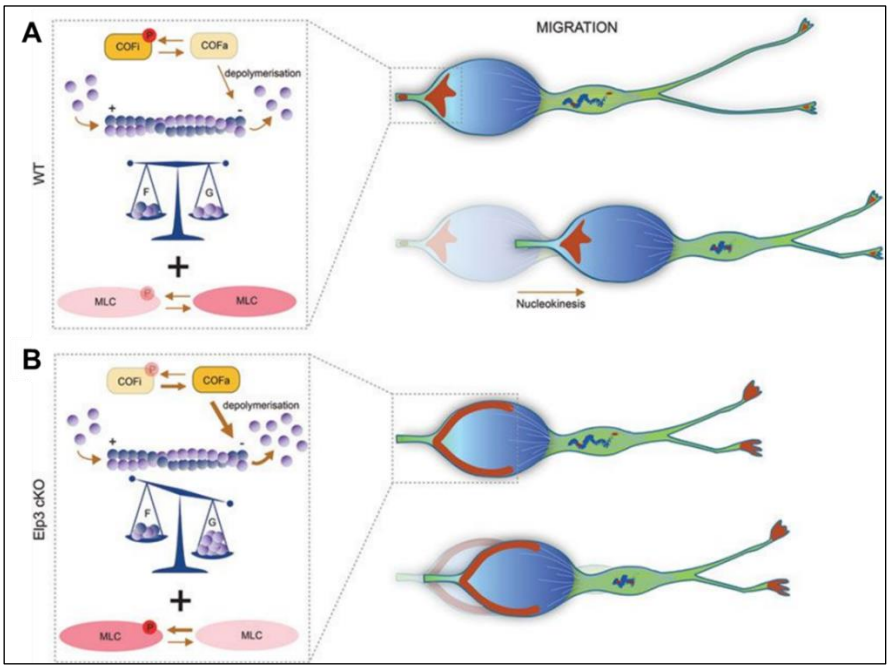


Figure 16 : Le complexe Elongator participe à la migration des interneurones corticaux en contrôlant la nucléokinèse et la dynamique du branchement.
(A) En condition contrôle, la sous-unité enzymatique Epl3 du complexe Elongator est exprimée. Les niveaux de cofiline s'équilibrent entre la forme inactive phosphorylée (COFi) et la forme active non phosphorylée (COFa), ce qui permet la formation des filaments d'actine qui, avec l'activation des moteurs myosine-II (par la phosphorylation de MLC), permettent la migration tangentielle des interneurones (nucléokinèse et branchement). (B) La perte d'expression de Elp3 conduit à une diminution du taux de cofiline phosphorylée et donc à une augmentation des niveaux de cofiline active. La cofiline dépolymérise alors les filaments d'actine ce qui altère le cytosquelette d'actine et donc inhibe les forces de contraction d'acto-myosine (signal rouge dans le soma et dans les cônes de croissance des interneurones). L'augmentation de l'activité de la kinase MLCK ainsi que l'altération du cytosquelette d'actine seraient à l'origine de l'augmentation de la phosphorylation de MLC (en rose). Modèle proposé par (Tielens et al., 2016).

Une étude récente a montré que le complexe Elongator (composé de plusieurs sous unités fonctionnelles Epl1 à Epl6) contrôle également la migration des interneurones en régulant les forces de contractions de l'acto-myosine (Tielens et al., 2016). Les auteurs montrent que la délétion du gène Epl3 (sous unité enzymatique du complexe Elongator) dans les interneurones en migration

conduit à la diminution de la forme phosphorylée (inactive) de la cofiline. Les taux de cofiline élevés dépolymérisent les filaments d'actine ce qui conduit à l'accumulation de microfilaments non polarisés dans le soma des interneurones. La formation du cytosquelette d'actine et la régulation spatiale des forces de contractions de l'acto-myosine sont alors perturbés, ce qui altère la migration tangentielle des interneurones. Les auteurs observent par ailleurs une augmentation de la phosphorylation de MLC, qui pourrait résulter de l'altération du cytosquelette d'actine et de l'augmentation de la quantité de la kinase MLCK impliqué dans sa phosphorylation (Tielens et al., 2016). Elongator contrôle donc les forces d'acto-myosine en régulant la distribution et le renouvellement des filaments d'actine au cours de la migration (**Figure 16**). Bien que la perte d'Epl3 conduise à la diminution des taux de cofiline dans la cellule, les mécanismes par lesquels le complexe Elongator contrôle l'activité de la cofiline sont inconnus. Les auteurs proposent que le complexe Elongator, qui interagit avec la cofiline *in vivo*, module l'activité de la cofiline en empêchant son interaction avec des enzymes phosphatases (Tielens et al., 2016).

Une autre étude a mis en évidence que la régulation intrinsèque de la durée des pauses des interneurones était contrôlé par Ccp1, enzyme majeure de dégutamination des protéines, exprimée par les interneurones (Silva et al., 2018). Les auteurs montrent que l'inactivation du gène *Ccp1* dans les interneurones conduit à une altération des forces de contractions de l'acto-myosine ce qui diminue de la durée des pauses des interneurones en migration, sans pour autant affecter leur vitesse. La durée des pauses des interneurones en migration influence grandement le niveau d'invasion du cortex par les interneurones. En effet, la perte de fonction de *Ccp1* conduit à une augmentation de l'invasion du cortex par les interneurones. Ccp1 régule l'activité enzymatique de la kinase MLCK en lui enlevant les résidus glutamines terminaux (Silva et al., 2018). Les auteurs mettent ainsi en évidence que le contrôle de l'activité des modifications post-traductionnelles (notamment la déglutamination) est un nouveau mode de régulation de l'activité enzymatique (Silva et al., 2018). Les modifications post-traductionnelles des protéines sont également importantes pour la migration radiaire. En effet, des manipulations génétiques inhibant l'activité des enzymes de modifications post- traductionnelles ont été associées à des défauts de migration des neurones de projections (voir § B-4-iii).

Le cytosquelette d'acto-myosine est donc crucial pour le mouvement du noyau lors de la nucléokinèse, pour le branchement et pour la division du cône de croissance, tandis que le cytosquelette de MTs semble impliqué davantage dans la croissance du prolongement guide et dans la directionalité de l'interneurone en migration.

c. Les facteurs extrinsèques impliqués dans la migration tangentielle

Outre les facteurs intrinsèques mentionnés dans le paragraphe précédent, la migration et la distribution des interneurones au sein du cortex cérébral requière également des signaux extracellulaires.

Parmi les signaux extracellulaires **répulsifs** présents dans les EGs, on peut par exemple citer le couple ligand/récepteur Ephrin-A5/EphA4R. Les molécules Ephrines présentes dans les EGM et l'APO se fixent sur les récepteurs EphA4R exprimés à la surface des interneurones, ce qui permet de remodeler le cytosquelette d'actine et dirige les interneurones dans la bonne direction. Bien que les cascades intracellulaires en aval du signal Ephrin demeurent peu connues, il a été montré que la GTPase RhoA et les protéines SFK (Src family kinase) sont impliqués dans ce processus (Wahl et al., 2000; Zimmer et al., 2008). Le striatum est également une structure répulsive pour les interneurones grâce à l'expression des sémaphorines de classe 3 : Sema3A et Sema3F (Marín et al., 2001). L'effet des sémaphorines sur les interneurones est médié par les récepteurs Neuropilines (Nrp) et Plexin. Le signal SemA3 régule le collapse actine-dépendant du cône de croissance via l'activation de RhoA, ROCK et la kinase LIM (LIMK) ce qui phosphoryle la cofiline et inhibe le renouvellement de l'actine filamenteuse (Aizawa et al., 2001; Causeret et al., 2004).

Les interneurones sont également stimulés par des molécules **attractives** qui favorisent leur mobilité et leur migration, comme par exemple les neurotrophines et les neurotransmetteurs. Par exemple, le couple GDNF (Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor)/ GFRα1 (GDNF Family Receptor α1) promeut la migration des interneurones *in vivo* en jouant sur la régulation du cytosquelette d'actine via SFK et la cortactine (enzyme de polymérisation de l'actine). Par ailleurs, les souris mutantes pour le récepteur *Gfrα1* présentent une réduction du nombre d'interneurones dans le cortex cérébral et dans l'hippocampe suggérant que le signal GDNF via GFRα1 est essentiel à la migration et la différentiation des interneurones GABAergiques (Canty et al., 2009; Pozas and Ibáñez, 2005). Un second exemple est le signal médié par l'acide γ-aminobutyrique (GABA). Le signal GABA, présent en grande quantité dans les EGM, est également requis pour la migration des interneurones corticaux (qui expriment les récepteurs $GABA_A$ et $GABA_B$). L'utilisation d'une molécule antagoniste qui inhibe la fixation du GABA à ses récepteurs, empêche en effet les interneurones de traverser la barrière cortico-striatale, conduisant ainsi à une accumulation des interneurones à la frontière pallium/subpallium (Cuzon et al., 2006). La fixation du GABA à ses récepteurs conduit à la dépolarisation de la membrane qui permet l'ouverture des canaux calciques membranaires. L'augmentation transitoire du taux de Ca^{2+} dans le cytoplasme active MLCK qui en retour phosphoryle MLC, permettant ainsi la contraction de l'actomyosine (Bortone and Polleux, 2009).

D'autres voies de signalisation extracellulaires qui ne seront pas détaillées dans cette partie, sont également requises pour la régulation de la migration tangentielle des interneurones, comme par exemple celles médiées par les couples ligand/récepteur BDNF/ TrkR (tropomyosin receptor kinase), Glutamate/AMPA, dopamine/D1/2, EGF (Epidermal growth factor)/ErbB4 (Peyre et al., 2015).

d. Régulation de l'intégration des interneurones dans les couches corticales

Le signal médié par les chémokines est crucial dans le contrôle de la migration tangentielle et de l'intégration des interneurones dans les couches corticales. Lorsqu'ils arrivent au niveau du

cortex cérébral, les interneurones migrent dans la ZM et la ZI et évitent la plaque cortical pendant environ 48h (López-Bendito et al., 2008). CXCL12, une chémokine attractive sécrétée par les progéniteurs corticaux des ZV et ZSV, est enrichie au niveau des routes migratoires utilisées par les interneurones. CXCL12 se fixe aux récepteurs CXCR4/7 exprimés à la surface des interneurones (López-Bendito et al., 2008; Tiveron et al., 2006). La perturbation du signal CRCX4/CRCX7 conduit à une sortie prématurée des interneurones de leurs routes migratoires, qui envahissent alors la plaque corticale, ce qui *in fine* perturbe l'organisation laminaire locale et leur distribution dans le cortex cérébral (López-Bendito et al., 2008).

Plusieurs études ont également suggéré que des signaux moléculaires sécrétés par les neurones de projection pouvaient contribuer à l'établissement de la distribution laminaire des interneurones (Hevner et al., 2004; Lodato et al., 2011b; Pla et al., 2006; Yabut et al., 2007). En utilisant le modèle souris *Reeler* (muté pour le gène *Reln* codant pour la Reelin), les auteurs ont montré une distribution aberrante des interneurones au sein du cortex a pour origine la désorganisation des couches corticales plutôt que la perte du signal Reelin dans les interneurones (Hevner et al., 2004; Pla et al., 2006; Yabut et al., 2007). Les travaux de Lodato et coll. supportent cette hypothèse. Les auteurs ont montré que l'inactivation du gène *Fezf2* chez la souris n'empêche pas la spécification des interneurones mais conduit à un défaut de distributions des sous-types d'interneurones STT+ et PV+ par un mécanisme cellulaire non-autonome (Lodato et al., 2011b). Les signaux excitateurs/inhibiteurs locaux influencent également la position finale des interneurones. Par exemple, il a été montré que la diminution de l'activité d'une population spécifique d'interneurone dérivés des EGC affecte la migration et le développement des interneurones (De Marco García et al., 2011).

B. Migration radiaire

1. Mise en place de la lamination corticale

Les neurones de projection nouvellement générés au niveau des zones germinales commencent leur migration de manière perpendiculaire à la surface du ventricule pour rejoindre la surface corticale et former la pré-plaque. Les premiers neurones glutamatergiques générés dans le télencéphale sont les cellules de Cajal-Retzius qui colonisent la ZM (future couche I) et la sous-plaque corticale dès E11 chez la souris (Kirischuk et al., 2014; Martínez-Cerdeño and Noctor, 2014). Ces neurones sont suivis par d'autres neurones nouvellement produit qui vont former la plaque corticale (PC). Les neurones de la PC séparent la pré-plaque en une zone marginale superficielle et en une sous-plaque (SP) qui est située sous la couche VI nouvellement formée. Puis, les vagues successives de neurones en migration vont occuper progressivement les couches corticales les plus superficielles. La lamination du cortex cérébral se fait selon une organisation « **inside-out** » ce qui signifie que les neurones appartenant aux couches les plus profondes arrivent à destination en premier, tandis que les neurones générés plus tardivement vont migrer à travers les couches profondes et coloniser les couches superficielles (**Figure 17**) (Molyneaux et al., 2007b).

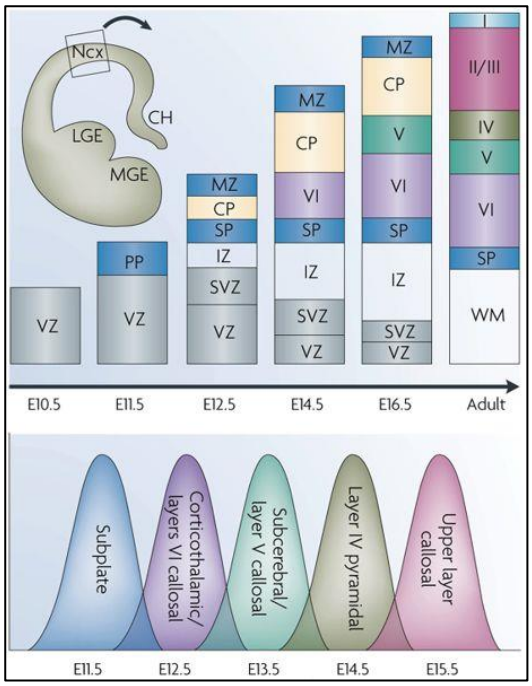


Figure 17 : Organisation laminaire des différents types de neurones de projection du cortex cérébral.
Sur les schémas sont représentés les dates de naissance et le positionnement final des neurones pyramidaux chez la souris. Les premiers neurones générés (autour de E12-E13) colonisent les couches corticales profondes tandis que les neurones générés plus tardivement (E15) migrent à travers les couches profondes et forment les couches superficielles. VZ : zone ventriculaire ; PP : pré-plaque ; SVZ : zone sous-ventriculaire ; IZ : zone intermédiaire ; SP : sous-plaque; CP : plaque corticale. MZ : zone marginale ; WM : substance blanche ; MGE : éminence ganglionnaire médianes ; LGE : éminences ganglionnaire latérales ; Ncx : neocortex (Molyneaux et al., 2007b).

Deux types de migration radiaires sont entrepris par les neurones pyramidaux : 1) la translocation somale durant les stades précoces du développement (E12-E13) ; puis 2) la migration radiaire par locomotion au cours de laquelle les neurones utilisent les prolongements de la glie radiaire des cellules gliales radiaires apicales (GRa) pour rejoindre leur destination finale dans la PC (Nadarajah et al., 2001). Le mode de migration radiaire par locomotion est le mode de migration principal des neurones de projection. Dans les paragraphes suivant, je détaillerai ce mode de migration, les processus cellulaires impliqués et les mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces processus, en me focalisant sur le rôle des cytosquelettes d'actine et de MTs.

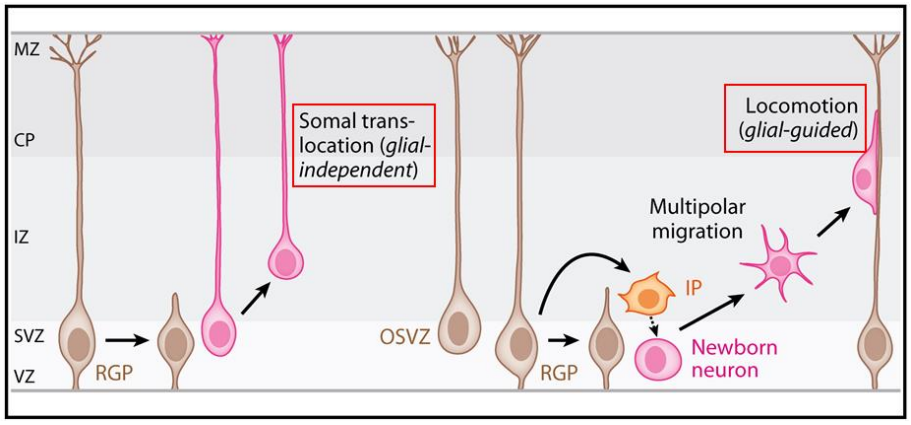


Figure 18 : Les différents modes de migration des neurones pyramidaux.
A gauche, la migration par translocation somale des neurones générés précocement au cours du développement ; à droite, la migration radiaire par locomotion des neurones générés plus tardivement. Voir texte principal. (Evsyukova et al., 2013).

2. La translocation somale

Les neurones générés précocement aux stades E12-E13 du développement chez la souris entreprennent une translocation somale. L'épaisseur encore fine du cortex permet à ces neurones d'étendre leur prolongement antérieur jusqu'à la surface piale et de s'y ancrer. Le soma effectue un mouvement vers le processus antérieur attaché à la surface piale. Puis, le prolongement antérieur s'épaissit et se raccourcit, permettant au soma de la cellule de migrer en direction de la surface pour atteindre la partie supérieure du cortex formant ainsi la pré-plaque. Ce mode de migration est appelé translocation somale car c'est le soma qui migre en totalité, et pas seulement le noyau (Nadarajah et al., 2001) (**Figure 18 A**). Ce mode de migration est indépendant de la glie radiaire. Les neurones qui effectuent la translocation somale sont générés par les cellules GRa lors d'une division asymétrique au cours de laquelle le neurone hérite du prolongement radiaire tandis que l'autre cellule fille reste une cellule GRa. Le neurone nouvellement produit est alors bipolaire et indistinguable de la cellule GRa. Il exprime d'ailleurs des marqueurs gliaux tels que nestine ou RC2 en plus de marqueurs neuronaux précoces. Puis, le neurone se détache de la surface ventriculaire et commence la translocation somale (Miyata et al., 2001b).

A mesure que le cortex s'épaissit, la distance de migration à parcourir s'allonge et les neurones deviennent dans l'incapacité d'étendre leur prolongement apical jusqu'à la surface piale. Ils ne peuvent donc plus utiliser la translocation somale comme mode de migration pour leur déplacement. Ils utilisent alors le prolongement des cellules GRa (la glie radiaire) comme guide dans leur locomotion (**Figure 18 B**). A l'inverse de la translocation somale, ce mode de migration radiaire par locomotion se fait en plusieurs étapes pendant lesquelles les neurones entreprennent des changements de morphologies.

3. Les étapes de la migration radiaire par locomotion

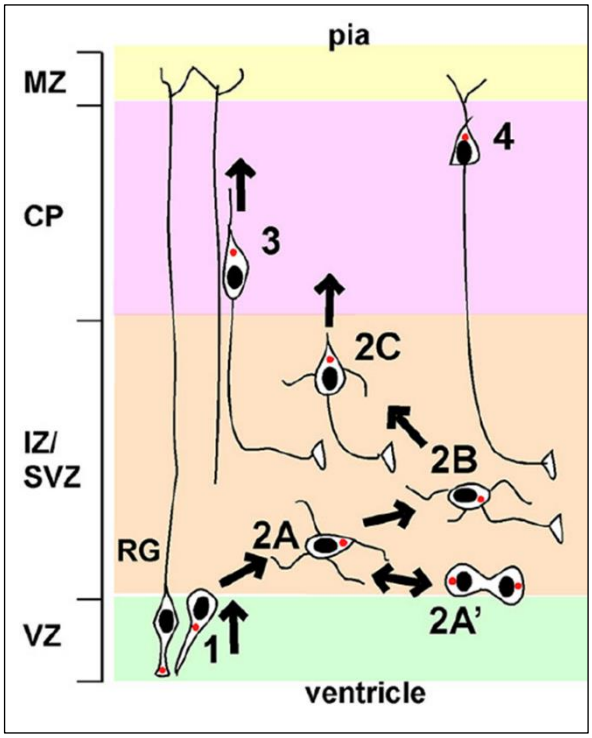


Figure 19 : Les étapes séquentielles de la migration neuronale radiaire.
Le neurone nouvellement généré transite par une phase multipolaire avant de se transformer en neurone bipolaire. Le neurone sous forme bipolaire s'attache alors au prolongement d'une cellule gliale radiaire ce qui lui permet de migrer vers la surface corticale. Une fois que le neurone a atteint la surface piale, il effectue une translocation somale. VZ : zone ventriculaire ; SVZ : zone sous-ventriculaire ; IZ : zone intermédiaire ; CP : plaque corticale. MZ : zone marginale (Cooper, 2014).

Les étapes de la migration radiaire par locomotion ont été décrites pour la première fois par Noctor et son équipe en 2004 grâce à des expériences de vidéo-microscopie de suivi de la migration des neurones entre les stades embryonnaires E11 et E17 chez le rat (Noctor et al., 2004). Ces observations ont révélé que les neurones en migration changeaient de morphologies et ajustaient leur mode de migration lors de leur transition entre les différentes zones le long de la voie migratoire (**Figure 19**).

a. Naissance du neurone bipolaire et transition bipolaire-multipolaire

Dans un premier temps, les neurones nouvellement générés par les cellules GRa adoptent une forme bipolaire (BP). Ils restent environ 10h dans la ZV avant de se détacher de la surface ventriculaire et de rejoindre la partie apicale de la ZSV (Itoh et al., 2013) (**Figure 19** – stades 1 et 2A). Arrivés dans la ZSV, les neurones acquièrent une morphologie multipolaire (MP). Les neurones MP sont très dynamiques. Ils semblent devenus indépendants des guides migratoires constitués par les fibres de la glie radiaire et sont capables de migrer latéralement et tangentiellement. Ils projettent et rétractent de nombreux processus dans toutes les directions et changent fréquemment d'orientation tout en tendant à se diriger vers la surface piale. Certains neurones émettent un prolongement en direction du ventricule et peuvent transloquer leur soma en direction de celui-ci, en un mouvement de migration rétrograde, avant de passer en phase 3. D'autres neurones ne font que marquer une pause au niveau de la ZSV sans effectuer de migration rétrograde. Ils restent MP pendant 24 à 36h créant ainsi une nouvelle zone appelée zone d'accumulation multipolaire (Noctor et al., 2004; Tabata and Nakajima, 2003).

b. Transition multipolaire-bipolaire

Le neurone MP étends ensuite un prolongement horizontale qui deviendra l'axone (**Figure 19** –stade 2B), et un prolongement guide (leading process) dirigé vers la surface piale. C'est la transition multipolaire-bipolaire (MP-BP). Le neurone BP commence alors sa migration vers la surface piale (Phase 3) (**Figure 19** –stade 2C).

Une étude récente a mis en évidence pour la première fois que la transmission synaptique entre les neurones de la sous-plaque (SP) et les neurones multipolaires nouvellement générés était importante pour la transition MP-BP des neurones (Ohtaka-Maruyama et al., 2018) (**Figure 20**). La SP est une couche corticale transitoire constituée de populations neuronales aux propriétés fonctionnelles et morphologiques matures. Les neurones de la SP reçoivent des influx nerveux provenant des neurones de projection thalamiques et sont également connectés entre eux et à d'autres neurones corticaux via des synapses chimiques et électriques (Kanold and Luhmann, 2010). Dans leur étude, les auteurs montrent que les neurones de la SP projettent des axones vers la ZI, où ils établissent des contacts avec les neurones multipolaires, avec lesquels ils forment des synapses glutamatergiques (Ohtaka-Maruyama et al., 2018). De plus, la migration radiaire est altérée lorsque l'activité électrique des neurones de la SP est réduite ou lorsque la transmission synaptique est inhibée. Ces résultats montrent que le la transmission synaptique glutamatergique

provenant des neurones de la SP est nécessaire pour la transition des neurones MP vers une forme BP et pour la locomotion (Ohtaka-Maruyama et al., 2018).

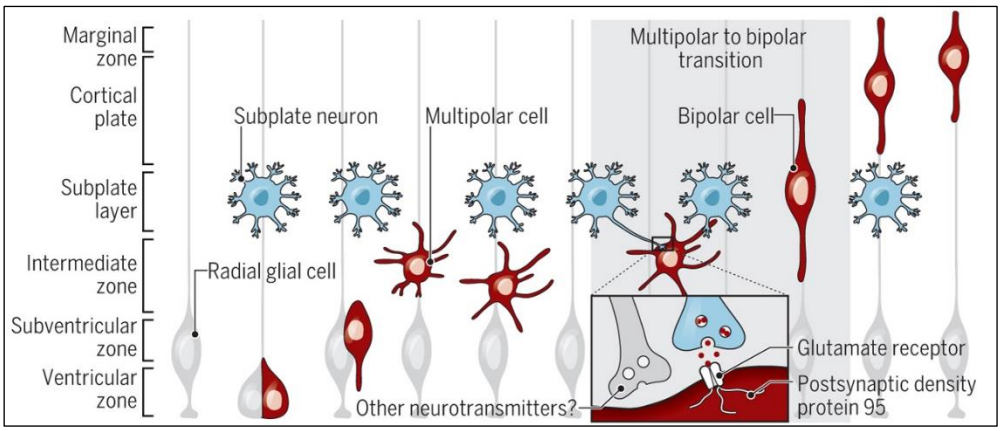


Figure 20 : La transmission synaptique des neurones de la sous-plaque contrôle la migration radiaire des neurones de projection.
Les neurones multipolaires présents dans la zone intermédiaire reçoivent des influx synaptiques glutamatergiques de la part des neurones présents dans la sous-plaque, ce qui influence leur transition multipolaire à bipolaire. Modèle proposé par (Ohtaka-Maruyama et al., 2018). Schéma issu de (Schinder and Lanuza, 2018).

c. Phase de locomotion

Après la transition MP-BP, le neurone BP sort de la ZI par locomotion en utilisant le prolongement des cellules GRa comme guide (**Figure 19** – stade 3) (Noctor et al., 2004). Tout comme les interneurones, le mouvement des neurones de projection se fait en trois étapes successives et répétées permettant la nucléokinèse c'est-à-dire le déplacement du noyau (Schaar and McConnell, 2005; Tsai and Gleeson, 2005). Les étapes de la nucléokinèse du neurone de projection sont semblables à celles de l'interneurone en migration (**Figure 21**) : le neurone de projection procède d'abord à une extension de son prolongement guide, dont le cône de croissance situé à l'extrémité subit des extensions et des rétractations rapides à mesure qu'il explore son environnement. Une fois le prolongement guide stabilisé, le centrosome, positionné à l'avant du noyau migre vers le prolongement guide et forme une dilatation. Rapidement, le noyau se déplace vers l'avant pour rejoindre cette dilatation : c'est la nucléokinèse. Le prolongement postérieur se rétracte généralement en même temps que la nucléokinèse.

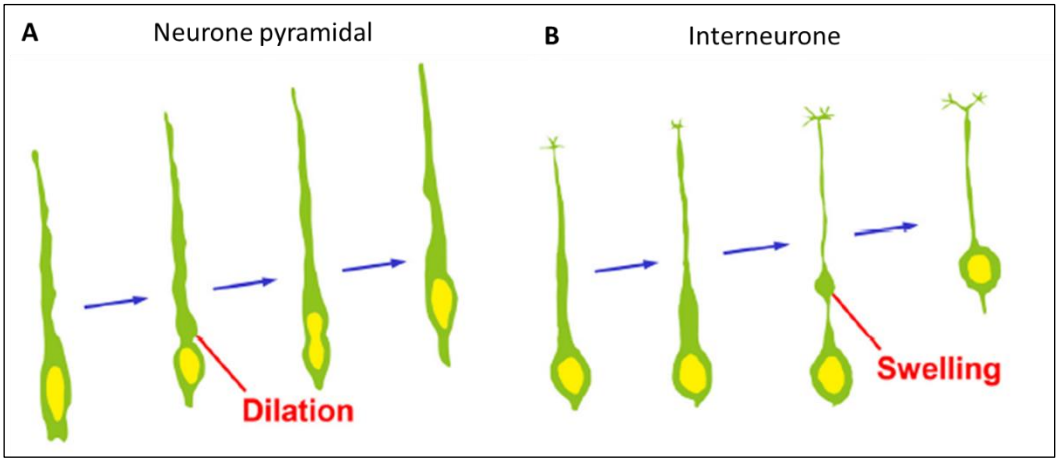


Figure 21 : Modifications morphologiques des neurones de projection et des interneurones en migration.
Contrairement à la dilatation de l'interneurone qui se forme relativement loin du noyau, la dilatation du neurone de projection se forme dans la partie proximale du prolongement guide et reste relativement donc proche du noyau. Lors de la nucléokinèse noyau n'effectue pas de saut, comme c'est le cas chez l'interneurone, mais s'allonge pour rejoindre cette dilatation. (Nishimura et al., 2017).

L'adhésion des neurones de projection bipolaire à la glie radiaire dépend de molécules d'adhésion cellulaire telles que les intégrines α3β1, les N-cadhérines et les caténines. Les N-cadhérines sont des protéines transmembranaires fixées aux filaments d'actine par l'intermédiaire de protéines caténines. Les intégrines α3β1 sont des protéines transmembranaires qui jouent le rôle de récepteurs d'adhésion cellulaire en interagissant avec les protéines de la matrice extracellulaire d'une part et avec les constituants intracellulaires d'autre part. Les N-cadhérines sont des protéines transmembranaires fixées aux filaments d'actine par l'intermédiaire de protéines caténines. Ces protéines d'adhésion sont essentielles à la migration radiaire des neurones de projection. Les souris mutées pour l'intégrine α3β1 ou bien déplétées pour la N-cadhérine montrent en effet des défauts de migration radiaire des neurones bipolaires le long de la glie radiaire (Anton et al., 1999; Shikanai et al., 2011), indiquant un rôle clé de ces molécules d'adhésion dans la migration radiaire. Des études *in vitro* montrent que le blocage de la fonction des intégrines α3β1 conduit à la perte de l'adhésion des neurones à la glie radiaire (Anton et al., 1999). Par ailleurs, la surexpression de la N-cadhérine perturbe également, mais de façon moins sévère, la migration neuronale ce qui suggère qu'un niveau adéquat de N-cadhérine est nécessaire pour une migration radiaire normale (Shikanai et al., 2011). De façon intéressante, la surexpression ou l'inhibition de N-cadhérine dans les neurones en migration conduit à des morphologies différentes : tandis que les neurones surexprimant la N-cadhérine restent fortement attachés à la glie radiaire, la perte d'expression de la N-cadhérine affaiblit l'attachement des neurones à la glie radiaire (Shikanai et al., 2011). La N-cadhérine permet le maintien de la polarité BP du neurone au cours de sa locomotion. La perte de l'expression de N-cadhérine conduit en effet à un défaut de polarisation et de migration des neurones (Gärtner et al., 2012; Kawauchi et al., 2010). Une étude récente a montré que les cadhérines 2 (CDH2) et CDH4 coopèrent pour réguler la migration radiaire par l'intermédiaire de la protéine

tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) et des caténines-α et β (Martinez-Garay et al., 2016). Les auteurs ont observés que la perturbation du signal médié par les cadhérines 2 et 4 n'affecte pas la formation ni l'élongation du prolongement guide, mais altère en revanche la nucléokinèse. Les auteurs montrent que ce défaut est partiellement sauvé par l'expression de Lis1, qui a été montré comme impliqué dans la locomotion des neurones corticaux lors de la migration radiaire (Tsai et al., 2007). Une autre étude a montré que la délétion conditionnelle de la α-E-catenin dans le cortex en développement chez la souris conduit à une hétérotopie sous-corticale en bande (malformation corticale caractérisé par des neurones hétérotopiques en organisation laminaire à proximité du cortex normal), associée à une altération de la migration neuronale (Schmid et al., 2014). L' α-E-catenin est présente au niveau des jonctions adhérentes des cellules GRa et permet la jonction entre les microfilaments d'actine et les cadhérines. Les auteurs montrent que la déplétion de α-E-catenin conduit à l'altération du cytosquelette d'actine dans les cellules GRa ce qui altère la glie radiaire. Le défaut de migration des neurones de projection est donc la conséquence de l'altération de la glie radiaire.

Le trafic membranaire intracellulaire au sein des neurones en migration a récemment émergé comme étant essentiel au cours de la migration radiaire. Kawauchi et coll. ont mis en évidence le rôle crucial de l'endocytose médié par les protéines GTPases Rab au cours de la migration radiaire (Kawauchi et al., 2010). Ils montrent que l'endocytose dépendante de Rab5 et de Rab11 est nécessaire à la migration radiaire, en particulier au cours de la phase de locomotion. Notamment, ils montrent que Rab11 régule le trafic intracellulaire de la N-cadhérine, vers les prolongements neuronaux via l'endocytose (Kawauchi et al., 2010). Dans une étude récente, Barnat et coll., ont montré que la Htt régule la transition MP-BP par le biais du recyclage de la N-cadhérine dépendant de Rab11. Les auteurs ont en effet observé que dans les neurones déficients en Htt, la N-cadhérine s'accumule dans le corps cellulaire et non dans les prolongements neuronaux, ce qui entraîne un défaut de la migration radiaire (Barnat et al., 2017). Une autre protéine GTPase également impliquée dans la migration neuronale est Arf6 (ADP ribosylation factor). Falace et coll., ont montré que l'inhibition de Tbc1d24 (TCB1 domain family member 24) qui régule la fonction de Arf6, entraîne une dérégulation de la transition MP-BP altérant ainsi la migration neuronale (Falace et al., 2014).

Comme décrit plus haut, le prolongement guide des interneurones exhibe de multiples branches qui sont nécessaires à son orientation et aux changements de directions lors de la migration neuronale. Une étude récente a montré que, chez la souris, environ la moitié des neurones possèdent un prolongement antérieur qui exhibe également des branches au cours de la migration radiale (Martínez-Martínez et al., 2019). Par ailleurs, les auteurs ont observé que cette abondance était encore plus grande chez le furet, une espèce gyrencéphale. En effet, alors que le prolongement guide des neurones de souris possède en moyenne 2 points de branchement, celui des neurones de furet en présente en moyenne plus de 3. La présence de branches en plus grande abondance

chez le furet que chez la souris supporte l'idée que ces branches pourraient servir à explorer l'environnement neuronal et pourraient être requises lors de la dispersion tangentielle des neurones, qui est une étape critique dans le processus de gyration des espèces gyrencéphales. Leurs expériences de vidéo-microscopie montrent par ailleurs que ce branchement est un processus normal lors de la migration radiaire et qu'il n'altère pas la migration neuronale. De plus, contrairement aux interneurones, les neurones de projection fortement branchés présentent la même capacité migratoire et la même dynamique que les neurones pyramidaux non branchés (Martínez-Martínez et al., 2019)

d. Translocation somale terminale

Une fois que le neurone a atteint la surface piale de la plaque corticale, il effectue une translocation somale terminale concluant ainsi la migration radiaire (**Figure 19** –stade 4). La translocation somale terminale est essentielle à l'organisation laminaire inside-out du cortex, puisqu'elle permet aux neurones de passer au-delà des neurones précédents. La partie la plus supérieure de la plaque corticale est la zone corticale primitive, qui possède des caractéristiques histologiques différentes comparées aux couches inférieures (Sekine et al., 2011). Les neurones s'arrêtent de manière transitoire juste en dessous de cette zone avant de subir la translocation somale terminale.

4. Rôles des cytosquelettes d'actine et de microtubule dans la régulation la migration radiaire

Au cours de la migration radiaire, le neurone est soumis à des voies de signalisation qui contrôlent le réarrangement du cytosquelette d'actine et de microtubules (MT). Les principales molécules et voies de signalisation impliqués dans la migration radiaire sont schématisés en **Figure 28**, à la fin de cette section.

a. Le cytosquelette de microtubule et ses protéines associées

Les MTs forment un réseau essentiel à de nombreuses fonctions cellulaires. Au sein des neurones, les MTs assurent la dynamique des prolongements et jouent un rôle crucial dans le couplage entre le noyau et le centrosome durant la nucléokinèse. Dans cette partie, je présenterai les différentes fonctions des MTs et de leurs protéines associées dans la régulation de la migration radiaire. Le rôle des kinésines dans ce processus sera détaillé dans le chapitre 2 § II-B.

i. Généralités sur le cytosquelette de MT

Le microtubule est composé d'un assemblage d'hétérodimères de tubuline α et β. Ces hétérodimères polymérisent pour former un protofilament et 13 protofilaments s'ajoutent latéralement les uns aux autres, de manière décalée pour former le MT (**Figure 22**). Les MTs sont polarisées : tous les protofilaments d'un MT ont la même orientation, avec une extrémité (-) composée d'un anneau de tubuline α et une extrémité (+) composée d'un anneau de tubuline β. Ces

deux extrémités diffèrent par leur localisation cellulaire et leurs propriétés. L'extrémité (-) des MTs est ancrée au niveau des centres organisateurs des MTs (MicroTubules Organizing Center, MTOC) tel que le centrosome, alors que l'extrémité (+) est orientée vers la périphérie cellulaire et est capable de croissance rapide (Roostalu and Surrey, 2017).

In vitro, en conditions de températures et de pH adaptés, les MTs polymérisent spontanément et rapidement en présence de grandes concentrations de tubuline α et β, de GTP et de Mg^{2+}. La polymérisation *in vitro* en fait en deux étapes : 1) nucléation spontanée et 2) élongation rapide durant laquelle les dimères de tubuline α et β se lient aux deux extrémités des MTs, bien que la polymérisation soit plus rapide à l'extrémité (+). *In vivo*, la concentration plus faible en tubuline α et β ne permet pas une nucléation spontanée. La nucléation est un processus lent qui commence à l'extrémité (-) du MT et qui est induit par des complexes de nucléation appelés γ-TuRCs (γ-tubulin ring complexes) et la tubuline- γ, retrouvés au niveau des MTOC (généralement le centrosome). Chez les vertébrés, le recrutement du complexe γ-TuRCs au centrosome et l'activation de la nucléation nécessitent l'intervention de nombreuses protéines dont la plupart ont été identifiées assez récemment, comme par exemple NEDD1 (neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 1) (Lüders et al., 2006), Mozart1 et 2 (mitotic spindle-organizing protein 1 ou 2) (Teixidó-Travesa et al., 2010), ninein (Delgehyr et al., 2005) ou CDK5RAP2 (Choi et al., 2010).

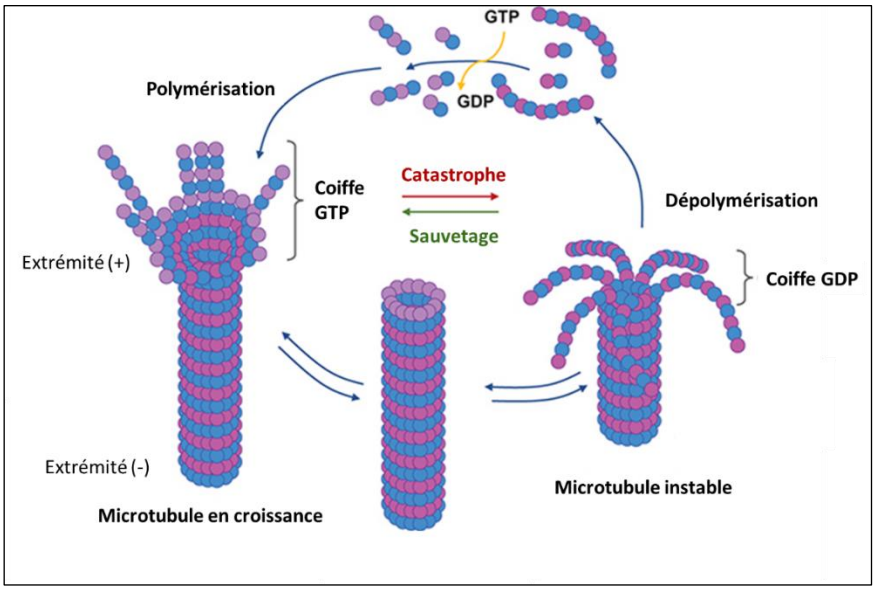


Figure 22 : Structure et dynamique des microtubules.
Les microtubules (MTs) sont des structures hautement dynamiques qui se polymérisent et se raccourcissent continuellement au sein de la cellule, et ce, à vitesse variable. Voir texte principal. (Adapté de Mierke, 2018).

L'association des dimères tubuline α et β dépend de l'hydrolyse du GTP (guanosine triphosphate). La tubuline α lie le GTP non échangeable tandis que la tubuline β lie le GTP et l'hydrolyse en GDP+Pi. L'hydrolyse de GTP par la tubuline β permet alors l'assemblage d'un dimère α/β à l'extrémité du MT et favorise donc l'élongation du MT (**Figure 22**) (Roostalu and Surrey, 2017). Les MTs alternent entre des phases de croissance et de désassemblage, dans un processus

d'instabilité dynamique qui permet à chaque MT d'explorer différentes régions cellulaires à la recherche de structures spécifiques (kinétochores, chromosomes) et de se rétracter lorsqu'ils atteignent la périphérie cellulaire. Les dimères de tubulines sont capables de se détacher en masse et de façon très rapide lors d'un phénomène dit de « catastrophe », qui peut s'arrêter spontanément et permettre alors au MT de se reformer au cours du « sauvetage » (**Figure 22**). Les extrémités en cours d'élongation présentent des protofilaments plus longs que d'autres. Par contre, lors de la phase de raccourcissement, les extrémités sont plus étalées et ont tendance à se recourber. Les MTs peuvent aussi avoir une extrémité en cours d'élongation et l'autre en cours de dépolymérisation : ce phénomène est appelé le « treadmilling ». Les concentrations de GTP et de GDP au niveau de l'extrémité (+) du MT sont un facteur important dans la stabilité. Une forte concentration en GDP entraîne en effet un affaiblissement des liaisons entre les dimères et le protofilament et le MT est alors plus propice à la dépolymérisation. En revanche, si l'extrémité est plus riche en GTP elle est protégée par cette coiffe (appelée « GTP cap »). La perte de la coiffe GTP induit une diminution des contacts latéraux entre les protofilaments et conduit à un désassemblage rapide du MT (catastrophe) (Conde and Cáceres, 2009; Roostalu and Surrey, 2017).

Les neurones sont des structures hautement polarisées dont les prolongements (axones et dendrites) sont fonctionnellement et morphologiquement différents. De nombreuses études ont montré que, dans des cultures de neurones hippocampiques matures, l'orientation des MTs diffèrent entre les axones et les dendrites : au sein des axones, tous les MTs possèdent leur extrémité (+) dirigée en direction de la terminaison axonale tandis que l'extrémité (-) est dirigée vers le soma. En revanche, dans les dendrites, l'orientation des MTs est mixte avec une abondance équivalente entre les MTs aux extrémités (+) qui pointent vers l'extérieur et les MTs aux extrémités (+) qui pointent vers le soma. Une étude récente utilisant l'imagerie super-résolutive a confirmé ces observations *in vitro* (dans des cultures de neurones hippocampiques de rat) (Tas et al., 2017). Outre leur orientation, les MTs axonaux et dendritiques se distinguent également par leurs différences de modifications post-traductionnelles et par l'expression de différentes protéines associées aux MTs (MAP), qui régulent la dynamique des MTs *in vivo* (**Figure 23**).

Dans les neurones matures, contrairement aux autres types cellulaires, les MTs ne sont pas nuclées à partir du centrosome. En effet, des études ont montré que le centrosome perd progressivement sa fonction de centre organisateur des MTs au cours du développement neuronal à la fois *in vitro* et *in vivo* (Stiess et al., 2010; Yau et al., 2014). En accord avec ces observations, il a été montré que chez la drosophile, les neurones sont dépourvus de centrosomes et la nucléation, la croissance et l'orientation des MTs est localement régulée (Nguyen et al., 2011; Stiess et al., 2010). Des études récentes ont mis en lumière le rôle de plusieurs complexes de nucléation indépendant du centrosome et qui recrutent la tubuline-γ aux MTs, comme par exemple le complexe Augmin (dont la perte de fonction perturbe la polarité du réseau de MTs dans l'axone des neurones de mammifères, mais ne semble pas avoir d'effets sur les MTs dendritiques) (Cunha-Ferreira et al.,

2018; Sánchez-Huertas et al., 2016) ; les centrosomines (qui permettent la nucléation à partir du Golgi) (Yalgin et al., 2015) ou encore les protéines CAMSAP et SSN1, respectivement impliquées dans la nucléation des MTs dans les dendrites (Pongrakhananon et al., 2018; Yau et al., 2014) et au niveau des points de branchement axonaux (Basnet et al., 2018). Les enzymes de coupure des MTs (katanine et spastine) peuvent également contribuer à la nucléation *de novo* des MTs dans les axones (Sharp and Ross, 2012).

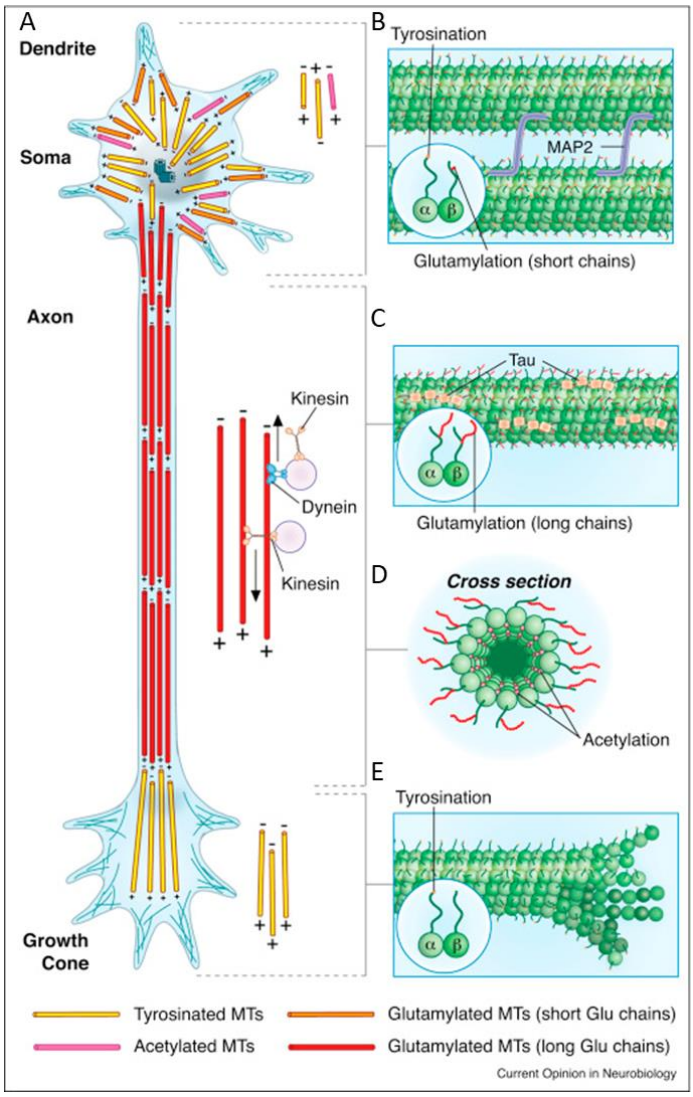


Figure 23 : Organisation du cytosquelette de MTs et distribution des modifications post-traductionnelles au sein des neurones matures.
(A) Au sein des axones et des cônes de croissance, les MTs sont tous orientés dans le même sens, avec l'extrémité (+) qui pointe vers l'extérieur. Dans les dendrites, l'orientation des MTs est mixte avec des MTs aux extrémités qui pointent dans les deux directions. (B) Dans les dendrites, les MTs sont tyrosinés ou acétylés ou glutamylés (avec de courtes chaines de glutamates). (C) Dans les axones, les MTs sont détyrosynés ou glutamylés (avec de longues chaines de glutamates). (D) L'acétylation des MTs se fait au niveau de la lysine 40 de la tubuline-α, présent dans la lumière du MT (cross section). (E) Au sein des cônes de croissance, les MTs sont dynamiques et généralement tyrosinés. Tandis que MAP2 se concentre dans les dendrites et interagit avec les extrémités carboxy-terminales des tubulines (B), Tau est retrouvé au niveau des axones (C). (Park and Roll-Mecak, 2018).

ii. Les tubulines

Les tubulines α et β sont les unités structurelles des MTs et forment deux familles de gènes très conservées au cours de l'évolution. Chez la souris, il existe 8 gènes codant pour les tubulines α et 8 gènes codant pour les tubulines β. Chez l'humain, on retrouve 10 gènes pour les tubulines α et 9 gènes pour les tubulines β. Les tublines-γ (codés par les gènes *Tubg1* et *Tubg2*) sont recrutées dans les complexes de nucléation des MTs et participent à la nucléation du MTs.

De nombreuses mutations dans les gènes codants pour les tubulines ont été identifiées comme responsables de « tubulinopathies » dont les phénotypes observés sont variables mais qui regroupent des malformations du développement cortical (MDC) associées à des défauts de la

migration neuronale telles que les lissencéphalies (défauts de l'apparence des circonvolutions du cerveau, qui peuvent apparaître simplifiées ou complètement absentes, associée à une organisation anormale des couches corticales), les polymicrogyries (anomalie locale du cortex cérébral qui se caractérise par la présence d'un excès de gyrations), les hétérotopies neuronales (accumulation de neurones ectopiques dans la substance blanche) (Gadadhar et al., 2017). La découverte de ces mutations confirme donc l'importance des MTs dans le développement cortical.

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 neuro-développementales (Keays et al., 2007). Il s'agit par ailleurs du gène de tubuline le plus fréquemment muté retrouvé chez les individus présentant diverses MDC dont différents types de lissencéphalies (Bahi-Buisson et al., 2008; Fallet-Bianco et al., 2008; Keays et al., 2007; Poirier et al., 2013a). Les mécanismes moléculaires altérés par des mutations dans *TUBA1A* sont variés et dépendent de la localisation de la mutation au sein du gène et ont été décrites dans une revue récente (Aiken et al., 2018). Brièvement, les mutations dans *TUBA1A* peuvent empêcher la formation du dimère de tubuline α/β et donc empêcher son incorporation dans le MT en croissance conduisant à une diminution de la croissance des MTs. D'autres mutations n'empêchent pas la formation de l'hétérodimère et l'incorporation de ceux-ci au réseau de MT pourrait soit empêcher le recrutement de certaines MAPs ou moteurs moléculaires importants pour la migration neuronale, ou bien directement affecter la dynamique des MTs et leur croissance.

Le gène *TUBB2*, qui code pour l'isoforme de tubuline β-2B est également retrouvé muté chez des individus présentant principalement des polymicrogyries, qui se caractérisent par un excès de gyrations et de sillons peu profonds (Jaglin et al., 2009). De manière similaire aux mutations retrouvées dans le gène *TUBA1A*, les mutations dans le gène *TUBB2* altèrent le repliement de la tubuline et la formation de l'hétérodimère α/β. Tout comme *TUBA1A*, *TUBB2* est fortement exprimé dans les neurones post-mitotiques à des stades clés de la migration neuronale. Des expériences d'EIU chez la souris ont montré que l'altération de l'expression de *TUBB2* est responsable d'anomalies de lamination du cortex dues à un défaut de migration neuronale (Jaglin et al., 2009).

Des mutations dans le gène *TUBB3*, codant pour l'isoforme de tubuline β-3 ont été également été retrouvées chez des individus présentant des MDC associées à des défauts de la migration neuronale (Poirier et al., 2010). La diminution de l'expression de *TUBB3* dans les neurones post-mitotiques chez la souris conduit à un retard de la migration radiaire (Saillour et al., 2014). Les neurones bloqués dans la ZI présentent par ailleurs des défauts de polarisation qui conduisent à un retard de l'acquisition de la morphologie bipolaire. De manière intéressante, les auteurs ont observé une augmentation du nombre de progéniteurs intermédiaires mais une réduction de leur prolifération, suggérant que l'inactivation de la protéine TUBB3 dans les neurones post-mitotiques a un effet indirect sur la prolifération des progéniteurs (Saillour et al., 2014). Cet effet « feed-back » des neurones déplétés pour *TUBB3* sur les progéniteurs pourrait être dû par exemple à l'émission

de signaux anti-prolifératifs déclenchés par des contacts entre les cellules bloquées et les progéniteurs intermédiaires (Saillour et al., 2014).

Des mutations dans le gène *TUBB5*, codant pour l'isoforme de tubuline β-5 sont responsables de microcéphalie et d'agénésie du corps calleux chez l'humain (Breuss et al., 2016). La déplétion de *Tubb5 in vivo* chez la souris perturbe la prolifération des progéniteurs et altère la migration neuronale. Les auteurs ont observé que deux des trois mutations identifiés chez les individus altèrent l'assemblage des hétérodimères α/β en inhibant le repliement de la tubuline médiée par les protéines chaperonnes. La troisième mutation pourrait altérer la dynamique des MTs et/ou compromettre la fixation de MAPs (Breuss et al., 2016).

Des mutations faux-sens dans le gène *TUBG1* (codant pour la tubuline-γ) ont été identifiés chez des patients présentant des pachygyries (circonvolutions cérébrales trop épaisses et trop peu nombreuses), des microcéphalies et des anomalies de formation du corps calleux associées à de l'épilepsie et de la DI (Brock et al., 2018; Poirier et al., 2013b). Dans une étude récente, Ivanova et coll., ont investigués les conséquences de 4 de ces variants dans le développement cortical en utilisant l'EIU et un modèle souris hétérozygote exprimant l'un des variants (Ivanova et al., 2019). Les auteurs ont montré que l'expression ectopique des quatre variants *TUBG1* dans les neurones de souris par EIU conduit à un arrêt de la migration. De manière intéressante, les souris knock-in hétérozygotes pour l'un des variants présentent également un défaut de lamination corticale au cours du développement associé à une microcéphalie et des défauts d'organisation de l'hippocampe. La tubuline-γ étant essentielle à la formation du cytosquelette de MTs contribuant à la formation du fuseau mitotique lors de la division cellulaire, les auteurs ont voulu savoir si l'expression de ces variants pouvait altérer la prolifération et la neurogenèse. De manière surprenante, la surexpression de trois des variants *TUBG1* n'altèrent pas la prolifération des progéniteurs, et les souris mutées ne présentent pas non plus de défauts de prolifération. Des études de vidéo-microscopie montrent que la position du centrosome dans les neurones en migration n'est pas affectée, suggérant que le phénotype migratoire n'est probablement pas lié à la fonction centrosomale de *TUBG1*, mais plutôt à une altération de la dynamique des MTs. En effet, les auteurs ont observé une réduction de la dynamique du cytosquelette de MTs dans les fibroblastes de patient et dans des cellules surexprimant les variants (Ivanova et al., 2019).

iii. Les modifications post-traductionnelles des tubulines

La tubuline incorporée dans les MTs peut subir des modifications post-traductionnelles souvent réversibles telles que la phosphorylation, l'acétylation, la sumoylation, la detyrosination, la (poly)glutamylation etc... A l'exception de l'acétylation de la lysine 40 de la tubuline α qui a lieu dans la lumière du MT, les principales modifications de la tubuline ont lieu sur les régions carboxy-terminales des sous unités α et β exposées à la surface du MT. Les modifications post-traductionnelles forment un « code tubuline » qui représente des signaux pour les protéines qui interagissent avec les MTs, telles que les MAPs (protéines associées aux MTs) ou les moteurs

moléculaires (kinésine et dynéine). Elles influencent ainsi le recrutement de ces protéines aux MTs et jouent un rôle dans la régulation de la dynamique des MTs (Gadadhar et al., 2017; Song and Brady, 2015).

Dans le contexte de la migration neuronale, quelques études montrent le rôle crucial joué par l'acétylation de la tubuline α. Des expériences d'EIU ont montré que la surexpression de la forme non acétylable de la tubuline α dans les neurones post-mitotiques conduit à des défauts de migration radiaire (Creppe et al., 2009; Li et al., 2012). Dans la même idée, l'inhibition de la fonction du complexe Elongator ou de l'enzyme MEC17/ATAT1 par shRNA, qui ont tous les deux une activité acétyltransférase, conduit à des défauts de migration des neurones de projections (Creppe et al., 2009; Li et al., 2012) et perturbent la transition de la morphologie MP à BP dans la zone intermédiaire du cortex cérébral (Li et al., 2012). Cependant, bien que les souris homozygotes mutées pour *ATAT1* présentent un élargissement des ventricules latéraux, l'épaisseur corticale et la lamination corticale ne semblent pas altérées (Li et al., 2019). Dans une autre étude, les auteurs s'intéressent à la protéine Srpx2 (Sushirepeat containing protein,X-linked 2) dont la surexpression *in vitro* augmente les niveaux de tubulines α et β acétylés (Salmi et al., 2013). Par injection *in utero* de siRNA de Srpx2, les auteurs montrent que la diminution de l'acétylation des MTs conduit également à un défaut de migration neuronale (Salmi et al., 2013). Par ailleurs, 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).

Outre l'acétylation, les tubulines α peuvent être soumises à des cycles de détyrosination et re-tyrosination. La tyrosination est une réaction réversible catalysée par la tubuline-tyrosine-ligase (TTL) tandis que la détyrosination correspond au clivage de la tyrosine de l'extrémité C-terminale et les enzymes impliquées dans détyrosination de la tubuline viennent seulement d'être découvertes (Aillaud et al., 2017; Nieuwenhuis et al., 2017). Les auteurs de ces deux études ont ainsi mit en évidence que les vasohibines, enzymes d'expression ubiquitaires particulièrement abondantes dans le cerveau, associées à la protéine SVBP (small vasohibin-binding protein) forment des complexes enzymatiques de détyrosination de la tubuline α, générant ainsi des formes détyrosinées de la tubuline. Aillaud et al., ont mis en évidence que la réduction de l'expression des vasohibines par EIU chez la souris conduit non seulement à des défauts de migration neuronale, mais altèrent également la morphologie des neurones (augmentation du nombre des neurites et des branchements neuritiques) et ralentit la différenciation axonale (Aillaud et al., 2017).

iv. Les protéines associées aux MTs (MAPs)

Lis1 (Lissencephaly-1) est une protéine connue pour être impliquée dans les malformations du développement cortical telles que les lissencéphalies, qui se caractérisent par des circonvolutions cérébrales simplifiées ou complètement absentes, associées à une organisation anormale des couches corticales, en raison d'un défaut spécifique de migration neuronale (Cardoso et al., 2000, 2002; Leventer et al., 2001). Plusieurs études menées chez la souris ont montré que la perte de

fonction de *Lis1*, ou bien la diminution de son expression par ARN interférence conduisait à des défauts de prolifération et de migration radiaire des neurones (Hirotsune et al., 1998; Tsai et al., 2005, 2007). De la même manière, l'inhibition de la fonction motrice de la dynéine conduit également à la perturbation de la migration des neurones (Tsai et al., 2007). Lis1 interagit avec la dynéine cytoplasmique qui est impliquée dans le transport intracellulaire et le mouvement cellulaire (Kardon and Vale, 2009). Lis1 interagit également avec Ndel1 (nuclear distribution gene E-like homolog 1) et forme un complexe avec la dynéine et la dynactine, afin de réguler l'activité de la dynéine (Sasaki et al., 2000). En utilisant la technique de l'ARN interférence, deux études ont mis en évidence que Ndel1 régule positivement l'activité de la dynéine en facilitant son interaction avec Lis1 (Shu et al., 2004) et que la perte de fonction de l'un ou l'autre des membres de ce complexe entraîne le désassemblage du complexe Lis1/Ndel1/dynéine (Shu et al., 2004; Tsai et al., 2007). Ce désassemblage perturbe la formation du réseau de MT lors du processus de nucléokinèse ce qui conduit *in fine* à un défaut de migration neuronale (Shu et al., 2004; Tsai et al., 2007). Le complexe Lis1/Ndel1/dynéine maintient donc l'intégrité du réseau de MT lors du couplage entre le noyau et le centrosome ce qui est nécessaire pour assurer la nucléokinèse lors de la migration neuronale. Les protéines nucléaires SUN1/2 et Syne-1/2 ont été montrées comme connectant le complexe Lis1/Ndel1/dynéine à l'enveloppe nucléaire durant la nucléokinèse. Elles permettent le pontage du noyau aux MTs via le complexe Lis1/Ndel1/dynéine, et la force motrice générée par la dynéine vers l'extrémité (-) des MTs promeut le mouvement du noyau vers le centrosome (Zhang et al., 2009) (**Figure 24**).

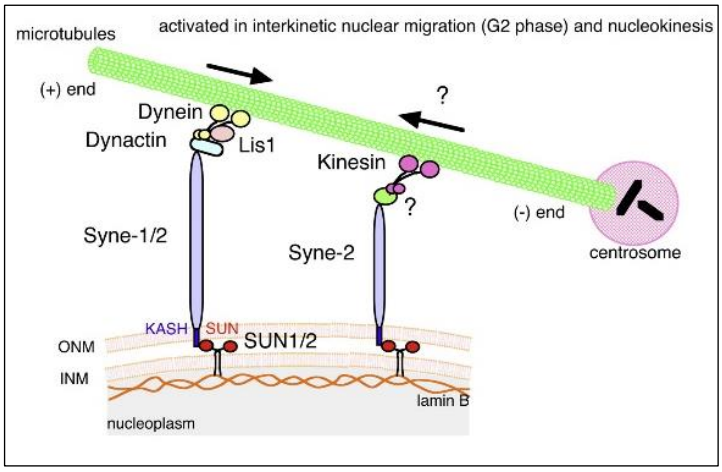


Figure 24 : Complexes protéiques impliqués au niveau de la membrane nucléaire et permettant le couplage entre le centrosome et le noyau lors de la migration.
Les protéines de la membrane nucléaire SUN1/2 et Syne-1/2 interagissent avec le complexe Lis1 / Dynéine / Dynactine pour former un pont entre le noyau et le réseau de MTs durant la nucléokinèse. ONM : outer nuclear membrane ; INM : inner nuclear membrane. (Modèle proposé par Zhang et al., 2009).

L'inhibition de la fonction de **Ndel1** par ARN interférence ou bien chez les souris déplétées pour Ndel1 montrent un défaut de migration radiaire avec une forte accumulation des neurones dans la ZI (Sasaki et al., 2005; Shu et al., 2004; Youn et al., 2009). De manière intéressante, les travaux d'Hippenmeyer et coll. ont mis en évidence une fonction cellule non-autonome de Ndel1 dans la migration radiaire au niveau de la ZI (Hippenmeyer et al., 2010). Les auteurs utilisent la stratégie MADM (mosaic analysis with double markers) chez la souris, qui permet de déplèter un gène donné dans des neurones isolés dans un environnement sauvage. Dans cette stratégie, les cellules homozygotes mutées expriment le marqueur GFP tandis que les cellules sauvages expriment le

marqueur RFP. Les cellules hétérozygotes, qui expriment les deux marqueurs sont donc visualisées en jaune. Dans le modèle MADM, les neurones déplétés pour *Ndel1* (dans lequel le fond génétique de la souris est hétérozygote pour *Ndel1*) sont capables de migrer normalement à travers la plaque corticale. En revanche les neurones sauvages dans ce même environnement s'accumulent dans la ZI, suggérant ainsi un effet non-autonome de Ndel1 sur ces neurones sauvages (Hippenmeyer et al., 2010).

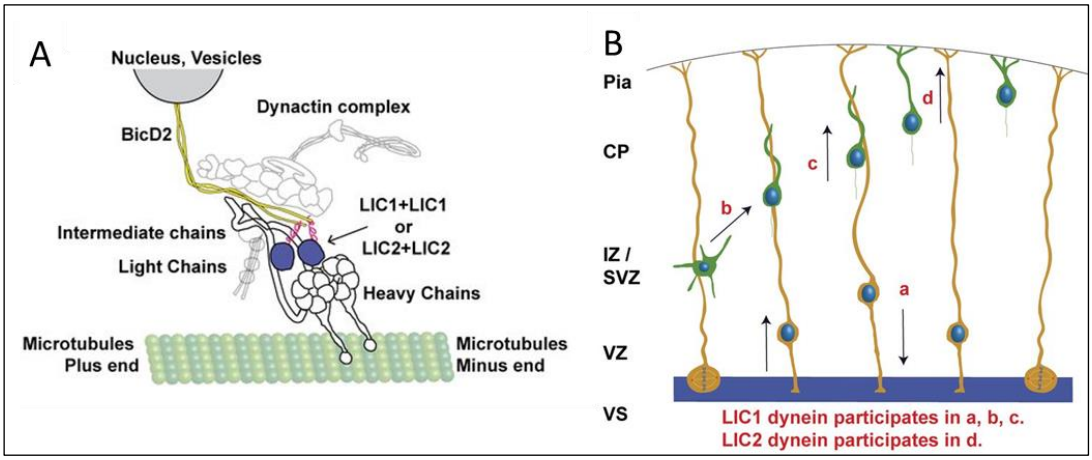


Figure 25 : Les chaines légères intermédiaires de la dynéine LIC1 et LIC2 jouent des rôles distincts au cours du développement cortical.
(A) Les dynéines cytoplasmiques forment de larges complexes moléculaires composées de deux chaines lourdes (dynein heavy chains, DHC) et de plusieurs chaines légères intermédiaires (LIC). De nombreuses protéines adaptatrices comme le complexe dynactine et BicD2 se lient à la dynéine et permettent le recrutement spécifique de cargos. (B) La sous-unité Lic1 de la dynéine est impliquée dans la locomotion apico-basale du noyau au cours de la migration nucléaire intercinétique (MNI) des cellules GRa, la transition multipolaire-bipolaire et la locomotion des neurones, tandis que Lic2 est requis pour la translocation somale terminale. Modèle proposé par (Gonçalves et al., 2019).

Les **dynéines** sont composées de plusieurs sous-unités qui permettent la liaison des cargos et leur transport le long des MTs (**Figure 25 A**). Une étude de Gonçalves et coll., a mis en évidence des rôles distincts des chaines légères intermédiaires de la dynéine (Lic1 et Lic2) au cours du développement neuronal (Gonçalves et al., 2019). Les auteurs ont montré que la diminution de l'expression de *Lic1* dans les cellules GR perturbe la MNI, tandis que *Lic2* n'a pas d'effet. Par ailleurs, l'inhibition de *Lic1* par EIU de shRNA perturbe également la migration neuronale, tandis que *Lic2* ne semble pas impliqué. En effet, la double inhibition de *Lic1* et *Lic2* n'augmente pas la sévérité du phénotype médié par Lic1, suggérant ainsi un rôle prédominant de Lic1 dans la migration radiaire (transition multipolaire-bipolaire et locomotion). Dans le but d'expliquer ces résultats, les auteurs ont observé des différences de liaison entre Lic1 et Lic2 pour l'adaptateur protéique BicD2 (sous unité du complexe dynéine/dynactine, connu pour être impliqué dans la MNI). Outre BicD2, il existe d'autres molécules qui interagissent différemment avec les deux sous unités Lic, comme par exemple la péricentrine et Par3 (Purohit et al., 1999; Tynan et al., 2000). Ainsi, ces interactions différentielles pourraient contribuer aux différences phénotypiques médiées par Lic1 et Lic2. De manière cohérente avec cette hypothèse, l'inhibition de *BicD2* (Hu et al., 2013a) ou de la chaine

lourde de la dynéine (Tsai et al., 2007) conduit à un phénotype d'altération de la migration radiaire similaire à celui observé pour Lic1. Dans leur étude, Gonçalves et coll., ont également observé que la diminution de l'expression de *Lic2* conduisait à une diminution du nombre de neurone dans les couches corticales les plus superficielles. Bien que les neurones arrêtés émettent un prolongement vers la ZM, leurs corps cellulaires restent localisés dans les couches plus profondes, suggérant une altération de la translocation somale terminale. Par des expériences de vidéo-microscopie, les auteurs ont confirmé l'implication de Lic2 dans la dernière étape de la migration radiaire. Cette étude est la première à montrer le rôle d'un moteur moléculaire dans la translocation somale terminale et identifie ainsi une nouvelle fonction de la dynéine dans le développement cortical (Gonçalves et al., 2019) (**Figure 25 B**). Par ailleurs, plusieurs mutations dans le gène *DYNC1H1* (cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1) codant pour la dynéine cytosplasmique ont été identifiées chez des patients présentant un large spectre de malformations du développement cortical dont des défauts de migration neuronale (Poirier et al., 2013b; Willemsen et al., 2012).

La **Doublecortine** (Dcx) est une protéine associée aux MTs qui permet leur stabilisation en empêchant leur dépolymérisation (Moores et al., 2004). DCX est connue pour être responsable de lissencéphalies liées à l'X et d'hétérotopies sous-corticales (Gleeson et al., 1998; des Portes et al., 1998). Les mutations sont principalement des mutations faux-sens et non-sens situées pour la majorité dans les deux domaines fonctionnels de liaison aux MTs de la doublecortine (Bahi-Buisson and Guerrini, 2013). Dcx est fortement exprimée au cours du développement embryonnaire et est enrichie à l'extrémité des neurites et dans le cône de croissance des neurones en migration où elle stimule la formation des faisceaux de MTs (Francis et al., 1999; Gleeson et al., 1999). Dcx s'associe avec la protéine Lis1 dans le complexe Lis1/Ndel1/dynéine et régule le couplage entre le noyau et le centrosome durant la migration neuronale (Tanaka et al., 2004a). Par ailleurs, Dcx est également étroitement liée au réseau d'actine. En effet, Dcx peut se fixer aux cytosquelettes d'actine et de MTs permettant l'association des deux éléments *in vitro* (Tsukada et al., 2005), ce qui suggère que Dcx puisse jouer un rôle important dans la régulation de la dynamique de ces deux réseaux.

Il a été montré que la diminution de l'expression de *Dcx* durant le développement cortical par EIU d'ARN interférant entraîne un défaut de la migration neuronale créant une hétérotopie neuronale proche de la malformation observée chez l'humain, qui est associée à des défauts de mouvement du noyau durant la nucléokinèse (Bai et al., 2003; Ramos et al., 2006). En revanche, l'inactivation du gène *Dcx* chez la souris n'entraîne pas de trouble de migration des neurones pyramidaux (Corbo et al., 2002). Cette différence de phénotype peut être expliquée par la compensation de *Dcx* chez la souris inactivée, par Dclk (doublecortin-like kinase). En effet, la double invalidation constitutive des deux gènes entraîne un défaut de migration neuronal (Koizumi et al., 2006).

L'activité des MAPs est contrôlée par différentes modifications post-traductionnelles mettant en jeu diverses protéines kinases et des protéines de la famille des Rho GTPases, qui répondent à

des stimuli extracellulaires. Parmi les kinases régulant l'activité des MAPs, on peut par exemple citer la sérine/thréonine kinase **Cdk5** (Cyclin dependant kinase 5). Cdk5 est principalement exprimée dans les neurones post mitotiques et connue pour réguler diverses étapes la migration radiaire comme la transition multipolaire-bipolaire dans la ZI, la formation du processus antérieur et la nucléokinèse. Les souris mutantes constitutives pour *Cdk5* présentent en effet une altération sévère de la structure corticale avec un inversement des couches II-VI, ce qui suggère un rôle crucial de Cdk5 dans la mise en place de l'organisation « inside-out » du cortex (Ohshima et al., 1996, 2007). Cdk5 permet la phosphorylation de nombreuses protéines comme par exemple Dcx, Ndel1 et p27Kip1. La phosphorylation de Dcx par Cdk5 entraîne une diminution de son affinité de liaison avec les MTs et l'en détache dans les neurones en culture (Tanaka et al., 2004b). La phosphorylation de Ndel1 par Cdk5 permet la liaison de Ndel1 à la dynéine et régule ainsi la nucléokinèse (Toyo-Oka et al., 2005). Nishimura et coll., ont montré que la phosphorylation de p27Kip1 (protéine régulatrice des cytosquelettes d'actine et de MTs) par Cdk5 la protège de la dégradation et la stabilise, permettant ainsi la formation de la dilatation et l'élongation du noyau. En effet, la diminution de l'expression de p27Kip1 empêche la formation de la dilatation et altère la migration des neurones de projection (Nishimura et al., 2014).

b. Le cytosquelette d'actine et ses protéines associées

i. Généralités sur le cytosquelette d'actine

Le filament d'actine (actine-F) est une structure polarisée et dynamique issue de la polymérisation de plusieurs unités d'actine globulaire (actine-G). L'actine globulaire est codée par au moins 6 gènes différents dont on distingue plusieurs isoformes : l'actine-α, -β et -λ. L'actine-α est principalement retrouvée dans les cellules musculaires tandis que l'actine-β et -λ se retrouvent dans les cellules non musculaires. Tout comme les tubulines, l'actine subit de nombreuses modifications post-traductionnelles comme la méthylation ou l'acétylation.

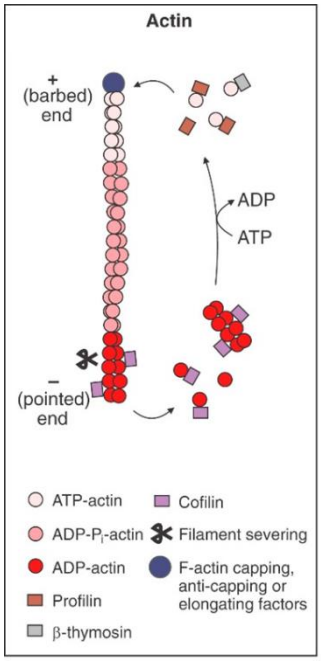


Figure 26 : Structure et assemblage du filament d'actine.
L'addition des monomères d'actine-G lié à l'ATP à l'extrémité (+) du filament d'actine est permise par la protéine profiline qui favorise l'échange de l'ADP par de l'ATP. En revanche, la séquestration de l'actine-G par la β-thymosine empêche son incorporation au filament et donc limite la polymérisation. Après incorporation de l'actine-G au filament d'actine, l'hydrolyse de l'ATP a lieu et l'actine est alors liée à l'ADP. Au niveau de l'extrémité (-), des monomères d'actine-G liés à l'ADP ou bien des fragments de filaments d'actine sont enlevés par l'action de protéines dépolymérases telles que la cofiline. L'actine-G libre liée à l'ADP peut alors échanger son ADP pour de l'ATP et être de nouveau incorporée au filament à l'extrémité (+). (Coles and Bradke, 2015)

L'actine globulaire est polarisée, avec un pôle (+) et un pôle (-), et est capable de lier l'ATP. *In vitro*, les monomères d'actine liés à l'ATP s'assemblent rapidement à l'extrémité (+) du filament favorisant ainsi la polymérisation du filament d'actine à cette extrémité. L'extrémité (-) du filament étant majoritairement sous forme liée à l'ADP, cette extrémité à tendance à dépolymériser (**Figure 26**). Ce phénomène au cours duquel l'extrémité (+) polymérise tandis que l'extrémité (-) dépolymérise est appelé le « treadmilling ». *In vivo,* la polymérisation de l'actine est initiée par des complexes de nucléation tels que le complexe Arp2/3 et les formines et les protéines de liaison à l'actine (Actin Binding Proteins, ABP) telles que la profiline ou la cofiline jouent un rôle important dans la polymérisation et la stabilisation des filaments d'actine, et peuvent aussi permettre de coupler les filaments entre eux et d'engendrer le mouvement (Dominguez and Holmes, 2011).

Au cours du développement neuronal *in vitro*, les filaments d'actine sont hautement dynamiques et enrichis dans certains compartiments tels que le cône de croissance ou les branchements collatéraux. L'utilisation de la super-résolution combinée à de l'imagerie en temps réel a mis en évidence qu'au sein des axones dans le neurone mature, le cytosquelette d'actine se réorganise en structures particulières comme par exemple en « anneaux d'actine » dans la partie la plus proximale de l'axone ou en clusters appelés « points-chauds d'actine » à la surface desquels la des nouveaux filaments d'actine polymérisent (**Figure 27**) (Leterrier et al., 2017).

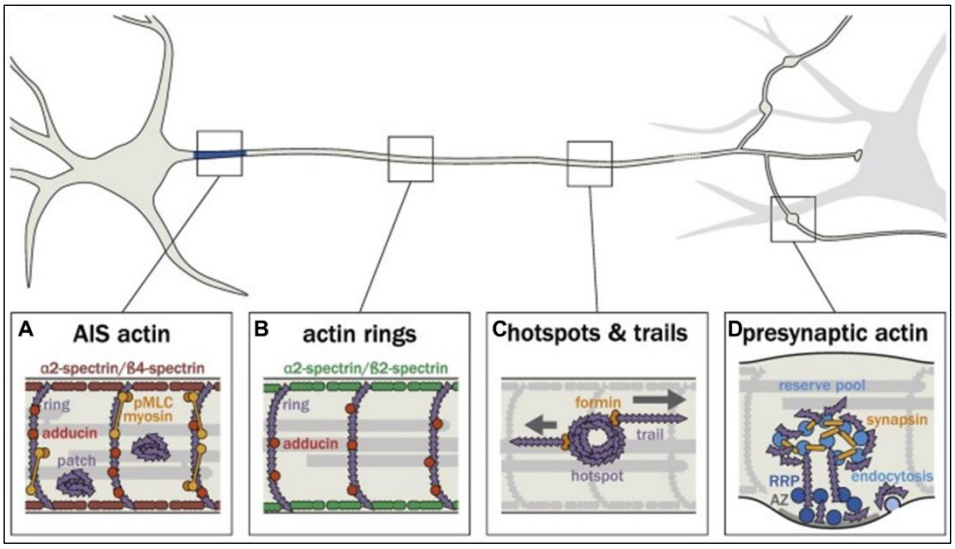


Figure 27 : Organisation de l'actine dans l'axone de neurones issus de cultures primaires.
(A-B) Dans le segment initial (AIS, Axonal initial segment) et dans la partie proximale de l'axone, l'actine forme des anneaux (actin rings) espacées par des tétramères de spectrines (en rouge et en vert) et entourées par des molécules d'adducine (en rouge). Spécifiquement au niveau de l'AIS, la protéine MLC phosphorylé (jaune) est attachée à l'actine et des agrégats d'actine (patch, en violet) sont également retrouvés. (C) L'actine peut également se réorganiser en clusters appelés « points-chauds d'actine » (hot spot) à la surface desquels la polymérisation de nouveaux filaments est médiée par les formines (en jaune). Au niveau des compartiments présynaptiques, l'actine entoure les vésicules synaptiques qui sont reliées entre elles par la spacine. (Papandréou and Leterrier, 2018).

ii. Dynamique de l'actine au cours de la migration radiaire

L'un des meilleurs exemples démontrant que la régulation de la dynamique de l'actine est essentielle à la migration neuronale provient du fait que des mutations dans le gène **filamine-A** (*FLNA*) sont la cause majeure des hétérotopies nodulaires périventriculaires (HNP), pathologies caractérisées par la présence de nodules ectopiques de neurones le long des ventricules latéraux (Fox et al., 1998; Parrini et al., 2006). La filamine-A est une phosphoprotéine fortement exprimée dans toutes les couches corticales et qui se lie à l'actine et participe à la formation des réseaux d'actine orthogonaux via l'interconnexion entre les filaments d'actine (Sheen et al., 2002). La filamine-A est également une protéine adaptatrice qui est capable d'interagir avec de nombreuses protéines différentes comme des protéines de la famille Rho GTPase qui sont également impliquées dans la migration neuronale. Il a été montré que la filamine-A est requise pour la migration neuronale au stade multipolaire et permet la transition des cellules vers une morphologie bipolaire. En effet, un excès de filamine-A réduit le nombre de neurones multipolaires présents dans la ZSV et la ZI. A l'inverse, la diminution de l'expression de filamine-A conduit à une accumulation des neurones multipolaires dans la ZI (Nagano et al., 2004). Une autre étude montre que la déplétion du gène *Flna* par électroporation *in utero* (EIU) d'ARN interférent chez le rat, conduit à l'altération de la glie radiaire dans la ZV, altérant ainsi la progression du cycle cellulaire des cellules GRa et également la migration neuronale dans la PC (Carabalona et al., 2012). Les auteurs suggèrent un rôle de Flna dans le maintien de l'intégrité de la glie radiaire et l'adhésion cellulaire via la protéine d'adhésion intégrine-β1. Ainsi, l'inhibition de Flna dans le cortex conduirait à la perte des jonctions adhérentes et au détachement des progéniteurs neuraux du ventricule. Les auteurs montrent par ailleurs que la déplétion de *Flna* chez le rat reproduit le phénotype HNP humain par des effets cellulaire autonomes et non autonomes. Ils notent en effet la présence de neurones et de cellules GRa non électroporés dans les nodules ectopiques (Carabalona et al., 2012). Une étude récente a mis en évidence une mutation perte de fonction dans le gène *Mob2* chez un individu présentant une HNP (O'Neill et al., 2018). Les auteurs montrent que l'inhibition de *Mob2* par EIU chez la souris affecte la migration radiaire et ils remarquent que ces défauts de migration sont dus à une altération du nombre et de la position du cil dans les neurones bipolaires en migration. De façon intéressante, les auteurs observent que Mob2 régule l'activité de Flna par phosphorylation. En effet, l'inhibition de Mob2 augmente la phosphorylation de Flna *in vitro* (O'Neill et al., 2018). Ces résultats mettent ainsi en évidence l'implication de Mob2 dans la pathologie des HNP via la régulation de *Flna*.

Le complexe **Arp2/3** (qui permet la nucléation de l'actine et la formation des filaments d'actine) joue également un rôle essentiel dans la polarité des cellules GRa et donc dans la migration neuronale. Wang et coll., ont montré que les souris inactivées pour *Aprc2* présentent des défauts de corticogenèse : altérations de la formation du prolongement basal, défauts d'adhésion des cellules GRa à la surface apicale et anomalies de la migration radiaire des neurones de projection

(Wang et al., 2016b). De manière intéressante, des mutations perte de fonction ont récemment été mises en évidence dans le gène *CTNNA2* (codant pour la protéine caténine-Nα) chez des individus présentant divers défauts neuro-développementaux (microcéphalies, pachygyrie, épilepsies, dysgénésie du corps calleux) (Schaffer et al., 2018). Les auteurs montrent que la caténine-Nα interagit avec l'actine *in vitro* et réprime l'activité du complexe Arp2/3. Les auteurs mettent ainsi en évidence que la perte de fonction de *CTNNA2* dans des neurones dérivés des cellules IPS conduit à l'augmentation de l'activité de Arp2/3 et affecte la migration cellulaire *in vitro*. Ces études confirment donc le rôle essentiel joué par le complexe Arp2/3 dans la migration neuronale via la régulation de la polymérisation des filaments d'actine dans ces cellules.

Bien que les mécanismes et les fonctions des contractions de l'acto-myosine d'actine durant la migration tangentielle aient été largement étudiés, l'implication de l'actine et les mécanismes moléculaires associés dans la migration radiaire restent peu connus. Différents marquages immunofluorescents de coupes corticales d'embryon de souris montrent un enrichissement de l'actine filamenteuse dans la partie proximale du prolongement guide des neurones bipolaire en migration (Nishimura et al., 2014; Pinheiro et al., 2011; Yang et al., 2012a). Dans l'étude menée par Yang et coll., les auteurs identifient la protéine POSH (plenty of SH3s) comme étant essentielle au remodelage des filaments d'actine lors de la nucléokinèse. Les auteurs montrent en effet que la perte de fonction de POSH conduit à la désorganisation des filaments d'actine dans la dilatation du prolongement guide des neurones corticaux en migration et altère la formation du prolongement guide empêchant ainsi la nucléokinèse (Yang et al., 2012a) (**Figure 28**). En accord avec le rôle potentiel de l'actine au cours de la nucléokinèse, des expériences de vidéo-microscopie sur coupes corticales de souris électroporées ont montré un enrichissement des filaments d'actine à l'avant du noyau et dans la région proximale du prolongement guide, juste avant la nucléokinèse (Nishimura et al., 2014). POSH régule la localisation et l'activité de la protéine GTPase **Rac1**, connue pour participer à la migration des interneurones corticaux en favorisant la contraction de l'acto-myosine (Yang et al., 2012a). Rac1 participe également à la migration radiaire des neurones corticaux. En effet, l'EIU du dominant négatif Rac1 (qui bloque l'activation de Rac1 endogène) conduit à une altération de la migration neuronale associée à des défauts morphologiques des neurones (raccourcissement des neurites) dans la zone intermédiaire (Kawauchi et al., 2003). De la même manière, l'EIU du dominant négatif JNK (effecteur de Rac1) altère également la migration neuronale (Kawauchi et al., 2003). Pinheiro et coll., montrent également que les niveaux d'actine filamenteuse dans le neurone bipolaire sont cruciaux pour sa migration. Les auteurs montrent en effet que l'altération du cytosquelette d'actine dans les neurones en migration conduit les neurones à migrer tangentiellement dans la plaque corticale (Pinheiro et al., 2011). Ainsi, bien que l'actine semble impliquée dans la migration radiaire (probablement au cours de la nucléokinèse), on ne sait pas précisément à quelle(s) étape(s), ni par quels mécanismes le remodelage du cytosquelette d'actine intervient.

iii. Les myosines

Les **myosines** sont des protéines motrices du cytosquelette d'actine impliquées dans de nombreux processus neuro-développementaux dont la migration radiaire (Brown and Bridgman, 2004). Il a été montré que la délétion de la myosine-II chez la souris conduit à de sévères malformations incluant des défauts de migration (Tullio et al., 2001). Dans les neurones en migration, la myosine II est localisée à l'arrière du noyau, au niveau des filaments d'actine et permet de générer des forces de contraction vers les extrémités (+) du cytosquelette d'actine ce qui est nécessaire à la nucléokinèse (Bellion et al., 2005; Schaar and McConnell, 2005) (**Figure 28**). Plus récemment, deux études ont montré que la myosine-X (Myo10), exprimée au cours du développement cortical était également requise pour l'attachement des neurones à la glie radiaire lors de la phase de locomotion (Ju et al., 2014; Lai et al., 2015). La perte d'expression de *Myo10* induite par électroporation *in utero,* conduit au détachement des neurones en migration du prolongement glial et donc à un défaut de migration radiaire chez l'embryon. Ce phénotype migratoire causé par la perte de fonction de Myo10 est sauvé par l'expression de la protéine d'adhésion cellulaire N-cadhérine (Lai et al., 2015) (**Figure 28**).

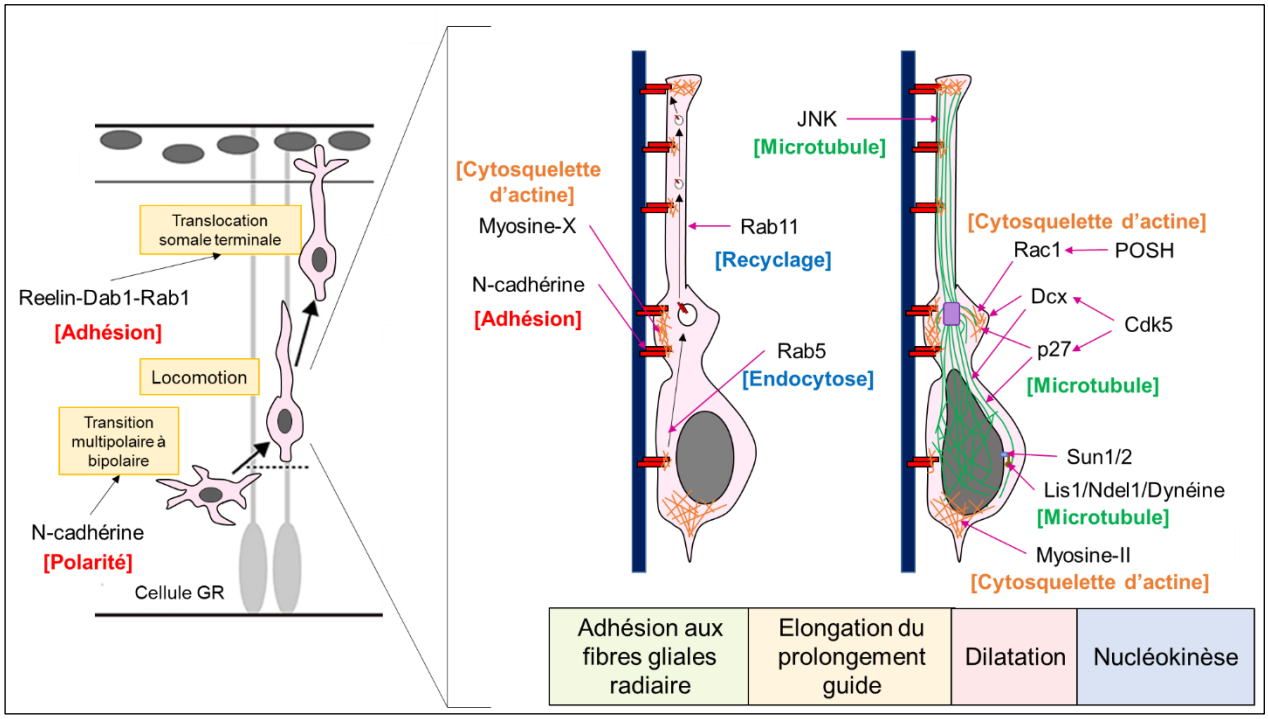


Figure 28 : Principales molécules et voies de signalisation impliquées dans la régulation de la migration radiaire.
Adapté de (Kawauchi, 2015).

c. Rôles de la voie de signalisation Reelin dans le remodelage des cytosquelettes d'actine et de microtubules

La Reelin est une glycoprotéine de haut poids moléculaire codée par le gène *RELN* et sécrété par les cellules de Cajal-Retzius présentes dans la zone marginale du cortex cérébral (future couche I). La Reelin diffuse dans la plaque corticale en formation et se lie au récepteur ApoER2 (apolipoprotein E receptor 2) et au récepteur VLDLR (very-low-density lipoprotein receptor) exprimés par les neurones en migration présents dans la ZI. La fixation de la Reelin sur ses récépteurs conduit à la phosphorylation de la protéine intracellulaire Dab1 par les tyrosines kinases cytoplasmiques Src/Fyn. L'activation de Dab1 recrute de nombreuses protéines et déclenche alors une cascade de voies de signalisation permettant de réguler la migration radiaire (**Figure 29**) (Bock and May, 2016).

La voie de signalisation Reelin joue un rôle fondamental dans la migration neuronale et la lamination corticale. En effet, des souris mutantes pour le gène *Reln* (appelées souris Reeler) présentent une désorganisation de l'organisation des couches corticales 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). Par ailleurs, les souris double mutantes pour les gènes *Apoer2* et *Vldlr* ou bien simple mutante pour le gène *Dab1* présentent le même phénotype que les souris Reeler avec une inversion des couches corticales (Tissir and Goffinet, 2003). Des mutations dans le gène *Reln* et le gène *Vldlr* ont été retrouvées chez des individus présentant des lissencéphalies et des hypoplasies cérébelleuses (Hong et al., 2000) et des maladies neuropsychiatriques telle que la schizophrénie, les troubles bipolaires et l'autisme (Chen et al., 2017).

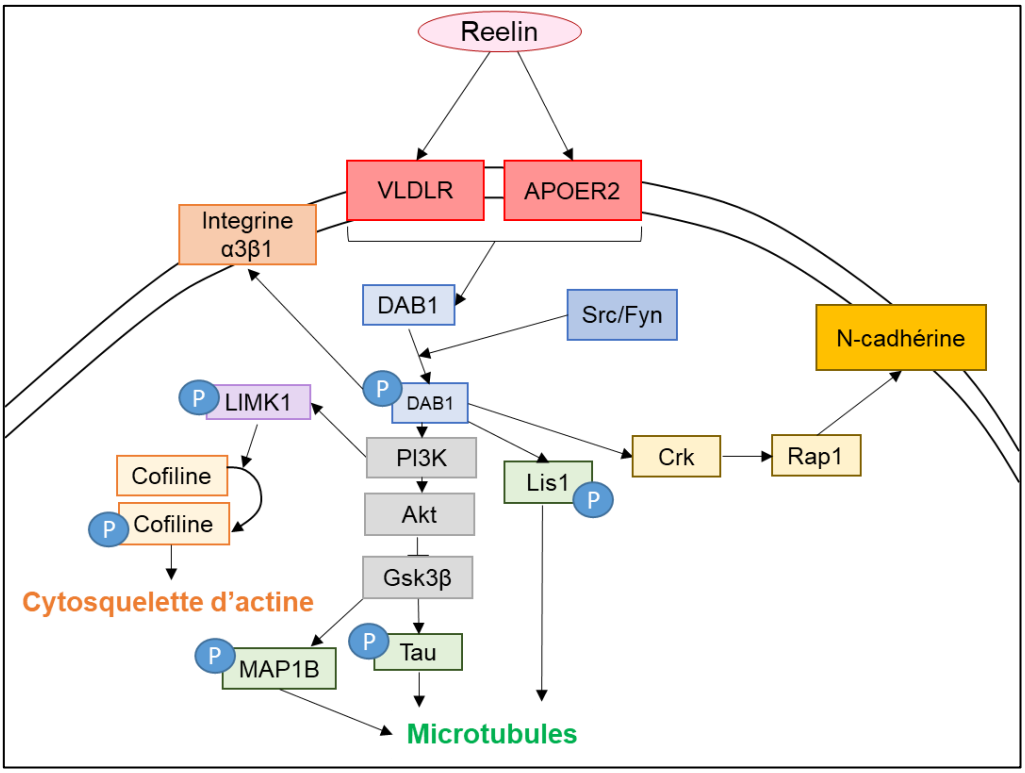


Figure 29 : La voie de signalisation Reelin-Dab1 et les acteurs moléculaires impliqués dans la migration radiaire.

Après fixation sur ces récepteurs ApoER2, le signal Reelin conduit à l'activation de Dab1 et le recrutement de la PI3K. Dab1 phosphorylé est capable de recruter PI3K pour ensuite activer la voie PI3K-Akt (Bock and May, 2016) qui semble nécessaire à la formation correcte de la plaque corticale (Bock et al., 2003; Jossin and Goffinet, 2007). L'activation de la voie PI3K-Akt inhibe l'activité de la kinase GSK-3β (glycogen synthase kinase-3 β). GSK-3β est connue pour phosphoryler différentes protéines associées aux MTs, telles que MAP1B ou tau (Hiesberger et al., 1999; Trivedi et al., 2005) (**Figure 29**). Chez les souris *Reeler*, la perte de la signalisation Reelin conduit à une augmentation de l'activité de la kinase GSK-3β et à l'hyperphosphorylation de tau, ce qui induit une déstabilisation du cytosquelette de MTs (Hiesberger et al., 1999). La kinase GSK3β serait également impliquée dans la régulation de la dynamique des MTs dans les neurones en migration en phosphorylant MAP1B (González-Billault et al., 2005). Ces résultats ont cependant été contredits par une autre étude dans laquelle les auteurs ont utilisé des inhibiteurs chimiques des différents membres de la voie de signalisation sur des coupes corticales embryonnaires et dans des cultures de neurones. Les auteurs ont observé que la position des neurones dans la plaque corticale requiert les protéines PI3K et Akt mais pas GSK-3β (Jossin and Goffinet, 2007). La protéine associée aux MTs Lis1 a également été montrée comme impliquée dans la voie de signalisation Reelin. Lis1 et Dab1 sont phosphorylées suite à l'activation de la voie Reelin et peuvent ainsi interagir ensemble pour contrôler la stabilité des MTs (Assadi et al., 2003) (**Figure 29**).

La régulation du cytosquelette d'actine par la Reelin est également importante dans le contrôle de la migration des neurones. La voie de signalisation Reelin induit la stabilisation du cytosquelette d'actine par inactivation de la protéine cofiline-N (**Figure 29**). La cofiline est une protéine de liaison à l'actine qui contrôle la dynamique du cytosquelette d'actine par son activité de coupure et de dépolymérisation des filaments d'actine. La phosphorylation de la cofiline-N, médiée par l'activation de la voie de signalisation Reelin et la kinase LIMK1, inactive la cofiline-N et stabilise ainsi les filaments d'actine dans le prolongement guide (Chai et al., 2009, 2016). Les auteurs montrent par ailleurs que l'expression de la kinase Limk1 permet de sauver le phénotype de migration des neurones provenant d'embryons *Reeler*. En régulant la dynamique du prolongement guide via la modulation du cytosquelette d'actine, la Reelin par l'intermédiaire de la cofiline-N sont indispensables pour le processus de migration radiaire (Chai et al., 2016). Une étude récente a montré que CaMKIIβ (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II) était essentielle à la transition multipolaire-bipolaire en agissant sur le remodelage du cytosquelette d'actine via la cofiline (Nicole et al., 2018). Dans leur étude, les auteurs observent que la surexpression de *CaMKIIβ* par EIU chez la souris conduit à une altération de la migration radiaire, et que ce phénotype est sauvée par l'expression de cofiline. CaMKIIβ empêche l'interaction entre la cofiline et les filaments d'actine, limitant ainsi l'activité de la cofiline sur le remodelage du cytosquelette d'actine au cours de la migration radiaire (Nicole et al., 2018).

La protéine Dab1 est également importante pour la relocalisation des protéines d'adhésion cellulaire à la surface des neurones. Dans les neurones multipolaires, Dab1 phosphorylé se lie à la

protéine adaptatrice Crk ce qui entraîne l'activation de la protéine GTPase Rap1 (**Figure 29**). L'activation de Rap1 entraîne alors une augmentation de la protéine d'adhésion cellulaire N-cadhérine présente niveau de la membrane des neurones multipolaires et permet l'établissement de la polarité du neurone et la transition vers une forme bipolaire (Jossin and Cooper, 2011).

Une étude a montré que la liaison de la Reelin à l'intégrine α3β1 (récepteur membranaire présent à la surface des neurones bipolaire en migration) régule les interactions neurone-glie radiaire et est requise pour la migration radiaire et pour une organisation laminaire correcte (Dulabon et al., 2000). Les auteurs montrent en effet que les effets de la Reelin *in vitro* et *in vivo* dépends de son interaction avec l'intégrine α3β1, et que l'absence de α3β1 conduit à une réduction de Dab1 (Dulabon et al., 2000). La voie de signalisation Reelin-Dab1-Rab1 est également impliquée dans la translocation somale terminale. L'activation de cette voie de signalisation permet l'adhésion des neurones à la fibronectine extracellulaire localisée dans la zone marginale, par l'intermédiaire de l'intégrine α5β1(Sekine et al., 2012) (**Figures 28 et 29**).

V. Mise en place des connectivités par croissance et guidage axonale

A. Les principaux types de neurones de projection

Les neurones de projection du cortex cérébral peuvent être divisés en 3 classes selon leur position au sein des différentes couches corticales et les structures vers lesquelles ils projettent. Cette classification permet de distinguer 1) les neurones de projection callosal, 2) les neurones cortico-thalamiques et 3) les neurones à projections sous-corticale (**Figure 30**).

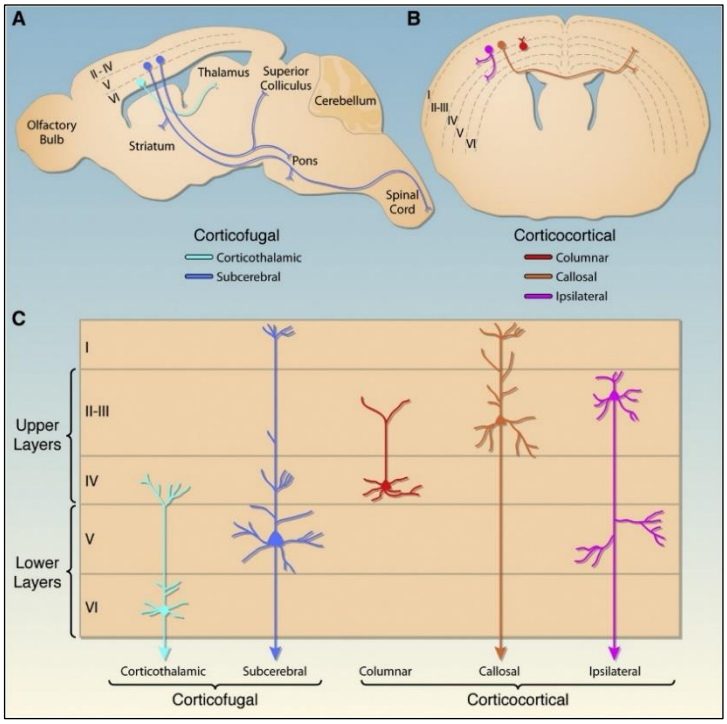


Figure 30 : Les différents types de neurones de projection du cortex cérébral. (A) Vue sagittale de la localisation des neurones de projection cortico-thalamiques (bleu clair) et à projection sous-corticale (bleu foncé) dans leurs différentes couches. (B) vue coronale des neurones de projection callosal des couches corticales supérieures (II-III). Ces neurones projettent leur axone vers l'hémisphère opposé formant ainsi le corps calleux, mais peuvent également brancher dans la couche V au sein du même hémisphère (ipsilatéral). (C) Les différents types de neurones de projection représentés en (A) et (B) (Franco and Müller, 2013).

Les **neurones de projection callosal** projettent leur axone au sein du cortex cérébral, soit dans le même hémisphère (connections intracorticales ipsilatérales) soit vers l'autre hémisphère

(connections inter-corticales callosales) formant ainsi une structure appelée le corps calleux. Chez la souris, ces neurones occupent généralement les couches II/III du cortex cérébral (environ 80% des neurones callosaux) et la couche V (environ 20% des neurones callosaux). Ils naissent aux alentours de E15,5 et E13,5 respectivement. Les **neurones corticaux-thalamiques** projettent leur axone vers les différents aires corticales et vers le thalamus. Ils occupent principalement les couches corticales profondes IV. Les projections axonales de ces neurones forment la capsule interne. Les **neurones à projection sous-corticale** sont situés dans la couche V et projettent leur axone vers le tronc cérébral et la moelle épinière (Franco and Müller, 2013; Molyneaux et al., 2007b).

Ces différents types de neurones de projection possèdent leur propre profil d'expression de facteur de transcription qui est nécessaire à leur spécification. L'interaction entre ces différents facteurs de transcription permet l'établissement de l'identité des neurones de projection (Leyva-Díaz and López-Bendito, 2013) (**Figure 31**).

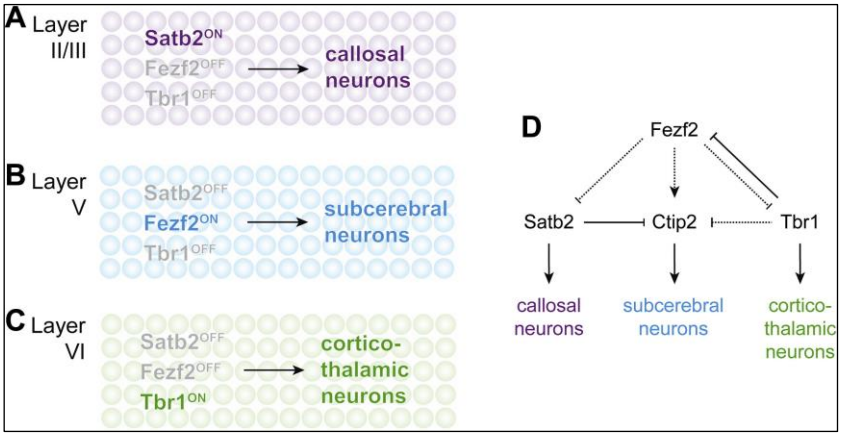


Figure 31 : L'interaction entre les différents facteurs de transcription régule la spécification neuronale. Les facteurs de transcription clés impliqués dans la spécification des neurones de projection sont représentés sur ce schéma. (A) *Satb2* est exprimé dans les couches corticales II/III et spécifie les neurones de projection callosal. (B) *Fezf2* est exprimé dans la couche V et est essentielle pour la spécification des neurones à projection sous-corticales. (C) *Tbr1* est exprimé dans la couche IV et spécifie le devenir des neurones cortico-thalamiques. (D) Interactions entre les différents facteurs de transcription impliqués dans la spécification neuronale (Leyva-Díaz and López-Bendito, 2013).

Les **neurones de projection callosal** sont définis par l'expression des facteurs de transcription Cux1 (Cut-like homeobox 1) et Satb2 (Special AT-rich sequence-binding protein 2) (Britanova et al., 2008) et il a été montré que Satb2 est requis pour la spécification de ces neurones. En effet, la perte de fonction de *Satb2* dans ces neurones conduit à un défaut de migration de ces neurones (normalement destinés aux couches supérieures) et à l'expression anormale de Ctip2 (Alcamo et al., 2008). Par ailleurs, les neurones déplétés pour *Satb2* présentent des altérations de projection corticale : au lieu de projeter vers la ligne médiane et former le corps calleux, les axones sont redirigés vers des cibles sous-corticales comme la capsule interne (Alcamo et al., 2008; Britanova et al., 2008). Une étude récente a montré que Cux1 était requis pour la formation des connections inter-hémisphériques par les neurones de projection callosal (Rodríguez-Tornos et al., 2016). Dans leur étude, les auteurs ont montré que Cux1 contrôle la formation des neurones de

projection callosal et leurs projections via la régulation transcriptionnelle du canal potassium Kv1, qui régule l'activité neuronale (Rodríguez-Tornos et al., 2016). Il a également été récemment montré que le co-régulateur transcriptionnel Cbp/P300 intéragissant avec Cited2, est résponsable de la spécification des cellules callosales progénitrices des couches corticales II/III. La perturbation du signal médié par Cited2 se traduit par un corps calleux plus petit et des modifications de la répartition des projections contralatérales du cortex somatosensoriel (Fame et al., 2016).

Les facteurs de transcription Fezf2, Ctip2 et Tbr1 sont retrouvés dans les neurones à projection sous-corticale et les neurones cortico-thalamiques respectivement. Chez les mutants *Fezf2*, les neurones des couches corticales profondes sont générés et migrent correctement mais n'expriment pas le facteur *Ctip2* (Chen et al., 2005a). La délétion de *Fezf2* ou de *Ctip2* inhibe la formation des faisceaux cortico-spinaux alors que leur surexpression dans les couches corticales II/III, qui normalement forment des connections cortico-corticales suffit à diriger les axones vers des régions sous-corticales (Chen et al., 2005b; Molyneaux et al., 2005).

B. Axogenèse et branchements collatéral

1. Etablissement de la polarité neuronale

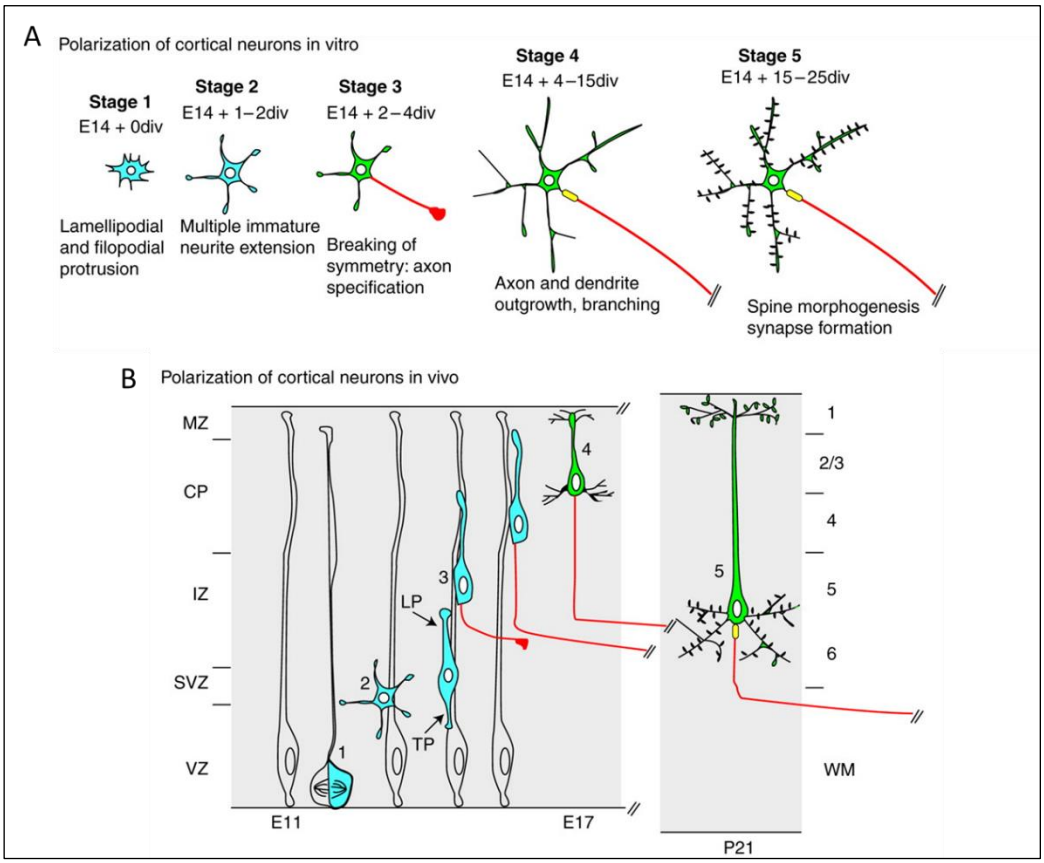


Figure 32 : Mise en place de la polarité neuronale in vitro et au cours du développement cortical. LP, leading process ou prolongement guide ; TP, trailing process ou processus postérieur, div, day *in vitro* (Polleux and Snider, 2010).

Dans des cultures de neurones primaires, la majorité des neurones possède un axone et plusieurs dendrites. Ces deux composants neuronaux se différencient à partir de neurites mineurs. La formation des neurites mineurs est permise par l'extension des filaments d'actine dans les filopodes et les lamellipodes du corps cellulaire. Le cytosquelette de MTs colonise ensuite les filopodes et permettent aux filopodes de former les neurites mineurs. A ce stade, le neurone n'est pas encore polarisé (**Figure 32 A**, Stade 2). La polarisation du neurone commence lorsque l'un des neurites mineurs commence à s'allonger rapidement pour se différencier en axone, tandis que les autres neurites mineurs restent courts et se développent en dendrites (**Figure 32 A**, Stade 3 et plus) (Neukirchen and Bradke, 2011a).

La mise en place de la polarité *in vivo* débute lorsque le neurone nouvellement généré change sa morphologie multipolaire pour une morphologie bipolaire qui lui permet de s'engager dans le processus de migration radiaire. Lors de cette transition, le neurone émet un neurite de manière radiaire qui devient le prolongement guide (également appelé processus antérieur). A l'opposé de ce processus le neurone émet un prolongement horizontal ou dirigé vers la surface ventriculaire avant de commencer la migration. Ce prolongement est appelé le processus postérieur (trealing process) qui s'allonge de manière tangentielle dans la zone intermédiaire et formera par la suite l'axone (**Figure 32 B**) (Polleux and Snider, 2010). La formation de l'axone est influencée par des signaux extracellulaires et des effecteurs intracellulaires qui régulent la dynamique des cytosquelettes d'actine et de MTs et le transport de différentes vésicules durant l'initiation, la stabilisation et l'élongation de l'axone.

La position du **centrosome** a initialement été proposée comme initiant la formation de l'axone. Une étude a montré que le centrosome se repositionne au niveau du futur axone au cours de la phase multipolaire (Anda et al., 2010). Dans cette étude, les auteurs montrent que l'inhibition de la protéine centrosomale Cep120, qui est essentielle à la stabilité du centrosome, empêche la formation de l'axone *in vivo* (Anda et al., 2010), suggérant que la stabilité du centrosome est essentielle à l'induction de l'axone. Consistant avec ces résultats, les auteurs observent que les neurones déplétés pour *Cep120* présentent une diminution des niveaux de tubuline acétylée dans le soma. Ces résultats suggèrent que la position du centrosome participerait à la stabilisation du cytosquelette de MTs au niveau du neurite et son élongation en axone. Une autre étude en revanche montre que le centrosome n'est pas nécessaire à l'élongation de l'axone. Dans cette étude, les auteurs montrent que l'ablation du centrosome dans des cultures de neurones primaires n'empêche pas l'élongation de l'axone une fois que celui-ci est formé (Stiess et al., 2010), suggérant que l'élongation et la maturation de l'axone serait indépendante du centrosome et pourrait impliquer d'autres facteurs intracellulaires. Pour mieux comprendre l'implication du centrosome dans la formation de l'axone, Sakakibara et coll. ont étudié la dynamique du mouvement du centrosome dans les neurones multipolaires et dans les neurones bipolaires en migration sur des coupes corticales embryonnaires de souris (Sakakibara et al., 2014). Ils ont montré que dans les neurones

multipolaires, le centrosome se déplace à la base du prolongement dominant en croissance. Cependant, la formation du prolongement dominant ne requiert pas la présence du centrosome, et est indépendante de la position du centrosome. Les auteurs suggèrent que le centrosome se localise préférentiellement à la base du prolongement dominant parce que les extrémités (+) des MTs y sont enrichies. Ainsi, le centrosome est situé à la base de l'axone en formation lorsque celui-ci est le prolongement dominant. Cependant, lorsque le prolongement dominant ne s'allonge pas en axone, le centrosome n'est donc pas retrouvé à la base de l'axone en formation. Les auteurs observent ainsi deux modes différents d'axogenèse durant la transition multipolaire à bipolaire. Lorsque l'axone se forme par extension tangentielle à partir du prolongement dominant, le centrosome est retrouvé orienté vers l'axone (**Figure 33 A**). Cependant, l'axone peut s'allonger à partir d'un prolongement autre que le prolongement dominant et dans ce cas, le centrosome n'est pas requis pour l'axogenèse (**Figure 33 B**) (Sakakibara et al., 2014).

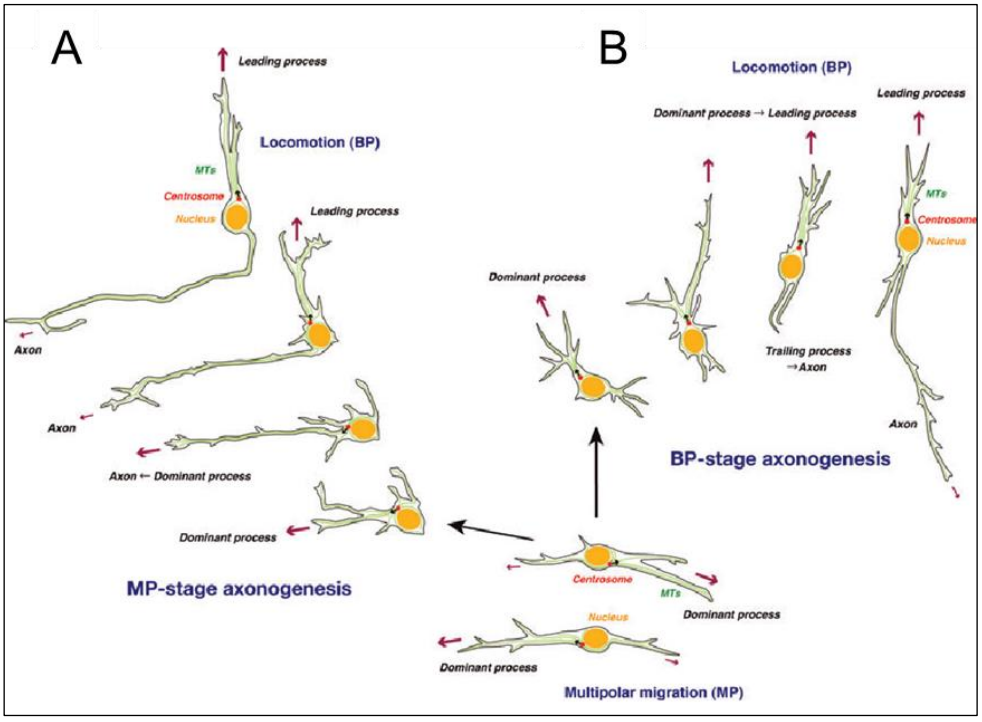


Figure 33 : Position du centrosome au cours de la polarisation neuronale.
Dans les neurones multipolaires, le centrosome est localisé à la base du prolongement dominant. (A) Lorsque l'axone se forme par extension tangentielle à partir du prolongement dominant, le centrosome est d'abord retrouvé orienté vers l'axone, avant de se réorienter vers le prolongement guide. (B) Lorsque l'axone se forme à partir d'un prolongement autre que le prolongement dominant le centrosome n'est pas retrouvé à la base de l'axone, mais est déjà localisé à la base du prolongement guide. Modèle proposé par (Sakakibara et al., 2014).

Il a été montré que différentes **molécules intracellulaires** telles que la protéine kinase LKB1 ou SAD-A/B régulent l'induction de l'axone en changeant les niveaux de phosphorylation de protéines associées aux MTs comme Tau ou DCX (Barnes et al., 2007; Shelly et al., 2007). En effet, la perte de fonction de la protéine kinase LKB1 dans les progéniteurs empêche l'induction de l'axone. Sous l'action de signaux extracellulaires tels que le BDNF, LKB1 est phosphorylée et active les

kinases SAD-A et B qui phosphorylent Tau (Barnes et al., 2007; Shelly et al., 2007). Le complexe de protéines kinase aPKC/Par joue également un rôle central dans la spécification de l'axone : par exemple, l'inhibition de aPKC (Atypical protein kinase C) empêche l'induction de l'axone dans des cultures de neurones hippocampiques (Zhang et al., 2007). Plusieurs études ont montré que la voie de signalisation DLK (dual leucine zipper kinase)/JNK (c-Jun N-terminal kinase) régule la polarisation des neurones en favorisant la spécification et la croissance axonale (Eto et al., 2010; Gdalyahu et al., 2004; Hirai et al., 2011). Des souris doublement mutées pour JNK et DLK présentent en effet des défauts de polarisation des neurones et une absence de formation de l'axone (Hirai et al., 2011). DLK/JNK permet la polarisation axonale en stabilisant le cytosquelette de MTs par l'intermédiaire de DCX et de MAP1B, protéines d'association aux MTs connues pour être impliquées dans l'élongation de l'axone (Eto et al., 2010; Gdalyahu et al., 2004). Dans des cultures de neurones hippocampiques, la perturbation de la voie DLK/JNK conduit à des défauts de polarisation et inhibe la croissance des neurites (Eto et al., 2010; Gdalyahu et al., 2004) et les défauts de polarisation neuronale sont sauvés lorsque les cultures sont traitées avec du Taxol, un agent de stabilisation des MTs (Eto et al., 2010). La famille des Rho-GTPase et leurs effecteurs régulent également l'organisation des cytosquelettes d'actine et de MTs en réponse à des stimulis extracellulaires (tels que les neurotrophines, le TGFβ, la signalisation Wnt) et jouent un rôle important dans la polarisation neuronale, l'élongation et le guidage axonale. Par exemple, il a été observé que la voie Rac1/Cdc42 est activée localement à l'extrémité de l'axone en cours de formation (Garvalov et al., 2007), et que cette voie de signalisation contrôle le mouvement rétrograde des filaments d'actine via la phosphorylation de PAK1 et de Shootin-1 (Toriyama et al., 2013). Le transport polarisé de différents cargos permis par les kinésines joue également un rôle central dans la polarisation axonale et est détaillé en chapitre 2, § II-B.

Parmi les **mécanismes extracellulaires** impliqués dans la polarisation neuronale et la stabilisation de l'axone, on peut citer plusieurs récepteurs aux neurotrophines (TrkR) et leurs ligands (BDNF, NT3). L'inhibition de l'activité des récepteurs TrkR empêche en effet l'axogenèse et entraîne l'accumulation des neurones multipolaires dans la ZI (Ip et al., 2011; Nakamuta et al., 2011). Par ailleurs, Namba et coll., ont montré que les neurites des neurones multipolaires entrent en contact avec les axones déjà formés (axones pionniers) des neurones précoces et que cette interaction est requise pour l'induction de l'axone des cellules multipolaires (Namba et al., 2014). L'interaction entre les axones pionniers et les neurones multipolaires nouveau-nés est médié par l'activité de la protéine d'adhésion TAG-1. En effet, la diminution de l'expression de TAG-1 dans les cellules MP empêche la polarisation des neurones. Les auteurs proposent que les contacts physiques entre les axones pionniers et les neurites pourraient augmenter la tension dans les neurites immatures et ainsi permettent l'élongation et la polarisation du neurone.

La formation de l'axone est-elle un prérequis pour la migration radiaire ? Les résultats à l'heure actuelle ne permettent pas de répondre à cette question. Les études menées par Ip et coll., Nakamuta et coll. et Namba et coll., montrent que l'axone se forme avant le début de la migration radiaire (Ip et al., 2011; Nakamuta et al., 2011; Namba et al., 2014), ce qui suggère que la formation de l'axone est un prérequis pour la migration. Cependant, Barnes et coll. ont montré que, bien que l'inhibition de LKB1 empêchait la polarisation des neurones, les neurones sont quand même capables de migrer dans la plaque corticale, suggérant que LKB1 n'est pas indispensable à la migration radiaire et la formation d'un axone n'est pas nécessaire à la migration (Barnes et al., 2007). Ces résultats sont cependant en contradiction avec deux autres études qui montrent que la diminution de l'expression de LKB1 par EIU de shRNAs dirigés contre LKB1 dans les neurones, conduit à un défaut de polarisation et à une accumulation des neurones multipolaires dans la ZI (Asada et al., 2007; Matsuki et al., 2013). De même, la diminution de l'expression de Stk25 (co-activateur de LKB1) par EIU de shRNAs, conduit également à des défauts de migration (Matsuki et al., 2013). Ces résultats suggèrent donc que le défaut de polarisation affecte la migration radiaire.

2. Formation des branches collatérales

Le branchement axonal peut se faire selon deux mécanismes distincts : 1) par la bifurcation du cône de croissance durant l'élongation axonale, qui permet la guidance axonale; ou 2) par la formation de nouvelles branches axonales le long de l'axone, qui permet d'établir des connections neuronales (Armijo-Weingart and Gallo, 2017) (**Figure 34 A**).

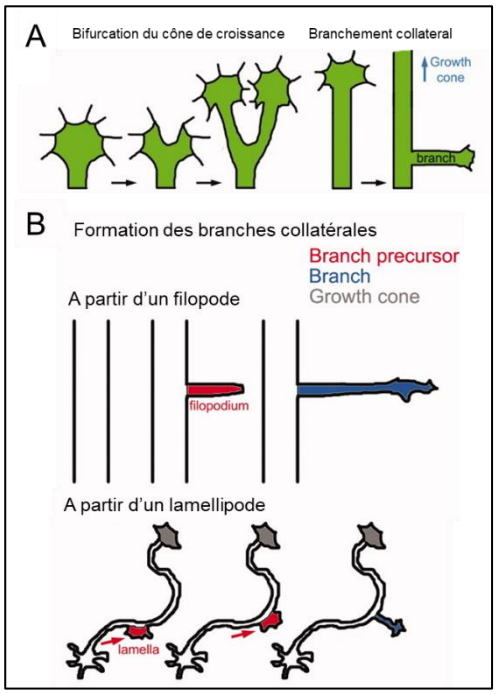


Figure 34 : Formation des branches axonales collatérales. (A) La bifurcation du cône de croissance permet la formation de deux branches indépendantes à l'extrémité de l'axone et est impliquée dans le guidage axonal. Au contraire, la formation des branches collatérales a lieu le long de l'axone et est initiée (B) à partir d'un filopode ou d'un lamellipode. (Gallo, 2011).

La formation de nouvelles branches axonales (également appelées « collatérales ») le long de l'axone est indépendante du cône de croissance et permet aux neurones d'établir des contacts entre eux. Les branches axonales naissent à partir de protrusions enrichies en actine le long de l'axone (soit à partir de lamellipodes, soit à partir de filopodes) qui servent de précurseurs à la

formation de branches (**Figure 34 B**). Contrairement aux filopodes qui sont des structures allongées, les lamellipodes forment des structures en forme de vagues enrichies en actine (appelées « actine wave ») qui se déplacent lentement le long de l'axone de façon rétrograde (Flynn et al., 2009; Tint et al., 2009). La protrusion est ensuite envahie par les MTs axonaux qui permettent l'allongement et la formation de la branche qui sera ensuite stabilisée (**Figure 35**). Les branches sont des structures hautement dynamiques qui peuvent s'étendre sur de longues distances mais aussi se rétracter complètement dans l'axone.

La formation des branches collatérales est essentielle à l'établissement de connections neuronales *in vivo* (voir § C-3). La croissance et le guidage des branches axonales, en réponse aux signaux extracellulaires, requière la réorganisation dynamique des cytosquelettes d'actine et de MT. Les cycles de polymérisation et de dépolymérisation des cytosquelettes d'actine et de MT sont hautement régulés par les protéines associées à ces cytosquelettes. Les voies de signalisation et la réorganisation des cytosquelettes, requises pour le branchement axonal, ont principalement été investigués *in vitro* (Dent et al., 1999; Kalil and Dent, 2014).

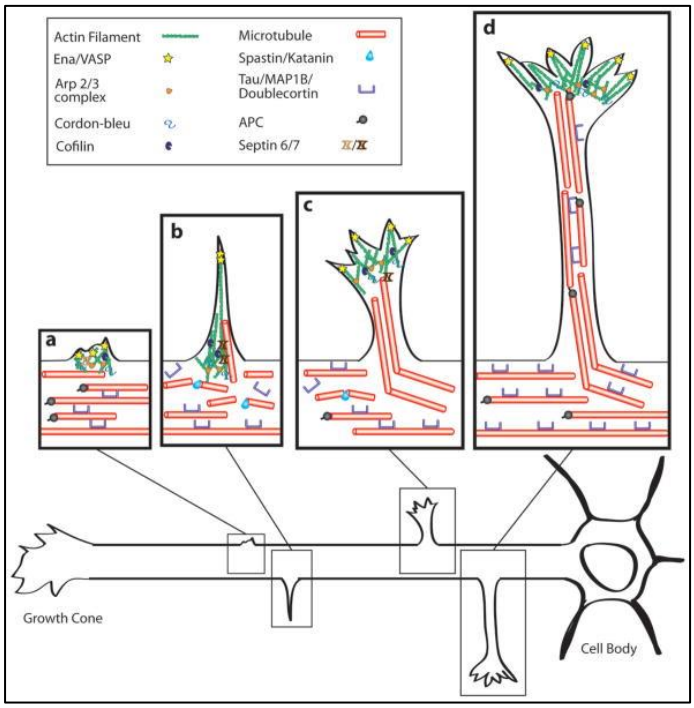


Figure 35 : Réorganisation des cytosquelettes au cours de la formation d'une branche collatérale. (Kalil and Dent, 2014). Voir texte principal ci-dessous.

Dans les protrusions, les filaments d'actine s'accumulent et forment des patches (**Figure 35 a**). La formation de la protrusion nécessite donc la formation de nouveaux filaments d'actine, qui sont nucléés via les protéines de nucléation Arp2/3 (Spillane et al., 2011, 2012) et cordon-bleu (Ahuja et al., 2007). La dynamique des filaments d'actine (taux de polymérisation/dépolymérisation) est régulée par les protéines de polymérisation (Ena/VASP, enabled/ vasodilator-stimulated phosphoprotein) (Lebrand et al., 2004) et de dépolymérisation (cofiline) (Chen et al., 2006). Dans l'axone, les MTs sont stabilisés par MAP2, Dcx et Tau (Koizumi et al., 2006; Qiang et al., 2006) et s'allongent au niveau de leurs extrémités (+) grâce aux protéines APC (Adenomatous polyposis coli)

(Zhou et al., 2004) et EBs (End Binding Proteins). Les MTs envahissent alors le filopode et s'allongent le long des filaments d'actine (**Figure 35 b**) (Dent and Kalil, 2001; Dent et al., 1999). Les MTs peuvent être coupés par les protéines de coupure Spastine et Katanine (Yu et al., 2008). La Septine permet l'entrée des MTs dans le filopode (Hu et al., 2012). Enfin, les MTs stabilisés entrent dans la branche en cours de formation permettant ainsi son allongement (**Figure 35 c,d**). A l'extrémité de la branche se forme un cône de croissance qui favorise également l'élongation de la branche.

L'interaction entre les MTs et les filaments d'actine est requis pour le branchement et la croissance des branches. En effet, l'application de drogues qui réduisent la dynamique du cytosquelette d'actine inhibe également la polymérisation du cytosquelette de MTs, et *vice-versa* (Dent and Kalil, 2001). Bien qu'il existe de multiple molécules capables de lier simultanément les cytosquelettes d'actine et de MTs (comme par exemple MAP2, MAP1B, les CLASPs, les septines, MACF1, Dcx) (Bouquet et al., 2007; Hu et al., 2012; Ka and Kim, 2016; Tsvetkov et al., 2007; Worth et al., 2013), peu d'études se sont intéressées au rôle de ces molécules dans la coordination des cytosquelettes durant la formation des branches axonales.

3. Le cône de croissance

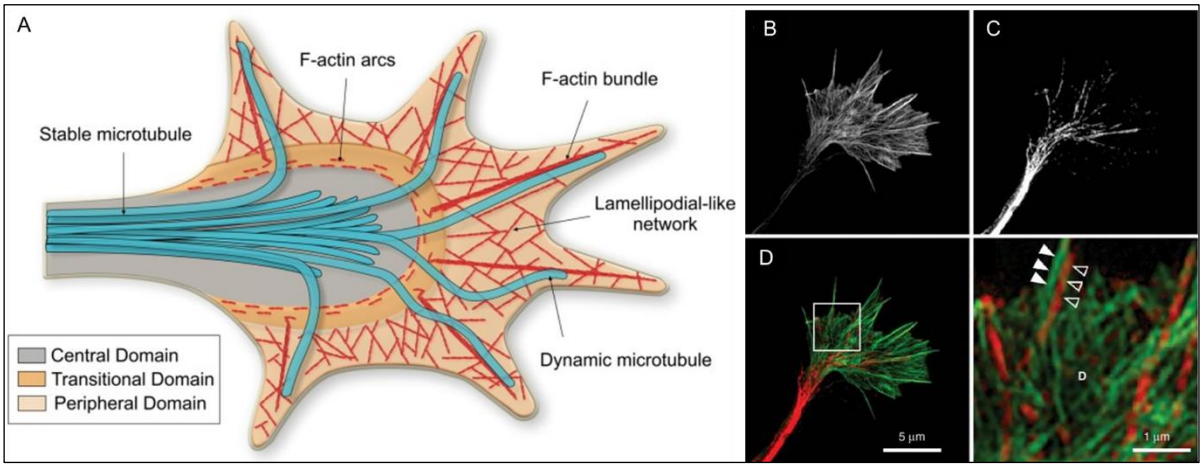


Figure 36 : Organisation des cytosquelettes d'actine et de microtubules dans le cône de croissance. (A) Le domaine central (domaine C) du cône de croissance contient le cytosquelette de MT qui polymérise aux extrémités (+) vers la membrane plasmique. Le domaine périphérique (domaine P) contient les filaments d'actine qui polymérisent dans les filopodes et les lamellipodes ce qui permet la propagation du cône de croissance. Au niveau de la zone de transition (zone T), les filaments d'actine et le réseau de MTs interagissent (Cammarata et al., 2016). (B-D) Cône de croissance de neurones hippocampiques de souris immunomarquées pour l'actine filamenteuse (B, phalloidin) et la tubuline tyrosinée (C). (D) Overlay des images (B) et (C). Les MTs sont en rouge tandis que l'actine est en vert (Dent et al., 2011) .

La croissance de l'axone se fait à partir de son cône de croissance. Le cône de croissance est une structure dynamique retrouvée à l'extrémité de l'axone dans laquelle les cytosquelettes d'actine et de MTs coopèrent et interagissent pour permettre la croissance axonale. Le cytosquelette de MTs, qui permet la rigidité et la structure de l'axone, entre dans le domaine central (domaine C) du cône de croissance et polymérise aux extrémités (+) vers la membrane plasmique. Le domaine périphérique (domaine P) du cône de croissance contient les filaments d'actine dans les filopodes

et les lamellipodes. Ces structures composées d'actine dirigent la propagation du cône de croissance. Les filaments d'actine des lamellipodes et filopodes ont leur extrémités (-) dirigées vers la région basale du cône de croissance qui définit une zone de transition (zone T). A cet endroit, les filaments d'actine et le réseau de MTs interagissent (Cammarata et al., 2016) (**Figure 36**).

Les axones, via leur cône de croissance, naviguent sur de très longues distances afin d'atteindre leurs structures cibles. Le guidage axonal fait intervenir deux processus : la croissance axonale et l'orientation du cône de croissance. La croissance axonale est décrite selon une séquence d'évènements qui sont (1) la protrusion, impliquant l'extension des filopodes contenant l'actine filamenteuse; (2) l'engorgement, permettant le mouvement du domaine C vers l'avant ; et (3) la consolidation.

Ces processus reposent principalement sur quatre types de mécanismes : l'attraction de contact, la chémoattraction, la répulsion de contact et la chémorépulsion (**Figure 37**) et sont contrôlés par les molécules spécifiques qui peuvent être attractives (nétrines et sémaphorines) ou répulsives (nétrines, sémaphorines, éphrines et slit) (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). Ces molécules se lient à leurs récepteurs spécifiques présents à la surface du cône de croissance, activant ainsi une cascade de signalisation qui remodèle les cytosquelettes d'actine et de MTs dans le cône de croissance, induisant un changement de sa morphologie en direction ou à l'opposé de la source de molécules.

Les cytosquelettes d'actine et de MTs sont essentiels à la dynamique du cône de croissance. Des études utilisant des drogues spécifiques permettant de bloquer la polymérisation des cytosquelettes d'actine et de MTs ont montré que ces deux cytosquelettes ont des rôles distincts dans cette dynamique. Globalement, l'actine filamenteuse participe au maintien de la forme du cône de croissance et à son orientation, tandis que les MTs permettent la croissance et la structure axonale, ainsi que l'orientation du cône de croissance.

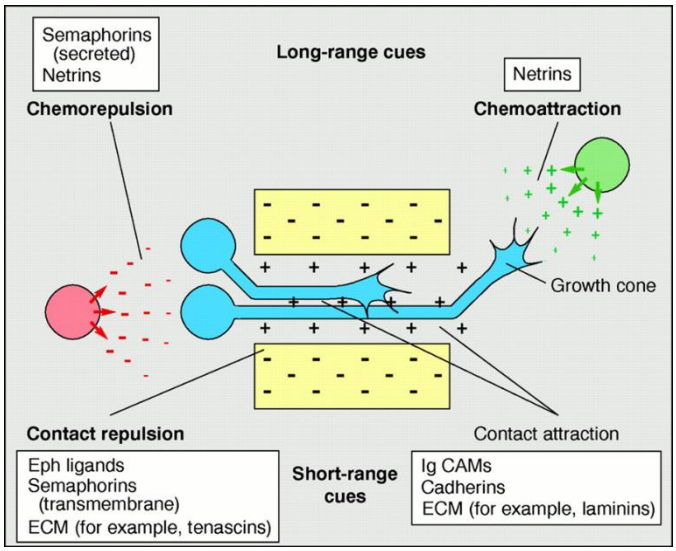


Figure 37 : Schéma récapitulatif des principaux processus de régulation du guidage axonal. Quatres mécanimes permettent de guider les cônes de croissances : l'attraction de contact, la répulsion de contact, la chémoattraction et la chémorepulsion. Les axones sont soumis à une combinaison de facteurs attractifs et répulsifs qu'ils reconnaissent en exprimant à la surface de son cône de croissance les récepteurs adéquats. Des exemples de molécules impliquées dans ces mécanismes sont indiqués sur ce schéma. (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996).

4. Régulation de l'élongation axonale et de la formation des branches collatérales

L'élongation axonale (à partir du cône de croissance), la formation et la dynamique des branches collatérales impliquent de multiples acteurs moléculaires qui permettent la réorganisation des cytosquelettes d'actine et de MTs au niveau de l'axone et des points de branchements. De nombreuses molécules intracellulaires et extracellulaires ainsi que diverses voies de signalisation sont impliquées dans ces évènements, et elles ne seront pas toutes détaillées ici. Une liste non exhaustive des principaux acteurs intracellulaires impliqués dans le remodelage des cytosquelettes d'actine et de MTs au cours de l'axogenèse, du guidage axonal et de la formation des branchements collatéraux sont listés en **tableau 1**. Le rôle des kinésines dans ces étapes du développement cortical est détaillé en chapitre 2, § II-C.

a. Régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine

Parmi les nombreux facteurs intracellulaires importants dans le remodelage du cytosquelette d'actine, on peut citer la **famille des Rho-GTPase** et leurs effecteurs RhoA et Rac1 qui, en réponse à divers stimuli extracellulaires, jouent un rôle important dans le branchement, l'élongation et le guidage axonal. Les Rho-GTPases ont une activité cyclique régulée par les facteurs GEF (guanine nucleotide exchange factors) et GAP (GTPase activating proteins) (**Figure 38**). De manière générale, Rac1 stimule la croissance et le branchement axonal tandis que RhoA a des effets négatifs sur ces mécanismes.

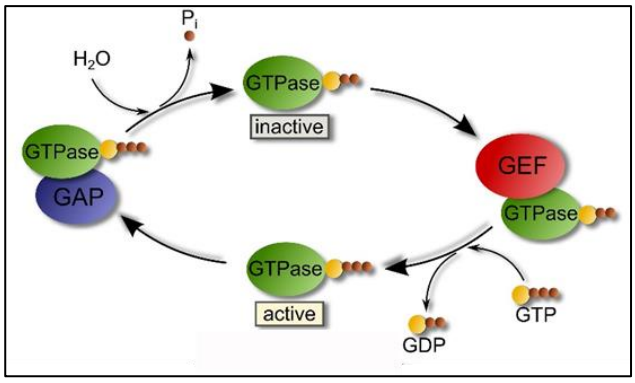


Figure 38 : Régulation des protéines GTPases par les GEFs et les GAPs.
La fonction des GTPases dépend de l'équilibre entre leurs formes inactives, liées au GDP, et actives, liées au GTP. Sous forme GTP, les GTPases interagissent et activent des protéines effectrices spécifiques. Les facteurs d'échanges nucléotidiques GEF (guanine nucleotide exchange factors) activent les GTPases en accélérant l'échange du GDP pour le GTP, tandis que les GAP (GTPase-activating proteins) assurent le retour de la GTPase à l'état inactif par hydrolyse du GTP. (Droppelmann et al., 2014).

RhoA est un régulateur négatif de la croissance axonale et du guidage via son effet sur la cofiline et la myosine-II. Dans le cône de croissance, les signaux répulsifs EphrinA2 et Slit3 conduisent à l'activation de RhoA qui, via une cascade de signalisation, conduit à l'inactivation de la cofiline (enzyme de dépolymérisation de l'actine) et au collapse du cône de croissance (Aizawa et al., 2001; Marsick et al., 2012). RhoA permet également la rétractation du cône de croissance en favorisant l'activité contractile de la myosine-II par l'intermédiaire de la kinase MLCK (Gallo, 2006) (**Figure 39**).

La croissance axonale nécessite au contraire la polymérisation des filaments d'actine à la périphérie du cône de croissance. Ce processus est contrôlé par les protéines de nucléation de l'actine Actin-Related Protein(Arp)2/3 et les Formines, et par les facteurs de polymérisation de l'actine Enabled/vasolidator-stimulated phosphoprotein (Ena/VASP) (**Figure 39**). Le complexe Arp2/3 est l'effecteur majeur de Rac1 et Cdc42 et permet de contrôler la nucléation des filaments d'actine et l'assemblage de ces filaments (Goley and Welch, 2006; Korobova and Svitkina, 2008). L'inhibition de Arp2/3 dans les neurones bloque en effet la protrusion des filopodes et des lamellipodes et augmente l'activité de RhoA (Korobova and Svitkina, 2008; San Miguel-Ruiz and Letourneau, 2014). Une étude récente a montré que la Formine était requise pour la maturation et l'adhésion des filopodes au substrat (Sahasrabudhe et al., 2016). En effet, bien que la déplétion de *Fmr2* (Formine-2) n'affecte pas l'initiation ou l'élongation du filopode, la protéine est cependant requise pour réguler la stabilisation des filopodes au niveau de leurs extrémités (Sahasrabudhe et al., 2016).

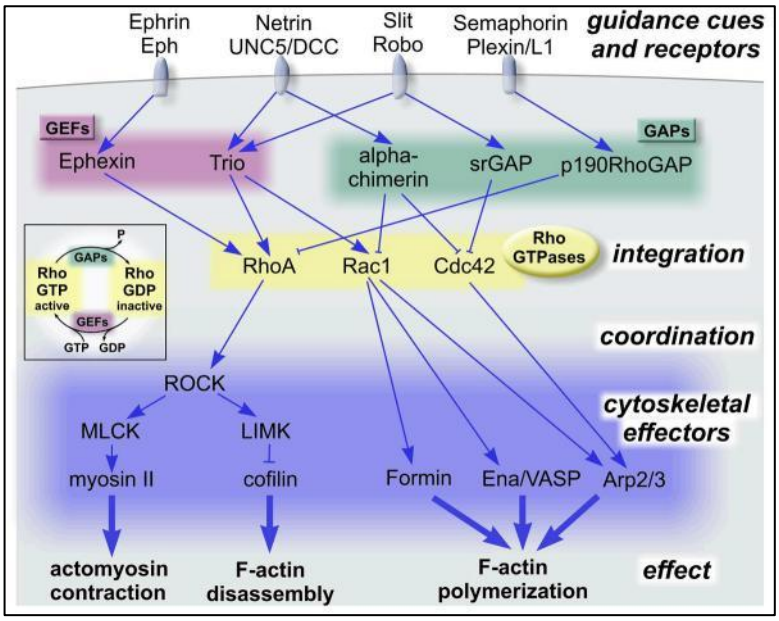


Figure 39 : Remodelage du cytosquelette d'actine par les protéines GTPase, dans le cône de croissance.
Les protéines GTPase de la famille Rho sont des molécules clés dans le remodelage du cytosquelette d'actine. L'activation ou l'inactivation des Rho-GTPase participe à la contraction de l'acto-myosine, au désassemblage des filaments d'actine ou bien à la polymérisation de l'actine. Le remodelage et la dynamique du cytosquelette d'actine permet au cône de croissance de changer de direction en fonction de la localisation et du type de signal reçu (attractif ou répulsif). Des exemples de signaux de guidage axonal et de leurs récepteurs et des effecteurs de la famille des Rho-GTPase sont représentés sur ce schéma. (Lowery and Van Vactor, 2009).

Plusieurs études menées dans divers modèles animaux ont montré que Rac1 était essentiel à la croissance et au branchement axonale. La perte de fonction de Rac1 chez la Drosophile conduit à des défauts de croissance et de guidance axonale et altère les branchements (Ng et al., 2002). L'activité de Rac1 stimule également la formation des branches dans les neurones de rétine de Xenopus (Moon and Gomez, 2010). Dans les neurones de poulet en culture, Rac1 induit la formation des filopodes, qui sont les précurseurs des branchements collatéraux, en favorisant la polymérisation de l'actine via le complexe Arp2/3 (Spillane et al., 2012). Chez la souris, la perte de fonction de Rac1 étant létale très tôt au cours du développement, les études des rôles de Rac1 dans le développement neuronal ont été faites chez les mutants conditionnels. La délétion de Rac1 dans le télencéphale ventral empêche la formation du corps calleux et les commissures hippocampiques mais n'affecte pas l'élongation de l'axone, suggérant que Rac1 contrôle la guidance axonale plutôt

que la croissance axonale (Chen et al., 2007). Dans les cultures de neurones hippocampiques, Rac1 permet de recruter le complexe WAVE (WASP family verprolin-homologous) à la membrane plasmique de l'axone en formation et le complexe WAVE régule la dynamique des filaments d'actine via la protéine Arp2/3 pour induire l'élongation axonale (San Miguel-Ruiz and Letourneau, 2014; Tahirovic et al., 2010). Ainsi, les filaments d'actine sont plus dynamiques dans l'axone en formation que dans les autres neurites mineurs ce qui permet l'élongation de l'axone.

b. Régulation de la dynamique du cytosquelette de MTs

Les MAPs sont des protéines régulatrices qui s'associent aux MTs et qui sont capables de réguler leurs propriétés dynamiques et leur organisation. De nombreuses études ont mis en évidence le rôle essentiel des MAPs sur le branchement, l'élongation et le guidage axonale. Dans cette partie, je citerai quelques exemples connus de MAPs impliquées dans ces fonctions. L'ensemble des MAPs citées dans ce paragraphe sont listées en **Tableau 1**.

i. Les MAPs stabilisatrices du réseau de MTs

MAP1B est requise pour la guidance axonale, la migration du cône de croissance et le branchement axonal à la fois *in vitro* et *in vivo* (Bouquet et al., 2004; Meixner et al., 2000). Des souris homozygotes mutantes pour le gène *MAP1B* présentent des défauts de développement comme une absence de corps calleux (région cérébrale riche en axones) (Meixner et al., 2000). Trois variants dans le gène *MAP1B* humain ont récemment été découverts chez des individus présentant une DI, une diminution du volume du corps calleux et de la substance blanche (Walters et al., 2018) soulignant ainsi le rôle crucial de MAP1B dans la croissance et la guidance axonale chez la souris et l'humain. MAP1B est également impliquée dans l'établissement des branchements axonaux. Dans des neurones adultes de rat, les niveaux de MAP1B phosphorylés sont diminués aux points de branchements suggérant que MAP1B régule négativement le branchement axonal (Barnat et al., 2016).

Le gène *MAPII* code pour la protéine **MAP2** dont il existe quatre isoformes (A, B, C et D) différentes obtenues par la traduction de deux ARNm distincts et exprimés à différents temps au cours du développement neuronal. Les protéines MAP2 sont les MAP neuronales les plus abondantes, principalement exprimées dans les dendrites et le corps cellulaire des neurones mais ont été montrées comme étant importantes pour l'initiation de l'axone. MAP2, et en particulier l'isoforme MAP2C est également capable de se lier aux filaments d'actine. L'interaction de MAP2 aux MTs et aux filaments d'actine, requise pour la stabilité de ces deux cytosquelettes, est dépendante de son état de phosphorylation et la phosphorylation de MAP2 réduit sa capacité à interagir avec les MTs et l'actine, compromettant la stabilité de ces réseaux (Roger et al., 2004; Sattilaro, 1986; Selden and Pollard, 1986). L'interaction de MAP2C entre les MTs et le cytosquelette d'actine est essentielle à la formation des axones et des dendrites et MAP2C pourrait avoir un rôle dans l'organisation du cytosquelette d'actine dans les lamellipodes lors de l'initiation axonale

(Dehmelt et al., 2003). La perte de fonction de MAP2C dans des cultures de neurones primaires entraîne une diminution du nombre de neurites due à une désorganisation du réseau de MTs et empêche donc la croissance axonale (Caceres et al., 1992). De façon intéressante, la double invalidation des protéines MAP2 ou Tau et MAP1B induisent des phénotypes bien plus sévères que ceux observés avec l'invalidation simple de l'une ou l'autre des protéines (Teng et al., 2001) suggérant une redondance fonctionnelle entre MAP2 ou Tau et MAP1B.

MAP7 est une protéine connue pour s'associer aux MTs et permettre le recrutement de la Kinésine-1 aux MTs. Deux études récentes menées par la même équipe ont montré pour la première fois que MAP7 participe à la croissance axonale et à la formation des branches collatérales. Dans la première étude, les auteurs montrent que MAP7 colocalise avec les MTs acétylés au niveau des points de branchements axonaux et stabilise les MTs à ces endroits dans des neurones de rat en culture issus des ganglions spinaux (Tymanskyj et al., 2017). Dans cette même étude, les auteurs suggèrent que MAP7 favorise la maturation des branches collatérales plutôt que leur formation. Dans la seconde étude, les auteurs montrent que les différents domaines de MAP7 (domaine de liaison aux MTs et domaine de liaison à la Kinésine-1) jouent des rôles distincts dans la régulation de la croissance axonale et les branchements collatéraux (Tymanskyj et al., 2018). Aux points de branchements, MAP7 permet le recrutement de la kinésine-1 aux MTs et ralentit le transport des organelles et des mitochondries, médiées par la kinésine-1. En ralentissant le transport aux points de branchement, MAP7 facilite l'entrée de ces organelles dans les branches en formation et est essentielle à la formation des branches (Tymanskyj et al., 2018).

Tau est l'une des MAPs neuronale les plus étudiée et connue pour être impliquée dans de nombreuses maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou la démence fronto-temporale. Dans le cerveau des mammifères, il existe 6 isoformes différents pour la protéine Tau toutes générées par l'épissage alternatif d'un seul gène, *MAPT* (Andreadis et al., 1992; Goedert et al., 1989). Tau est spécifiquement exprimée dans les axones et dans le cône de croissance où elle est indispensable à l'élongation axonale dans des neurones en culture. Une diminution de l'expression de Tau dans les neurones conduit en effet à un défaut de croissance axonale, tandis qu'une surexpression de Tau promeut la pousse axonale (Binder et al., 1985; Kempf et al., 1996). De manière surprenante, les différentes souris homozygotes mutées pour le gène *MAPT* ne présentent pas de défauts développementaux, ni de malformations, et Tau ne semble pas indispensable à l'axogenèse *in vivo* (Ke et al., 2012). Ces résultats contradictoires suggèrent que d'autres MAPs, comme MAP1B peuvent compenser les fonctions de Tau au cours du développement du cerveau (Teng et al., 2001). Tout comme MAP2, Tau interagit avec les filaments d'actine (Correas et al., 1990; Elie et al., 2015). Par ailleurs, Tau est également capable de lier à la fois l'actine et les MTs *in vitro* par les mêmes domaines de liaison et ces interactions sont régulées par la phosphorylation de Tau (Cabrales Fontela et al., 2017; Elie et al., 2015).

La **doublecortine** (Dcx) est localisée au niveau des extrémités des axones et des dendrites (cônes de croissance) dans les neurones post-mitotiques en migration (Friocourt et al., 2003; Jean

et al., 2012; Tint et al., 2009). Dcx s'associe aux MTs au niveau des protrusions enrichies en actine et permet la liaison entre les filaments d'actine et le réseau de MTs (Tint et al., 2009). Plusieurs études ont montré que l'inactivation de Dcx *in vitro* et *in vivo* affecte la croissance dendritique (Bazelot et al., 2012; Cohen et al., 2008) et la guidance axonale (Tint et al., 2009). L'inhibition de Dcx altère la formation des branches collatérales dans les neurones hippocampiques et réduit significativement le nombre de clusters riches en actine le long de l'axone (Tint et al., 2009), suggérant ainsi que Dcx favorise le branchement collatéral. La perte d'expression de *Dcx* dans des neurones hippocampiques en culture inhibe par ailleurs la formation des lamellipodes enrichies en actine (actin waves) le long de l'axone (Flynn et al., 2009; Tint et al., 2009). Dans une autre étude utilisant des cultures de neurones, les auteurs montrent que la double inhibition de *Dcx* et *Dclk* a pour effet d'endommager le réseau de MTs dans les cônes de croissance (les MTs deviennent plus courts et plus courbés), ce qui a pour conséquence d'altérer la morphologie du cône de croissance et le guidage axonal (Jean et al., 2012). De nombreuses études suggèrent également que Dcx contrôle le remodelage des filaments d'actine dans le cône de croissance. En effet, la déplétion de Dcx *in vitro* affecte la structure des filaments d'actine dans les cônes de croissance (Fu et al., 2013). Il a par ailleurs été montré *in vitro* que Dcx interagit avec la spinophiline, une protéine de polymérisation de l'actine et que cette interaction favorisent la polymérisation des filaments d'actine (Bielas et al., 2007; Fu et al., 2013; Tsukada et al., 2005).

Les **protéines STOP** (Stable-Tubule-Only-Peptide), aussi connues sous le nom de **MAP6**, ont la capacité de protéger les MTs de la dépolymérisation lorsqu'ils sont exposés au froid (Denarier et al., 1998; Guillaud et al., 1998). Les protéines STOP/MAP6 se lient préférentiellement aux MTs stables et favorisent la formation des neurites et la différentiation neuronale (Guillaud et al., 1998).. Les souris homozygotes inactivées pour le gène *MAP6* présentent des défauts de plasticité synaptique et des déficits cognitifs à l'âge adulte (Andrieux et al., 2002; Fournet et al., 2012; Volle et al., 2013). De ce fait, ce modèle souris a beaucoup été utilisé pour l'étude de la schizophrénie (Bégou et al., 2008; Powell et al., 2007). Des modifications de l'anatomie et de la connectivité cérébrale ont été décrites chez ces souris (Deloulme et al., 2015; Gimenez et al., 2017) et pourraient être à l'origine des déficits cognitifs et comportementaux. Deloulme et coll., ont en effet mis en évidence une hypoplasie sévère des commissures cérébrales et des voies axonales à grande distance, dont une absence d'une partie du fornix reliant l'hippocampe et l'hypothalamus. Les auteurs ont montré que MAP6 participait au développement de fornix en régulant l'élongation axonale via la sémaphorine 3^{E}, donc indépendamment de sa liaison aux MTs (Deloulme et al., 2015). Une étude récente a exploré plus en détail l'anatomie du cerveau chez ces souris en utilisant l'imagerie par résonnance magnétique (IRM) 3D à haute résolution (Gimenez et al., 2017). Les auteurs ont observé, entre autre, une réduction de la taille globale du cerveau ainsi qu'une nette diminution du volume de la substance blanche au niveau du corps calleux, de la commissure antérieure et du tractus mamillaire. Une étude intéressante menée par Tortosa et coll., a montré que le cycle de palmitoylation/dépalmitoylation de MAP6 permettait de cibler sélectivement MAP6 dans

les axones au cours de la polarisation neuronale (Tortosa et al., 2017). Dans les cellules non polarisées, MAP6 palmitoylé est localisé dans le Golgi et les vésicules sécrétrices. Au cours de la formation de l'axone, MAP6 est dépalmitoylé et se détache des vésicules pour aller se localiser dans l'axone nouvellement formé. Dans les axones, MAP6 permet alors de stabiliser les MTs et favorise le transport des mitochondries médié par la kinésine Kif5b, contrôlant ainsi la maturation des axones (Tortosa et al., 2017). Outre son implication dans la polarisation et la maturation axonale, notons que MAP6 est également impliquée dans la plasticité synaptique au niveau des dendrites. Il a par exemple récemment été montré que MAP6 stabilise les filaments d'actine dans les épines dendritiques, favorisant ainsi la maturation et la maintenance de ces épines, ce qui est nécessaire à la plasticité synaptique (Peris et al., 2018).

ii. Les MAPs déstabilisatrices du réseau de MTs

Les **katanines** et les **spastines** sont des protéines qui permettent de briser les liaisons entre les sous-unités α et β de la tubuline conduisant ainsi au désassemblage des MTs (McNally and Roll-Mecak, 2018). Une étude a montré que la surexpression de la katanine dans des cultures de neurones hippocampiques conduit à la désorganisation du cytosquelette de MTs et à la diminution de la longueur totale des neurites et le nombre de neurites. Cependant, les effets de la katanine sur la morphologie cellulaire dépendent du niveau de dépolymérisation du réseau de MTs par la katanine (Yu et al., 2005). La spastine est retrouvée localement au niveau des points de branchements et contrairement à la katanine, la surexpression de la spastine induit la formation des banches collatérales (Yu et al., 2008). Les auteurs suggèrent que ces effets différents, médiés pourtant par deux protéines de dépolymérisation du réseau de MTs peuvent être due à la présence de protéines telles que Tau sur les MTs qui protège les MTs des effets de la katanine mais pas de la spastine (Qiang et al., 2006; Yu et al., 2008). Par ailleurs, la diminution de l'expression de la spastine inhibe la croissance des neurites mineurs dans des cultures de neurones, suggérant que la spastine est nécessaire à la formation des axones et des dendrites (Ji et al., 2018). De nombreuses autres MAPs déstabilisatrices des MTs sont également importantes dans la croissance axonale, comme par exemple la kinésine Kif2a dont le rôle est détaillé en Chapitre 2 (§ II-C).

iii. Les MAPs liées aux extrémités (+) des MTs

Les **+TIPs** (+ end tracking protein) sont des MAPs particulières retrouvées à l'extrémité (+) des MTs en croissance et qui jouent un rôle important dans la dynamique des MTs et dans leurs interactions avec d'autres structures. Il existe environ 20 familles de +TIP dont les plus connues sont les CLIPs (Cytoplasmic Linker Proteins), les CLASPs (CLIP-Associated Proteins) et les EBs (End Binding Proteins).

Au sein des neurones, les **CLIPs** sont enrichies dans les cônes de croissance ou elles stabilisent les MTs et sont nécessaires à la formation et à la croissance axonale (Neukirchen and Bradke, 2011b). En interagissant à la fois avec les cytosquelettes de MTs et d'actine, CLIP170

favorise également la morphogenèse dendritique (Swiech et al., 2011). De nombreuses études ont été menées pour tenter de connaitre la fonction des **CLASPs** durant la croissance axonale, mais les résultats obtenus sont en contradiction, notamment à cause de l'organisme ou du type cellulaire utilisé. Par exemple, la déplétion de CLASP2 dans les cultures de neurones corticaux favorise la pousse axonale (Hur et al., 2011) alors que dans les neurones hippocampiques, elle conduit au raccourcissement des axones (Beffert et al., 2012; Dillon et al., 2017). Une étude récente a montré que CLASP1 et CLASP2 ont des fonctions différentes au sein des neurones : alors que CLASP1 stimule la pousse des neurites, CLASP2 l'inhibe. Ces fonctions opposées sont dues à une différence d'expression et de distribution de ces deux isoformes dans les neurones mais également à une sensibilité différente à GSK-3β. Les auteurs montrent également que CLASP2 inhibe l'élongation de l'axone dans plusieurs types neuronaux (Sayas et al., 2019).

La famille des protéines **EB** est constituée de 3 membres (EB1, 2 et 3) exprimés de façon ubiquitaire, bien qu'EB3 soit particulièrement enrichie dans le cerveau et le muscle squelettique (Nakagawa et al., 2000). EB1 (et EB3) présentent une forte affinité pour l'extrémité (+) des MTs en croissance et forment des structures « comet-like » qui disparaissent progressivement durant les pauses et les catastrophes (Bieling et al., 2007). Outre leurs fonctions dans la croissance des MTs, les protéines EB interagissent à la fois avec le cytosquelette d'actine et de MTs au niveau du cône de croissance et permettent le recrutement de nombreuses protéines régulatrices (Cammarata et al., 2016). La **débrine** par exemple, est enrichie au niveau des filaments d'actine de l'axone et sert de pont entre le cytosquelette d'actine et de MTs via la protéine EB3. La perte d'interaction EB3/débrine conduit à la diminution du nombre de neurites mineurs et donc empêche la formation de l'axone (Geraldo et al., 2008), tandis que la surexpression de débrine promeut la formation de filopodes (Dun et al., 2012; Geraldo et al., 2008; Ketschek et al., 2016).

La protéine **APC** (Adenomatous polyposis coli) est également recrutée aux MTs via EB1 au niveau des extrémités (+) des MTs. L'inhibition de l'expression de APC conduit à l'augmentation du nombre de branches collatérales et la dynamique du cytosquelette de MTs, mais n'a pas d'effet sur le nombre d'axones et de dendrites formés par neurone (Chen et al., 2011; Yokota et al., 2009), suggérant que APC promeut la formation des branches collatérales mais n'a pas d'effet sur la formation et l'élongation axonale. APC interagit également avec Rac1, protéine GTPase connue pour son rôle dans la polarisation, l'élongation et le branchement axonale (Slep et al., 2005; Watanabe et al., 2004).

Molécule	Fonctions	Axogenèse	Références	Branchement	Références
Le cytosquelette d'actine et ses protéines associées					
Arp2/3	Nucléation actine	E+, G+	(San Miguel-Ruiz and Letourneau, 2014)	NB+, F+	(Spillane et al., 2011)
Formine	Nucléation actine	G+	(Sahasrabudhe et al., 2016)		
Myosine II	Moteur moléculaire Contraction actine	E+/-, G+	(Gallo, 2006; Ketschek et al., 2007)	NB- L-	(Kollins et al., 2009)
Ena/Vasp	Polymérisation actine			NB+, F+	(Applewhite et al., 2007)
Cofiline	Dépolymérisation actine	E+/-	(Ng and Luo, 2004)	L+	(Flynn et al., 2009)
Le cytosquelette de MTs et ses protéines associées					
Les protéines associées aux MTs (MAP) stabilisatrices du réseau de MTs					
MAP1B	Stabilité MTs Interaction actine-MTs	E+, G+	(Bouquet et al., 2004; Meixner et al., 2000)	NB-	(Barnat et al., 2016; Bouquet et al., 2004; Tymanskyj et al., 2012)
MAP2	Stabilité MTs Interaction actine-MTs	P+, E+	(Caceres et al., 1992; Dehmelt et al., 2003)		
MAP7	Stabilité MTs Recrutement KIF5C	E+	(Tymanskyj et al., 2017)	L+	(Tymanskyj et al., 2018)
Tau	Stabilité MTs Interaction actine-MTs	E+/-	(Binder et al., 1985; Kempf et al., 1996)	NB-	(Yu et al., 2008)
Doublecortine	Interaction actine-MTs	G+	(Jean et al., 2012; Tint et al., 2009)	NB+, L+	(Flynn et al., 2009; Tint et al., 2009)
Lis1/dynein	Remodelage cône de croissance	E+	(Grabham et al., 2007)		
Les MAPs déstabilisatrices qui dépolymérisent le réseau de MTs					
KIF2A	Kinésine atypique Dépolymerisation MTs	E+, G+	(Homma et al., 2003; Maor-Nof et al., 2013)	RB+	(Homma et al., 2003)
Katanine	Dépolymerisation MTs	P+/-, E+/-	(Yu et al., 2005)		
Spastine	Dépolymerisation MTs	P+	(Ji et al., 2018)	NB+	(Yu et al., 2008)
MAPs liées aux extrémités (+) des MTs (+ end tracking protein, +TIPs)					
APC	+TIPs,	E+	(Zhou et al., 2004)	NB+	(Chen et al., 2011)
CLASP1/2	+TIPs	E+/-, G+	(Beffert et al., 2012; Dillon et al., 2017; Hur et al., 2011; Marx et al., 2013; Sayas et al., 2019)		
CLIP-115/170	+TIPs	P+, E+	(Neukirchen and Bradke, 2011b)		
EB3/débrine	+TIPs/ Interaction actine-MTs	P+	(Geraldo et al., 2008)	NB+	(Dun et al., 2012; Ketschek et al., 2016)

Tableau 1 : Liste non exhaustive des principales molécules impliquées dans la dynamique et/ou le remodelage des cytosquelettes d'actine et de microtubule et leurs effets au cours de l'axogenèse et du branchement collatéral.

Les cytosquelettes d'actine et de microtubules (MTs) permettent d'établir et de maintenir les connections neuronales en favorisant la stabilisation et la croissance des axones et de leurs branches collatérales. La dynamique et l'organisation des MTs sont permises pas les protéines associées aux MTs (MAPs) qui s'associent à eux. On distingue les MAPs stabilisatrices des réseaux de MTs, les MAPs déstabilisatrices qui dépolymérisent le réseau de MTs et les MAPs liées aux extrémités (+) des MTs (+ end tracking protein, +TIPs) qui permettent la croissance des MTs et le recrutement de protéines.

Rôles de ces protéines dans l'axogenèse : **P**, polarisation du neurone/formation de l'axone ; **E**, élongation de l'axone (axogenèse); **G**, guidage de l'axone. **+**, effet positif ; **-** effet négatif. Rôles de ces protéines dans le branchement collatéral : **NB**, nombre de branches collatérales; **RB**, rétractation des branches collatérales ; **F**, formation des filopodes ; **L**, formation des lamellipodes ; **+**, effet positif ; **-** effet négatif. APC, Adenomatous polyposis coli; CLIPs, Cytoplasmic Linker Proteins; CLASPs, CLIP-Associated Proteins; EB, End Binding Proteins.

C. Un exemple de guidage axonal : la formation du corps calleux

1. Développement des projections callosales et branchement contralatéral

Le corps calleux est composé de plus de 200 millions d'axones issus des neurones de projection callosal, qui relient les hémisphères droit et gauche. La formation du corps calleux commence aux alentours du 74^{e} jour de gestation chez l'humain avec les premières fibres axonales qui traversent la ligne médiane vers 12 semaines. Chez la souris, la formation du corps calleux (CC) débute aux alentours de E15 et se termine vers P15 (Richards, 2002).

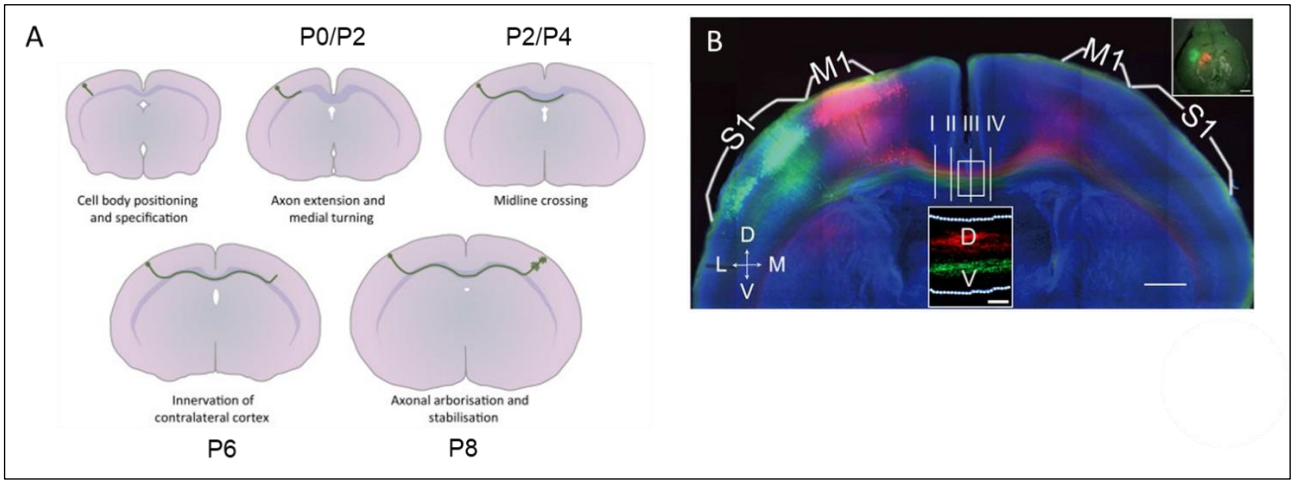


Figure 40 : Développement du corps calleux.
(A) Les neurones de projection callosal projettent leurs axones vers l'hémisphère opposé (en contralatéral) en plusieurs étapes décrites dans le texte principal. L'axone callosal est schématisé en rouge (Fenlon and Richards, 2015). (B) Les axones issus de différentes régions corticales sont ségréguées dans le corps calleux. Coupe corticale de souris à P8 dont les neurones callosaux du cortex moteur primaire (M1) sont marqués avec la mCherry et ceux du cortex sensoriel primaire (S1) avec la EGFP (Echelle, 500 µm). Encart supérieur droit : cerveau de souris à P8 (Echelle, 500 µm). Encart inférieur : axones callosaux traversant la ligne médiane (Echelle, 50 µm) (Zhou et al., 2013).

Les neurones de projection callosal situés dans les couches corticales II/III et V projettent leurs axones vers l'autre hémisphère en passant par la ligne médiane (**Figure 40 A**). Vers E15, les premiers neurones (neurones pionniers) envoient leurs axones ventralement vers la ZI sous l'influence de facteurs de guidance telles que Sema3A qui empêche les axones de pénétrer dans la zone marginale. Les projections axonales atteignent la ZI vers P0/P2, puis se dirigent vers la ligne médiane et la traversent au niveau de la frontière cortico-septale entre P2 et P4. Au niveau de cette frontière se trouvent différentes structures gliales importantes pour la régulation de la guidance axonale des neurones de projection callosal : les « glial wedge », « midline zipper glia » et « indusium griseum glia » (Shu and Richards, 2001). Ces structures sont riches en cellules gliales radiaires qui donnent naissance à des astrocytes multipolaires (Gobius et al., 2016). La différenciation des cellules gliales radiaires en astrocytes est initiée par le signal Fgf8 qui active le facteur de transcription nucléaire pro-astrocytaire *Nfi* (Gobius et al., 2016). Après avoir traversés la ligne médiane, les axones se dirigent alors vers la partie dorsale dans l'hémisphère opposé. Les axones s'allongent alors pour rejoindre leurs cibles corticales aux alentours de P6. Vers P8, une fois

arrivés dans la substance blanche en contralatéral, les axones innervent la plaque corticale en utilisant les fibres gliales radiaires comme guide. Les axones callosaux branchent alors dans les régions corticales II/III et V, et dans une moindre mesure dans la couche VI chez les rongeurs (Fenlon and Richards, 2015).

Les axones callosaux branchent généralement dans les mêmes régions contralatérales que celles dans lesquelles leur corps cellulaire se situe. Par exemple, les axones callosaux du cortex primaire (M1) et du cortex sensoriel primaire (S1) projettent dans les régions équivalentes dans l'hémisphère contralatéral en M1 et S1 respectivement (Zhou et al., 2013) (**Figure 40 B**). Les axones callosaux projettent également vers d'autres régions au sein du même hémisphère mais aussi vers différentes régions corticales en contralatéral (Fenlon and Richards, 2015). Plusieurs études ont montré que l'activité neuronale influence la maturation et la distribution du branchement callosal en contralatéral (Mizuno et al., 2007, 2010; Wang et al., 2007). La suppression de l'activité neuronale par EIU à E15,5 du canal potassique Kir2.1, altère la croissance axonale et conduit à des défauts de branchements en contralatéral à partir de P7 (Mizuno et al., 2007; Wang et al., 2007). Par ailleurs, le blocage de la transmission synaptique dans ces axones conduit à une diminution plus prononcée des projections callosales au niveau de la ligne médiane et dans le cortex sensoriel en contralatéral (Mizuno et al., 2010; Wang et al., 2007). Une étude récente a montré que le facteur de transcription Cux1 (exprimé spécifiquement par les neurones de projection callosal) régule le branchement axonal inter-hémisphérique via la régulation transcriptionnelle du canal potassium Kv1 (Rodríguez-Tornos et al., 2016).

2. Mécanisme du guidage axonal des neurones de projection callosal

a. Rôle des molécules sécrétées par la ligne médiane

Le guidage axonal est requis lors de la traversée de la ligne médiane par les axones des neurones de projection callosal et fait intervenir différentes molécules et leurs récepteurs qui permettent le contrôle de la traversée via leurs effets attractifs et répulsifs.

Les structures gliales de la ligne médiane, à savoir le glial wedge (GW), l'indusium griseum (IG), la midline zipper (MZ), et le glial sling (GS) sécrètent des molécules spécifiques (attractives ou répulsives) qui participent au guidage des axones callosaux et apparaissent vers E13 chez la souris (Shu et al., 2003). Parmi les molécules impliquées dans la formation du corps calleux, on retrouve les molécules de longue portée de la famille des Slits, Wnt, Nétrines, Draxin et sémaphorines, qui forment un gradient de concentration au niveau de la ligne médiane (Andrews et al., 2006; Bagri et al., 2002; Keeble et al., 2006; Unni et al., 2012) (**Figure 41**) mais également des molécules de courte portée comme les Eprhines et leurs récepteurs associés (Mendes et al., 2006) (**Figure 41**). Par ailleurs, il a été montré que deux populations de neurones glutamatergiques et GABAergiques transitoires envahissent la ligne médiane avant le début de la formation du CC et permettent d'attirer les axones callosaux pionniers vers la ligne médiane par la sécrétion de Sémaphorine 3C (Niquille et al., 2009). Le facteur BMP7, sécrété par les méninges a également été montré comme inhibant

la croissance des axones callosaux, empêchant donc la formation du CC (Choe et al., 2012). L'induction de l'expression de Wnt3 par les neurones callosaux permet d'outrepasser le signal inhibiteur BMP7 (Choe et al., 2012).

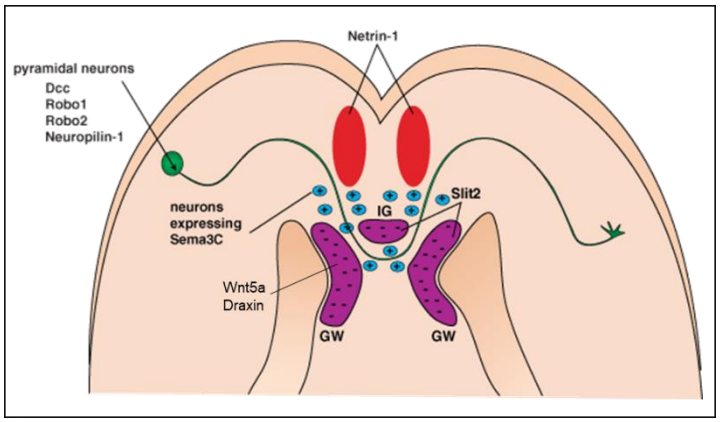


Figure 41 : Mécanisme du guidage axonale au niveau de la ligne médiane.
Les axones callosaux (en vert) expriment les récepteurs Robo-1 et 2, Dcc et Neuropiline-1. Au niveau de la ligne médiane, les axones issus des neurones du cortex cingulaire (non représentés sur le schéma) expriment Netrine-1 (qui se fixe au récepteur Dcc) et Sema3C (qui se fixe au récepteur Neuropilin-1). Netrin-1 et Sema3A permettent d'attirer les axones callosaux à la ligne médiane. En revanche, Slit2, exprimé par les cellules gliales de l'indusium griseum (IG) et le glial wedge (GW), se lie aux récepteurs Robo-1 et 2 et agit comme un répulsif. Wnt5a et draxin, exprimés par le GW agissent également comme des répulsifs. (−) molécules répulsives, (+) molécules attractives (Izzi and Charron, 2011).

b. Rôle des axones pionniers et des interactions axonales

Les neurones pionniers jouent également un rôle important dans le guidage des axones callosaux. Ces neurones sont originaires du cortex cingulaire et traversent la ligne médiane aux alentours de E15 chez la souris (Rash and Richards, 2001). Vers E17, les axones callosaux des neurones de la couche corticale V sont les premiers à rejoindre la ligne médiane et ils utilisent les axones pionniers comme guide pour trouver leur chemin vers l'autre hémisphère. Il a été montré que la Neuropilin-1, exprimée par les neurones pionniers du cortex cingulaire joue un rôle crucial dans ce système de guidage (Piper et al., 2009) (**Figure 42 A**). Une autre étude a montré qu'il existe des interactions répulsives entre les axones callosaux issus des neurones présents dans les parties médianes et latérales de la plaque corticale. Les axones callosaux issus des neurones de la partie médiane du cortex (correspondant au cortex cingulaire et à la partie médiane du cortex sensoriel primaire) traversent la ligne médiane en passant par la partie dorsale tandis que les axones callosaux issus des neurones de la partie latérale du cortex (cortex sensoriel secondaire) passent par la partie ventrale de la ligne médiane (Nishikimi et al., 2013; Zhou et al., 2013). L'étude menée par Nishikimi et coll., montre que cette ségrégation dorso-ventrale des axones callosaux est médiée en partie par la sécrétion de EphA3 par les axones callosaux issus du cortex latéral (Nishikimi et al., 2013) (**Figure 42 B**).

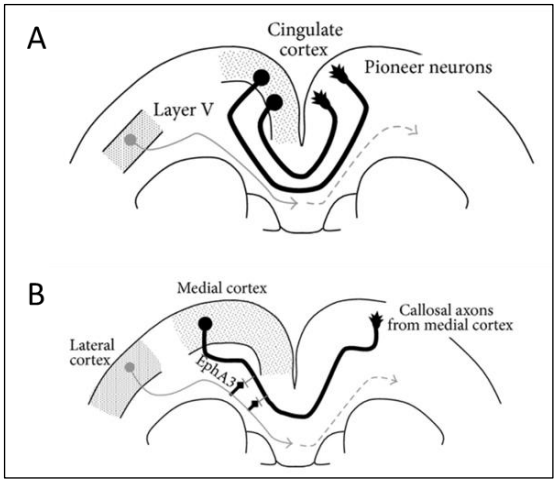


Figure 42 : Rôle des axones pionniers et des interactions axonales dans le développement du corps calleux chez la souris.
(A) Les axones callosaux des neurones pionniers issus du cortex cingulaire permettent de guider les axones callosaux issus des neurones de la couche corticale V. (B) Les axones callosaux issus des neurones de la partie médiane du cortex sécrètent Eph3A qui participe à la ségrégation dorso-ventrale des axones callosaux issus des parties médianes et latérales du cortex. Voir texte principal. (Nishikimi et al., 2013)

3. Développement des branches callosales intra-corticales dans la couche V

L'axone des neurones callosaux des couches corticales II/III projette des branchements collatéraux intra-corticaux dans les couches II/III et V (côté ipsilatéral) (**Figure 43**). Des travaux ont montré que les neurons callosaux établissent préférentiellement des synapses de type glutamatergiques excitatrices au niveau des dendrites apicales des neurones pyramidaux de la couche V (Anastasiades and Butt, 2012; Letzkus et al., 2006; Sjöström and Häusser, 2006).

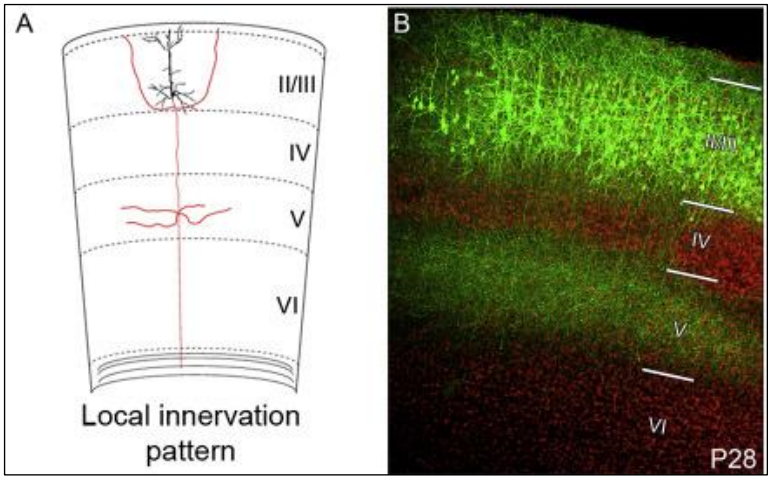


Figure 43 : Connexions intra-corticales établies par les neurones callosaux des couches corticales II/III dans la couche V.
(A) Schéma illustrant l'innervation locale des neurones de projection callosal des couches II/III. (B) Coupe coronale de cortex de souris à P28, dont les neurones de projection callosal sur-expriment la GFP (Hand et al., 2015).

L'étude de la propagation horizontale de l'activité synaptique chez la souris a révélé que la stimulation locale d'un petit point dans la couche II/III entraînait des activités synaptiques excitatrices et inhibitrices à la fois à gauche et à droite du point dans les couches II/III et V. Ces activités, qui se propagent dans la colonne activée et dans les colonnes adjacentes, se détériorent à mesure que la distance par rapport au point augmente. Ainsi, les neurones callosaux de la couche II/III possèdent une activité synaptique localisée qui s'étend sur quelques colonnes seulement (Adesnik and Scanziani, 2010).

Chez la souris, le branchement collatéral commence vers P3 et est correctement établi autour de P7 (Hand et al., 2015; Srivatsa et al., 2015). Les synapses contenant les récepteurs

glutamatergiques AMPA connectent les neurons callosaux et les neurons pyramidaux de la couche V à partir de P5, bien que la plupart des synapses neuronales demeurent silencieuses (Anastasiades and Butt, 2012). A partir de P7, les branches callosales intra-corticales se renforcent et le réseau intra-cortical est complètement mature vers P13. L'établissement des connexions intra-corticales dépends de l'identité neuronale du neurone pyramidal de la couche V (Anderson et al., 2010) et également de l'activité neuronale de celui-ci (Otsuka and Kawaguchi, 2008). En effet, les neurones positionnés dans la partie inférieure de la couche Va et supérieure de la couche Vb reçoivent de très nombreuses afférences (Anderson et al., 2010). Une étude a montré que le signal extracellulaire Shh, sécrété par les neurones pyramidaux de la couche V, était requis pour la formation des synapses et pour la croissance de leurs dendrites (Harwell et al., 2012). L'inactivation conditionnelle de *Shh* dans les cerveaux de souris, altère l'arborisation dendritique et la densité synaptique des neurones pyramidaux de la couche V uniquement. Les auteurs identifient le récepteur Boc, récepteur non-canonique au signal Shh, qui est exprimé par les neurones de projection callosal des couches II/III à partir de P4. Bien que les souris inactivées pour le récepteur Boc ne présentent pas d'anomalies de neurogenèse, de migration neuronale ou de guidance axonale, les auteurs observent une réduction de la complexité dendritique et de la densité des synapses des neurones de la couche V, alors que les neurones de projection callosal ne sont pas affectés. Ainsi, le signal Shh/Boc requis pour l'établissement de contacts synaptiques fonctionnels entre les neurones de projection callosal et les neurones pyramidaux de la couche V (Harwell et al., 2012).

Puisque les axones callosaux traversent la ligne médiane (vers P0) avant de commencer à brancher en ipsilatéral (vers P3), Hand et coll., ont suggéré qu'il était possible que des signaux extrinsèques provenant de la ligne médiane agissent rétro-graduellement pour induire la formation des branches collatérales. Leurs analyses chez la souris ont cependant révélé que l'initiation du branchement axonal ne requière ni la traversée de la ligne médiane par les axones, ni le branchement cortical en contralatéral (Hand et al., 2015). Ceci suggère que les facteurs régulateurs extrinsèques régulant la formation des branches, semblent synthétisés localement (au niveau de la couche V). Par ailleurs, bien que l'activité neuronale permette la maturation et la distribution du branchement callosal en contralatéral (Mizuno et al., 2007, 2010; Wang et al., 2007), Hand et coll., ont montré que celle-ci n'est pas impliquée dans la formation et la maintenance des branches collatérales (Hand et al., 2015).

De nombreuses études menées *in vitro* (dans des cultures de neurones hippocampiques) ont montré que la croissance des branches collatérales requière la réorganisation dynamique des cytosquelettes d'actine et de MTs au niveau des branches (Dent et al., 1999; Kalil and Dent, 2014). Le rôle du remodelage du cytosquelette et les protéines associées impliquées dans ces mécanismes demeurent peu étudiés *in vivo*. L'étude de la dynamique de la formation des branches collatérales *in vivo* a cependant confirmé que les protrusions (filopodes et lamellipodes) à l'origine des branches collatérales étaient enrichies en actine filamenteuse (Hand et al., 2015). Il par ailleurs été montré que la stabilisation du réseau de MTs était important pour la formation des branches callosales. En

effet, la déplétion de ninéine (protéine stabilisatrice du réseau de MTs) par EIU de shRNA, entraîne une diminution du branchement callosal dans la couche V (Srivatsa et al., 2015).

Outre le remodelage des cytosquelettes d'actine et de MTs, le transport intracellulaire de certains composants membranaires, de vésicules synaptiques ou encore d'organites, est indispensable à la génération et à la maturation des branches axonales collatérales. En effet, la dérégulation de la fonction de certaines kinésines (moteurs moléculaires impliqués dans le transport axonal) altère le branchement axonal *in vitro*, soulignant ainsi un rôle essentiel du trafic intracellulaire dans ce processus (voir Chapitre 2 II-C). Les kinésines sont impliquées dans le transport antérograde de nombreux cargos et organites au sein de l'axone. Parmi ces organites, les mitochondries sont des éléments clés dans la formation des points de branchement et dans l'élongation des branches (Courchet et al., 2013; Spillane et al., 2013; Tao et al., 2014). Le branchement axonal collatéral nécessite en effet la production d'ATP au niveau des points de branchement pour permettre la synthèse locale de protéines et la localisation des mitochondries est un prérequis à la formation de ces branches (Tao et al., 2014). Il a été montré que la voie de signalisation Lkb1/Nuak1 régulait l'immobilisation des mitochondries le long de l'axone des neurones corticaux et était indispensable à la formation des branches collatérales (Courchet et al., 2013). La délétion de la kinase *Lkb1* (ou bien de son effecteur *Nuak1*) augmente la mobilité des mitochondries dans l'axone et entraîne par conséquent la diminution du nombre de branches collatérales matures. En revanche, la surexpression de *Lkb1* ou *Nuak1* favorise l'immobilisation des mitochondries et promeut la formation et l'élongation des branches collatérales (Courchet et al., 2013). Il a également été suggéré que l'interaction ente le réticulum endoplasmique (RE) et les mitochondries pourrait participer à l'élongation et la stabilisation des branches collatérales. En effet, il a été observé que le RE s'accumule également à la base des branches axonales où il colocalise avec les mitochondries (Spillane et al., 2013).

4. L'agénésie du corps calleux (ACC)

L'agénésie du corps calleux (ACC) est l'une des malformations congénitales les plus communes qui conduit à l'absence complète ou partielle du corps calleux. L'ACC touche entre 0,5 et 70 enfants sur 10 000 et sa prévalence chez des enfants ayant des DI est d'environ 2,3% (M Das and Geetha, 2019). Les ACC sont diagnostiquées en prénatales par échographie pendant le 2ème trimestre de grossesse.

L'ACC peut être totale (absence de tout le corps calleux) ou partielle (absence d'un segment du corps calleux) et est due au fait que les axones (formés ou non) ne traversent pas la ligne médiane. Ces axones forment alors des faisceaux de fibres longitudinaux à la face interne des ventricules appelés « bandes de Probst » (Bénézit et al., 2015) et il en résulte ainsi une absence de connectivité contralatérale. Les axones peuvent également être déviés vers d'autres commissures que le corps calleux et ainsi correctement innerver l'hémisphère en contralatéral (Tovar-Moll et al., 2014).

Plusieurs facteurs environnementaux sont corrélés avec l'éthologie de l'ACC comme par exemple la consommation d'alcool durant la grossesse (Sowell et al., 2001). Concernant les facteurs génétiques à l'origine de l'ACC, les anormalités chromosomiques et les mutations géniques sont à l'origine de 45% des ACCs. Parmi les anomalies chromosomiques, on retrouve des anomalies du nombre de chromosomes (trisomie 18, 13 et 8) ou des anomalies de structure des chromosomes (délétions, insertions, remaniements complexes) qui sont généralement accompagnées d'autres malformations. Les méthodes actuelles d'exploration du génome (caryotype, exome…) permettent d'identifier une cause génétique dans 30 à 40% des cas.

L'ACC peut donc être isolée ou bien associée à d'autres malformations cérébrales et il existe plus de 200 syndromes congénitaux associés à une ACC (M Das and Geetha, 2019). Certains de ces syndromes sont identifiables avec un gène connu et ont un mode de transmission déterminé (autosomique dominant, récessif ou lié à l'X). Les patients affectés par une ACC associée présentent le plus souvent une DI, des problèmes de vision et des épilepsies (M Das and Geetha, 2019). En revanche, si l'ACC est isolée, le pronostic neuro-développemental est plus incertain : 70 à 80% des patients auront un développement normal, alors que 20 à 30% d'entre eux présenteront des troubles intellectuels plus ou moins sévères. Le pronostic des ACC isolées dépend alors de l'étiologie génétique. Bien que les formes isolées représenteraient environ 50% des cas d'ACCs les mécanismes précis qui conduisent à une ACC isolée ne sont pas encore déterminés.

Une étude récente menée chez 9 familles différentes a mis en évidence, et pour la première fois, des mutations dans le gène *DCC*, héritées de façon dominante chez des individus présentant une ACC isolée (Marsh et al., 2017) sans DI. *DCC* code pour une protéine réceptrice transmembranaire qui se lie à Nétrine-1 et dont le signal permet le remodelage du cytosquelette d'actine dans les axones au cours du guidage axonal lors de la formation du corps calleux. La découverte du gène *DCC* pourrait être utilisée dans le cadre du diagnostic prénatal, en permettant notamment de pronostiquer si l'enfant à naître va souffrir ou non d'une DI.

Les malformations callosales humaines sont diagnostiquées le plus souvent par des défauts structuraux de la ligne médiane au cours d'une échographie pendant la grossesse ou par IRM. Cependant, il existe d'autres malformations callosales qui impliquent des défauts structuraux moins sévères et plus subtils de la ligne médiane. Plusieurs études menées chez la souris montrent en effet que dans certains cas, les axones parviennent à traverser la ligne médiane mais ne projettent pas en contralatéral (Courchet et al., 2013; Lu et al., 2013; Rodríguez-Tornos et al., 2016; Zhou et al., 2013), ce qui suggère que des défauts callosaux dus à des défauts de projection en contralatéral peuvent être non diagnostiqués chez l'humain.

Chapitre 2 : Les kinésines et le développement cortical

Il existe trois familles de moteurs moléculaires qui utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP pour se déplacer: les myosines, les dynéines et les kinésines (**Figure 44**). Les **myosines** se déplacent le long des filaments d'actine tandis que les **dynéines** et **kinésines** se déplacent le long du cytosquelette de microtubules (MT). Les kinésines et les dynéines permettent le transport de divers cargos au sein de la cellule (comme par exemple des vésicules, organelles, protéines, organites, ARNm, éléments du cytosquelette etc…), en utilisant les MTs comme des « rails ». L'une des grandes différences entre les kinésines et les dynéines est le sens de transport : les dynéines se déplacent de façon rétrograde (de l'extrémité (+) vers l'extrémité (-) du MT) tandis que les kinésines se déplacent de façon antérograde (de l'extrémité (-) vers l'extrémité (+) du MT).

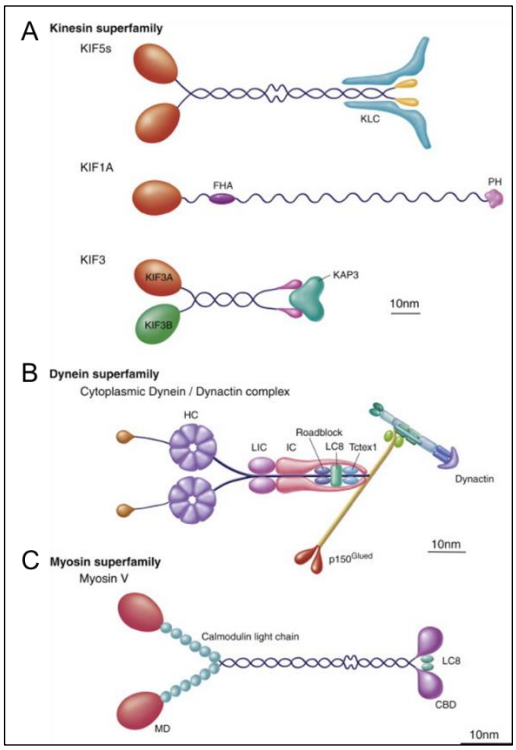


Figure 44 : Les différents types de moteurs moléculaires et leurs structures.
Il existe trois familles de moteurs moléculaires : les myosines, les dynéines et les kinésines. (A) La famille des kinésines : Kif5 (famille des kinésine-1) forment des tétramères composés de deux chaines lourdes de kinésines (KHC ou Kif5) qui se lient à deux protéines adaptatrices KLC (kinesin light chain). Kif1a exerce sa fonction sous forme monomérique. Kif3a et Kif3b forment un tétramère avec la protéine KAP3. (B) Les dynéines cytoplasmiques sont constitués de chaines lourdes (HC), de chaines intermédiaires (IC) et de chaines légères (LIC). La dynéine se lie au complexe protéique dynactine pour transporter les cargos. (C) La myosine-V est composée de deux chaines lourdes et le domaine « neck » de la myosine-V se lie aux chaines légères de calmoduline. La chaine légère 8 (LC8) se lie à la queue de la chaine lourde. (Hirokawa et al., 2010a)

I. Généralités sur les kinésines

A. Structure et familles des kinésines

En 1985, l'équipe de Ron Vale isole un nouveau type de moteur moléculaire à partir d'axones géants de calamars (Vale et al., 1985), qui plus tard sera identifié comme étant Kif5 (appartenant à la famille des kinésine-1). 45 gènes codant pour les kinésines chez les humains ont été identifiés, dont 38 sont exprimés dans le tissu nerveux (Hirokawa et al., 2010b; Miki et al., 2003) (**Figure 45**). Cependant, de multiples isoformes de kinésines peuvent être générés par épissage alternatif. Il

pourrait donc y avoir plus d'une centaine d'isoformes de kinésines différentes (Hirokawa et al., 2010b; Miki et al., 2003). De manière générale, les kinésines possèdent trois domaines distincts : 1) **un domaine moteur**, très conservé d'une kinésine à l'autre puisqu'il présente 30 à 60% d'homologie de séquence en acide aminé (aa), et qui contient le **domaine de liaison à l'ATP**. Le domaine moteur se lie généralement aux MTs et permet le déplacement de la kinésine le long du MT en utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse d'ATP ; 2) un **domaine central** coiled-coil (cc), qui est le plus souvent impliqué dans l'oligodimérisation des kinésines mais qui peut également lier les cargos (Peckham, 2011) et 3) un **domaine carboxy-terminal** (appelé « tail ») dont la structure varie d'une kinésine à l'autre et qui est le plus souvent impliqué dans la reconnaissance et la liaison des cargos.

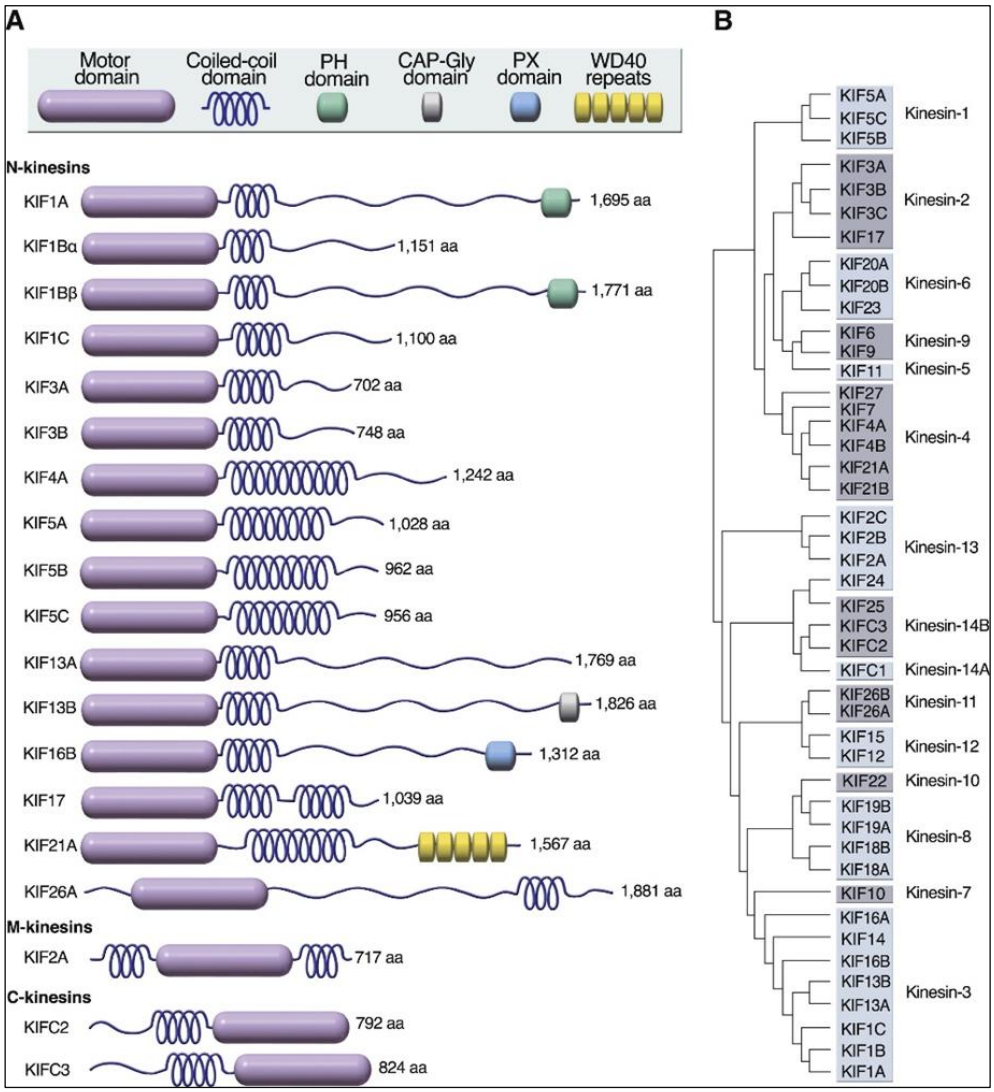


Figure 45 : Diversité des kinésines.
(A) Structure des principales kinésines. Les kinésines sont divisées en trois classes selon la position de leur domaine moteur (en violet) le long de la molécule : kinésine-N, kinésine-M et kinésine-C. Voir texte principal. (B) Arbre phylogénique des kinésines. Il existe 45 gènes codant pour les kinésines, dont 4 codant pour les kinésines-M (*Kif2a*, *Kif2b*, *Kif2c* et *Kif24*) et 3 codant pour les kinésines-C (*Kifc1*, *Kifc2* et *Kifc3*) (Hirokawa et al., 2010a).

Chez les mammifères tels que l'humain ou la souris, les kinésines sont regroupées en 15 familles suivant leur structure (Lawrence et al., 2004; Miki et al., 2001), qui sont elles-mêmes regroupées en trois classes selon la position de leur domaine moteur le long de la molécule (Dagenbach and Endow, 2004; Hirokawa, 1998) (**Figure 45 A**):

- Les **kinésines-N** sont les kinésines dites « conventionnelles » qui possèdent leur domaine moteur dans la partie amino-terminale et se déplacent le long des MTs de façon antérograde (de l'extrémité (-) vers l'extrémité (+)). Une étude récente a montré que, parmi les 45 membres identifiés, 23 kinésines au moins (toutes de type kinésine-N), participent au transport intracellulaire de cargos dans des cellules (Lipka et al., 2016).
- Les **kinésines-C** possèdent leur domaine moteur dans la partie carboxy-terminale et se déplacent généralement de façon rétrograde, comme les dynéines. Seulement trois gènes codant pour les kinésines-C ont été identifiés : *Kifc1*, *Kifc2*, et *Kifc3*.
- Les **kinésines-M** possèdent un domaine moteur dans la partie interne. Les kinésines-M appartiennent à la superfamille des kinésines-13 dont il existe 4 membres chez les mammifères : Kif2a, Kif2b, Kif2c (également appelé MCAK) et Kif24. Les kinésines-M sont des kinésines particulières qui dépolymérisent les MTs de façon ATP-dépendante et ne sont pas impliquées dans le transport intracellulaire.

La plupart des kinésines forment des **oligodimères** par leur domaine central coiled-coil (cc). Les kinésines-1 par exemple (la famille de kinésine la plus étudiée) forment des tétramères composés de deux chaines lourdes (KHC, kinesin heavy chain) et de deux chaines légères (KLC, kinesin light chain) (Vale et al., 1985) (**Figure 44 A**). Certaines kinésines-2 forment des hétérotrimères composés de deux sous unités motrices (kif3a et Kif3b) et d'une protéine adaptatrice associée aux kinésines KAP3 (Hirokawa et al., 2010b) (**Figure 44 A**). Les kinésines Kif21a et Kif21b (de la famille des kinésines-4) forment des homodimères *in vitro*, mais ne dimérisent pas entre elles (Marszalek et al., 1999). Cependant, il est important de noter que toutes les kinésines n'oligodimérisent pas pour se déplacer le long des MTs. Le domaine moteur de Kif1a par exemple se déplace sous forme monomérique le long des MTs (Okada and Hirokawa, 1999) (**Figure 44 A**). Ce déplacement est cependant assez lent (0,15µm/s) et la liaison de 10 moteurs Kif1a permet d'augmenter la vitesse de déplacement de la kinésine de 100 fois (Oriola and Casademunt, 2013). *In vivo* en revanche, il semblerait que Kif1a soit dimérisée et activée par la liaison à son cargo (Hammond et al., 2009).

Les kinésines conventionnelles (type N) se déplacent le long des MTs selon un modèle appelé « hand-over-hand » dans lequel, une fois attachée aux MTs, les deux domaines moteurs de se déplacent l'un après l'autre en effectuant chacun un « pas » de 8 nanomètres (Svoboda et al., 1993). À chaque pas, la kinésine dépense l'énergie apportée par la liaison puis l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (Coy et al., 1999). Ce mécanisme nécessite un couplage étroit entre les cycles

biochimiques des deux moteurs afin que le moteur avant reste lié au MT pendant que le moteur arrière se détache.

Le cycle de déplacement d'une kinésine le long d'un protofilament de MT se déroule comme ceci (Gennerich and Vale, 2009) : en l'absence de MT, chaque sous-unité motrice d'un dimère piège une molécule ADP. La liaison de l'un des moteurs (moteur A) au MT dissocie l'ADP, tandis que l'autre moteur (moteur B) est toujours lié à l'ADP et détaché du MT. La kinésine est alors immobile. La liaison d'une molécule d'ATP au moteur A, attaché au MT, permet un changement conformationnel qui favorise alors la fixation du moteur B en avant du MT. Une fois fixé au MTs, l'ADP se dissocie du moteur B et la fixation d'une molécule d'ATP est alors autorisée. Pendant ce temps, le moteur A hydrolyse la molécule d'ATP en ADP. Le moteur A, alors lié à l'ADP, se détache du MT. Une molécule d'ATP se fixe ensuite au moteur B, permettant alors la fixation du moteur A sur le MT et un nouveau cycle démarre.

B. Fonctions générales des kinésines dans les neurones

1. Régulation du transport intracellulaire

Les neurones sont des structures hautement polarisées dont les prolongements (axones et dendrites) sont fonctionnellement et morphologiquement différents. L'établissement et le maintien de cette polarité requiert des mécanismes efficaces pour faciliter le transport et la livraison de cargos spécifiques dans chacun de ces compartiments. L'organisation du réseau de MTs est cruciale pour un transport de cargos efficace. Comme décrit en chapitre 1 (§ IV-B-4), l'orientation des MTs diffèrent entre les axones et les dendrites : au sein des axones, l'extrémité (+) pointe en direction de la terminaison axonale tandis que dans les dendrites, l'orientation des MTs est mixte avec une abondance équivalente entre les MTs aux extrémités (+) qui pointent vers l'extérieur et les MTs aux extrémités (+) qui pointent vers le soma (Tas et al., 2017). Au sein des neurones, le transport antérograde est médié généralement par les kinésines-N tandis que le transport rétrograde est permis par les kinésines-C et les dynéines cytoplasmiques. De manière générale au sein des axones, les organelles membranaires sont transportés de façon rapide (50 à 200 mm/jour) tandis que les protéines cytoplasmiques telles que la tubuline ou les neurofilaments sont transportés de façon lente (0,1 à 3 mm/jour) (Terada, 2003). Ces deux modes de transport (lent et rapide) sont permis par les kinésines-N.

Bien qu'il existe des redondances fonctionnelles entre les membres d'une même famille, chaque kinésine lie des cargos différents et de façon spécifique et permet le transport de ces cargos soit dans l'axone, soit dans les dendrites. Seulement 5 kinésines (Kif1a, Kif1b et Kif1c, de la famille des kinésines-3 et Kif21a et Kif21b, de la famille des kinésines-4) seraient impliquées dans le transport intracellulaire de cargos dans les deux compartiments (Lipka et al., 2016). Par ailleurs, les autres kinésines de ces familles (Kif13a/b, Kif16b, Kif4a/b) semblent participer au transport intracellulaire uniquement dans l'axone. Ainsi, au sein d'une même famille, les kinésines peuvent avoir des propriétés et des localisations différentes (Lipka et al., 2016). Il est cependant essentiel de

noter que dans leur étude, les auteurs ont utilisé un système artificiel dans lequel l'interaction entre un cargo (dans ce cas, le péroxysome) et une kinésine est forcé. Par ailleurs, les auteurs utilisent des kinésines tronquées chez lesquelles il manque une partie du domaine coiled-coil et le domaine carboxy-terminal. Bien que ceci implique que le domaine moteur et le domaine coiled-coil semblent suffisants pour permettre le transport de cargos dans les neurones, cela n'exclut pas que d'autres mécanismes additionnels, qui requièrent la présence du domaine carboxy-terminal, soient impliqués dans le transport. En effet, les auteurs montrent que l'ensemble des 23 kinésines testées permettent un transport intracellulaire dans l'axone, et aucune d'entre elles n'est spécifique du compartiment dendritique, ce qui va à l'encontre de résultats précédemment publiés pour les kinésines Kif11 (Ferhat et al., 1998) et Kif17 (Guillaud et al., 2003). Par ailleurs, les domaines coiled-coil et carboxy-terminal sont impliqués dans l'auto-inhibition des kinésines, un mécanisme essentiel à la régulation de la motilité des kinésines (voir § c)

a. Régulation de l'attachement/détachement des cargos

Généralement, les kinésines s'associent à leurs cargos par l'intermédiaire de **protéines adaptatrices,** mais certaines kinésines sont capables de s'associer directement à leurs cargos. Ces protéines adaptatrices sont indispensables pour la liaison des kinésines à leurs cargos et peuvent être également impliquées dans la vitesse de leur déplacement. Le détachement des cargos est quant à lui régulé par trois mécanismes majeurs qui sont la phosphorylation de la kinésine, le contrôle par les petites protéines GTPase et le signal calcique (Hirokawa et al., 2010b).

Dans l'axone par exemple, la famille des **kinésines-3** (Kif1a et Kif1b) permet le transport des vésicules pré-synaptiques par l'intermédiaire de protéines adaptatrices appelées MADD (mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activating death domain) et la petite GTPase Rab3 (Niwa et al., 2008). Rab3 est présente à la surface des vésicules synaptiques. La forme Rab3-GTP est maintenue pendant tout le transport axonal grâce au complexe DENN-MADD qui se comporte comme une GEF. Puis l'activation de GAP responsable de la forme Rab3-GDP entraîne la dissociation de la vésicule (**Figure 46 A**). Outre la liaison au cargo, les protéines adaptatrices peuvent également être impliquées dans la régulation de la vitesse de déplacement des kinésines. Par exemple, l'interaction de Kif1a monomérique avec la protéine adaptatrice liprin-α augmente également la mobilité de Kif1a le long des MTs (Okada et al., 2003).

Les 3 membres de la famille des **kinésines-1** (KIF5A, KIF5B et KIF5C) forment également des complexes avec d'autres protéines adaptatrices telles que JIP (JNK-interacting protein), APP (Amyloid precursor protein) et ApoER2 (apolipoprotein E receptor 2) (Hirokawa et al., 2010b). Le fait que ces kinésines de la même famille n'interagissent pas toutes avec les mêmes protéines adaptatrices permet le transport de nombreux cargos différents comme les vésicules pré-synaptiques, les ARNm ou encore les mitochondries. Par exemple, il a été montré chez la drosophile que le transport des mitochondries par les kinésines-1 est médié par le complexe protéique Milton-Miro et contrôlé par le signal calcique (Stowers et al., 2002; Wang and Schwarz, 2009). Les

mitochondries sont retrouvées dans les régions cellulaires riches en calcium. Un modèle a été proposé pour expliquer la régulation du recrutement des mitochondries dans ces régions. Lorsque le complexe KIF5-Milton-Miro-Mitochondie lié aux MTs arrive dans une région riche en calcium, la liaison du calcium à Miro conduit à un changement de conformation du complexe et permet le détachement du complexe des MTs, permettant ainsi de stopper le transport mitochondrial (**Figure 46 B**) (Wang and Schwarz, 2009). Les protéines adaptatrices Trak1 et Trak2 sont les homologues de Milton chez les mammifères et sont exprimées dans les axones et dans les dendrites respectivement. Il a été montré que ces protéines interagissent avec Kif5c et permettent le transport des mitochondries dans des cultures primaires de neurones de souris (van Spronsen et al., 2013). Outre les kinésines-1, Kif1bα est également impliquée dans le transport des mitochondries au sein de l'axone. Bien que Kif1bα soit capable de se lier aux mitochondries sans protéines intermédiaires, il a été montré que la liaison de KPB (kinesin binding protein) à Kif1bα permet d'augmenter la mobilité de Kif1bα *in vivo* et *in vitro* (Wozniak et al., 2005).

Kif17, localisée dans les dendrites, permet le transport d'une sous-unité du récepteur au glutamate NMDA par l'intermédiaire du complexe protéique formé par les protéines LIN. Il est connu que la phosphorylation des kinésines peut contrôler l'association ou la dissociation avec le cargo. Dans le cas de KIF17, il a été montré que la calmoduline kinase II (CamKII) empêche sa liaison avec une l'adaptateur LIN-10, menant à une dissociation de la vésicule contenant la sous unité NRB2 du récepteur NMDA (**Figure 46 C**) (Guillaud et al., 2008).

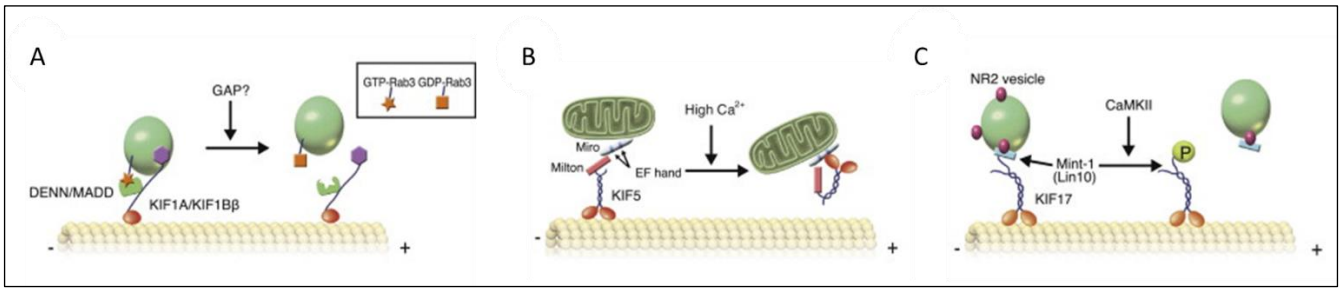


Figure 46 : Régulation de la liaison kinésine-cargos pat trois mécanismes différents.
(A) la protéine GTPase Rab3, (B) le signal calcique et (C) la phosphorylation de la kinésine. Voir texte principal. Adapté de (Hirokawa et al., 2010a).

b. Régulation de l'attachement aux MTs

Le réseau de MTs sur lequel les kinésines se déplacent n'est pas uniforme. En effet, différentes isoformes de tubulines et de MAPs sont exprimées suivant le type cellulaire, et les tubulines α et β peuvent également être soumises à des modifications post-traductionnelles. Les kinésines sont connues pour être sensibles à ces changements de compositions en tubulines et en MAPs.

Les **modifications post-traductionnelles** des tubulines jouent un rôle dans la stabilité du réseau de MTs mais agissent également comme des signatures pour la fixation spécifique de certaines kinésines. Par exemple, la polyglutamylation des tubulines α sur leur extrémité carboxy-

terminale est abondante dans les axones et dans les dendrites. Il a été montré que la perte de fonction de PGs1 (Phosphatidylglycerophosphate Synthase 1, sous unité du complexe de polyglutamylation de la tubuline α) chez la souris, entraîne une diminution de la kinésine **Kif1a** dans les neurites et une diminution de la densité des vésicules synaptiques (transportées par Kif1a) au niveau des terminaisons synaptiques (Ikegami et al., 2007). En revanche, les auteurs observent que la distribution des kinésines Kif3a et Kif5 n'est pas altérée suggérant que la fixation aux MTs de ces kinésines est régulée par des modifications différentes (Ikegami et al., 2007). En effet, il a été montré que **Kif5** (kinésine-1) se lie préférentiellement aux MTs acétylés dans les cellules COS-7 (Reed et al., 2006). Une autre étude suggère que la tyrosination de la tubuline dans les axones maintient l'attachement de Kif5 aux MTs dans ce compartiment et l'empêche d'aller dans le compartiment dendritique (Konishi and Setou, 2009). Cependant, la régulation de l'affinité de Kif5 aux MTs via les modifications post-traductionnelles des tubulines est sujet à controverse puisqu'il a été montré que la localisation de Kif5 dans les axones était indépendante des niveaux de modifications de la tubuline (Hammond et al., 2010).

Des études de mobilité *in vitro* ont cependant permis de confirmer que les modifications post-traductionnelles ainsi que les différentes isoformes des tubulines jouaient un rôle dans la régulation de l'attachement du domaine moteur des kinésines aux MTs et pouvaient gouverner la vitesse, la processivité et la dynamique de dépolymérisation des MTs. Il a été montré que le domaine moteur de Kif5 se déplaçait moins vite le long de MTs détyrosinés comparé à des MTs tyrosinés (Dunn et al., 2008; Kaul et al., 2014), tandis que l'acétylation de la tubuline- α ne semble pas avoir d'effet sur ces paramètres (Kaul et al., 2014). Une autre étude a montré que la mobilité des kinésines-1 (Kif5) est augmentée lorsque la tubuline-β (Tubb3) est polyglutaminée, tandis que les kinésines-13 et les dynéines sont insensibles à cette modification (Sirajuddin et al., 2014). Les auteurs observent également que la processivité des kinésines-2 est augmentée par les chaines de polyglutamates retrouvées sur la tubuline-α tyrosinée. Les effets de ces modifications pourraient être expliqués par les interactions électrostatiques entre les domaines moteurs des kinésines et la partie carboxy-terminale modifiée des tubulines. Une étude a en effet montré que l'altération de la charge du domaine amino-terminal de Kif5 pouvait augmenter ou diminuer la processivité du moteur (Thorn et al., 2000). La charge positive due à l'acétylation de la tubuline-α (Tubb3) diminue en effet la processivité de Kif5 mais le phénotype est sauvé par la polyglutamylation, ce qui supporte l'hypothèse selon laquelle les interactions électrostatiques régulent la processivité de kif5 (Sirajuddin et al., 2014). Les modifications post-traductionnelles semblent donc importantes pour la régulation du transport des cargos, mais les effets *in vivo* de ces modifications pourraient être plus complexes que les effets observés *in vitro*. En effet, comparés aux MTs synthétisés *in vitro*, les MTs neuronaux *in vivo* sont très hétérogènes et composés de différents isotypes de tubulines et de modifications post-traductionnelles.

Une étude récente menée sur des cultures de neurones a permis de mieux comprendre le rôle de ces modifications post-traductionnelles sur le transport sélectif dendritique *versus* axonal

(Tas et al., 2017). Au sein des dendrites, les MTs dont les extrémités (+) pointent vers l'extérieur sont plus dynamiques, tandis que ceux dont les extrémités (+) sont dirigés vers le soma sont plus stables et acétylés (Tas et al., 2017). Les auteurs ont montré que Kif5 (qui permet le transport des cargos dans les axones et dans les dendrites) se lie préférentiellement aux MTs acétylés, qui sont ceux dont les extrémités (+) pointent vers le soma. Au contraire, la kinésine-3 (qui est spécifique du compartiment dendritique) se lie préférentiellement aux MTs dont les extrémités (+) pointent vers l'extérieur (Tas et al., 2017), ce qui pourrait expliquer pourquoi elle reste dans le compartiment dendritique mais aussi pourquoi elle s'accumule aux extrémités dendritiques.

Outre les modifications post-traductionnelles, les **protéines associées** aux MTs (MAPs) ont également été impliquées comme régulant le recrutement des kinésines aux MTs. De nombreuses études se sont focalisées sur le rôle de Tau dans la régulation du transport médié par les kinésines au sein des neurones, puisque la surexpression de Tau inhibe le transport antérograde médié par les kinésines-1 (Ebneth et al., 1998; Stamer et al., 2002). En effet, des études *in vitro* ont montré que la surexpression de Tau altère sa distribution dans l'axone et conduit à l'accumulation des cargos des kinésines-1 dans le soma. Par ailleurs, Tau diminue également l'affinité des kinésines pour les MTs causant ainsi leur détachement des MTs (Dixit et al., 2008; Seitz et al., 2002). *In vivo*, le rôle de Tau dans la régulation de distribution des kinésines reste assez peu connu. L'étude des souris inactivées pour *Tau*, ou bien surexprimant la version humaine du gène *Tau*, ne présentent pas d'altérations majeures du transport médié par les kinésines, dans les axones (Yuan et al., 2008), suggérant ainsi qu'il existe des mécanismes de compensation. Il est possible que MAP1b puisse compenser l'absence de Tau, puisque les souris doublement inactivées pour *MAP1b* et *Tau* présentent une sévère altération du développement neuronal, de la morphologie et de la fonction neuronale (Takei et al., 2000). Cependant, d'autres études sont nécessaires pour s'assurer du rôle réel de Tau dans la régulation de la distribution des kinésines *in vivo*.

Dcx (Doublecortine) et Dclk (Doublecortin-like kinase) pourraient également être impliquées dans la régulation de la distribution des cargos transportés par les kinésines. Deuel et coll. ont, en effet, montré que les souris doublement mutées pour *Dcx* et *Dclk*, présentent une altération de la distribution des vésicules synaptiques VAMP2 (vesicle-associated membrane protein 2) et synaptophysine ; en plus des défauts de migration et d'axogenèse (Deuel et al., 2006). Dans les cultures de neurones hippocampiques inactivés pour *Dcx* par ARN interférent, les vésicules synaptiques s'accumulent dans le soma, au lieu d'entrer dans l'axone, suggérant ainsi une altération de la distribution des vésicules (Deuel et al., 2006). Par ailleurs, bien que la structure globale du réseau de MT paraisse normale, les auteurs observent une diminution de la longueur de l'axone en l'absence de *Dcx* ou de *Dclk* (Deuel et al., 2006). Liu et coll. ont montré que Kif1 et Dcx interagissaient *in vivo* dans le cerveau de souris (Liu et al., 2012). Dans des cultures de neurones inactivées pour *Dclk*, ou bien déplétées pour *Dcx*, les auteurs observent une distribution anormale des mitochondries et des vésicules VAMP2/Kif1 dans le soma (Liu et al., 2012). Ces défauts de

distribution sont sauvés par la surexpression de la forme sauvage de Dcx. Puisque les auteurs n'observent pas d'altérations dans les modifications post-traductionnelles connues des tubulines, ni de défaut de localisation d'autres MAPs, ils concluent que Dcx et Dclk régule spécifiquement la distribution des moteurs Kif1 et de leurs cargos associés dans les axones (Liu et al., 2012). Une étude récente a montré par ailleurs que Dclk1 promeut la mobilité et le transport sélectif des vésicules par **Kif1** dans les dendrites des neurones moteurs (Lipka et al., 2016).

En 2017, Gumy et coll. ont montré que l'inhibition de *MAP2* dans les neurones perturbe le trafic et la distribution de multiples vésicules normalement restreintes au corps cellulaire (Gumy et al., 2017). La régulation du transport axonal des cargos par MAP2 est médiée par son interaction avec la kinésine **Kif5** et est donc indépendante de son rôle connu dans la stabilisation des MTs. En se liant à Kif5, MAP2 inhibe son activité motrice dans le segment initial (AIS, axon initial segment ; localisé dans la partie proximale de l'axone) et permet une distribution homogène des vésicules par d'autres kinésines comme **Kif1**. La perte de fonction de MAP2 lève l'inhibition de Kif5 et conduit ainsi à l'accumulation des cargos dans le segment initial par Kif5 (Gumy et al., 2017).

Un autre exemple de MAP impliquée dans la régulation du transport par les kinésines est MAP7, connue pour stabiliser le réseau de MTs. MAP7 est capable d'interagir directement avec Kif5 et favorise son attachement aux MTs. Deux études récentes ont en effet montré le rôle positif de MAP7 sur l'attachement de Kif5 (famille des kinésines-1) aux MTs et le transport des organelles (Chaudhary et al., 2019; Hooikaas et al., 2019). Des analyses de mobilité *in vitro* montrent que MAP7 n'a pas d'effets sur la force motrice exercée par Kif5 le long des MTs, mais qu'elle augmente en revanche son taux de fixation (Chaudhary et al., 2019). Alors que MAP7 régule positivement le transport intracellulaire médié par Kif5, elle inhibe en revanche l'attachement de Kif1a aux MTs et n'a pas d'effet sur la dynéine cytoplasmique (Monroy et al., 2018) ce qui suggère que MAP7 contrôle différemment les différentes classes de moteurs moléculaires.

Enfin, MAP6 a récemment été montrée comme permettant le transport des mitochondries dans l'axone en favorisant le mouvement de **Kif5b** (Tortosa et al., 2017). MAP6 pourrait être un cofacteur requis pour le transport dépendant de Kif5b ou bien recruter des protéines motrices vers les MTs. Une autre possibilité est que la liaison de MAP6 aux MTs axonaux induise des changements de conformation qui favorisent le mouvement de Kif5b dans l'axone (Tortosa et al., 2017).

Outre leurs fonctions dans la régulation de l'attachement des kinésines aux MTs, l'ensemble de ces modifications post-traductionnelles et les MAPs pourraient contrôler la **distribution différentielle des kinésines** dans les différents compartiments neuronaux (**Figure 47**). Ces différents processus agiraient donc de concert sur chaque kinésine pour contrôler efficacement leur attachement aux MTs, leur déplacement le long des MTs et ainsi la distribution des cargos dans les compartiments appropriés.

Il existe cependant d'autres mécanismes permettant de contrôler l'attachement des kinésines aux MTs comme la phosphorylation par exemple : en effet, la phosphorylation du domaine moteur de **Kif5** par la kinase JNK3 (c-Jun NH_2-terminal kinase 3) inhibe son association avec les MTs (Morfini et al., 2009).

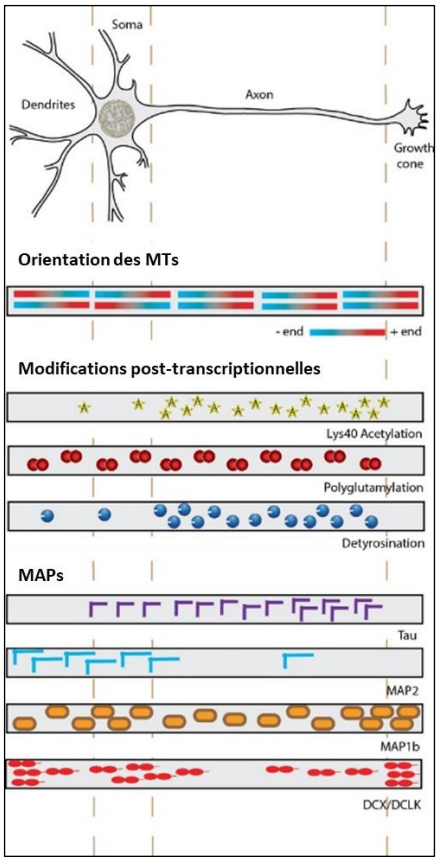


Figure 47 : La polarité du réseau de MTs, les modifications post-traductionnelles et les MAPs sont distribuées de façon hétérogène dans les différents compartiments neuronaux.
Les marques d'acétylation de la Lysine-40 et de détyrosination sont retrouvées préférentiellement dans le compartiment axonal, tandis que les marques de polyglutamylation sont présentes dans tout le neurone. Ces trois modifications post-traductionnelles sont cependant absentes du cône de croissance. La protéine Tau est préférentiellement localisée dans l'axone, mais pas dans le cône de croissance, tandis que MAP2 se retrouve dans le soma, le segment initial et les dendrites. Dcx et Dclk sont enrichies dans les terminaisons axonales et dendritiques, mais sont également présentes dans le reste des compartiments neuronaux (Atherton et al., 2013).

Le filtrage sélectif opéré par le **segment initial** (AIS, axon initial segment) est également un autre mécanisme permettant le contrôle de la distribution spécifique des kinésines dans les différents compartiments neuronaux. Le segment initial, localisé dans la partie proximale de l'axone constitue une barrière intracellulaire qui empêche les protéines du soma ou des dendrites d'entrer dans l'axone (Leterrier, 2016). La protéine Ankirine-G est le marqueur de l'AIS et est indispensable au maintien de cette structure : elle est requise pour l'initiation du potentiel d'action et permet également de lier les cytosquelettes d'actine et de MTs aux protéines transmembranaires de l'AIS formant ainsi le filtre. Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer comment les cytosquelettes d'actine et de MTs et les moteurs moléculaires coopèrent pour permettre un filtrage sélectif des cargos dans l'AIS. Comme décrit précédemment, la protéine MAP2 est localisée spécifiquement dans l'AIS, où elle contrôle l'entrée des vésicules provenant du soma vers l'axone et leur distribution le long de l'axone (Gumy et al., 2017).

Une étude récente a montré comment l'AIS permettait d'empêcher Kif17 de pénétrer dans l'axone (Franker et al., 2016) (**Figure 48**). Kif17 est une kinésine qui régule le transport de cargos au sein des dendrites et qui doit donc demeurer dans le compartiment dendritique et ne pas entrer dans l'axone. Dans le soma, Kif17 se lie à son cargo mais ne se dirige pas automatiquement vers

les dendrites. Au lieu de cela, Kif17 se dirige vers l'AIS où elle est stoppée par les filaments d'actine. La dynéine se lie alors à Kif17 et la redirige vers les dendrites (Franker et al., 2016).

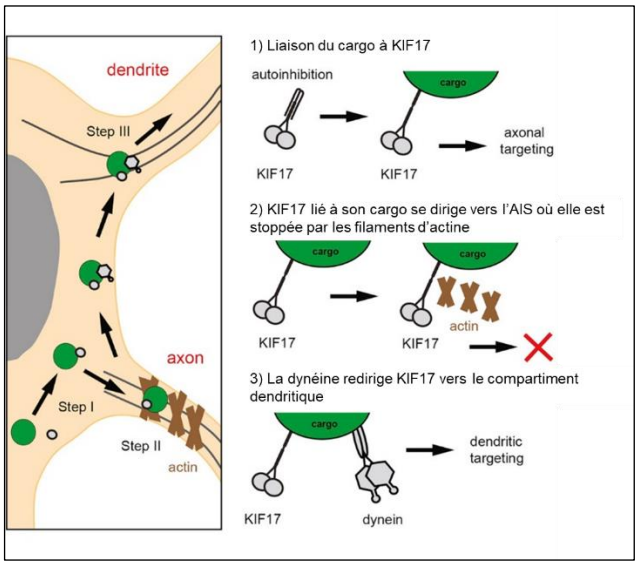


Figure 48 : Mécanisme de filtrage sélectif opéré par le segment initial pour empêcher l'entrée de Kif17 dans le compartiment axonal.
Modèle proposé par (Franker et al., 2016).

c. L'auto-inhibition

i. Mécanismes de l'auto-inhibition

Plusieurs travaux de caractérisation biochimique ont montré que les kinésines existent sous deux conformations au sein de la cellule : une forme repliée **inactive** et une forme dépliée **active**. L'inactivation d'une kinésine se fait par un mécanisme d'auto-inhibition, qui est crucial pour la cellule, parce qu'en l'absence de cargo, l'activité motrice des kinésines doit être précisément régulée pour empêcher la consommation inutile d'ATP et également éviter d'encombrer les MTs (Verhey and Hammond, 2009).

L'auto-inhibition de la kinésine-1 se fait par fixation d'une séquence régulatrice conservée, présente dans son domaine carboxy-terminal (tail), à une séquence appelée « switch » présente dans son domaine moteur. L'interaction de ces deux séquences empêche ainsi la kinésine-1 de se fixer aux MTs (**Figure 49 A**) (Dietrich et al., 2008). La kinésine-1 inactive est alors libre dans le cytoplasme. Outre le mécanisme d'auto-inhibition, les auteurs suggèrent également que le domaine carboxy-terminal pourrait interagit simultanément avec le domaine moteur et les MTs. Cette double interaction permettrait à la kinésine de faire des pauses lors de son déplacement le long des MTs (Dietrich et al., 2008). Un second niveau d'auto-inhibition existe pour la kinésine-1 via la sous-unité KLC. KLC empêche la liaison des deux domaines moteurs, et donc la fixation de la kinésine-1 sur les MTs (**Figure 49 A**) (Cai et al., 2007).

La caractérisation structurale de kinésine-1 a permis de mieux comprendre comment fonctionne ce mécanisme d'auto-inhibition. L'analyse des structures des deux domaines (carboxy-terminal et moteur) a révélé que l'auto-inhibition de kinésine-1 est permise par un mécanisme de double verrouillage (double-lockdown) (Kaan et al., 2011). Dans ce mécanisme, le domaine carboxy-terminal forme plusieurs liaisons chimiques tridimensionnelles avec les domaines moteurs et coiled-

coil (cc). Ce mécanisme inhibe ainsi complètement le mouvement des domaines moteurs et donc le déplacement de la kinésine le long des MTs. Ce double verrouillage permis par des interactions à deux positions différentes est nécessaire pour l'auto-inhibition (les auteurs montrent que la seule interaction du domaine carboxy-terminal au domaine moteur ne suffit pas) (Kaan et al., 2011).

Kif1a (Unc104 chez *C. elegans*) est également inactivée par un mécanisme d'auto-inhibition (Al-Bassam et al., 2003; Hammond et al., 2009; Lee et al., 2004; Okada et al., 1995). L'interaction entre le domaine cc-2 et les motifs FHA (forkhead-associated, un domaine retrouvé chez de nombreuses protéines et impliqué dans l'interaction protéique) de Kif1a contribuent à inhiber la capacité de Kif1a à dimériser et donc diminue son affinité pour les MTs (Hammond et al., 2009; Lee et al., 2004) (**Figure 49 A**). Kif1a ainsi inhibée est retrouvée sous la forme d'un monomère en solution.

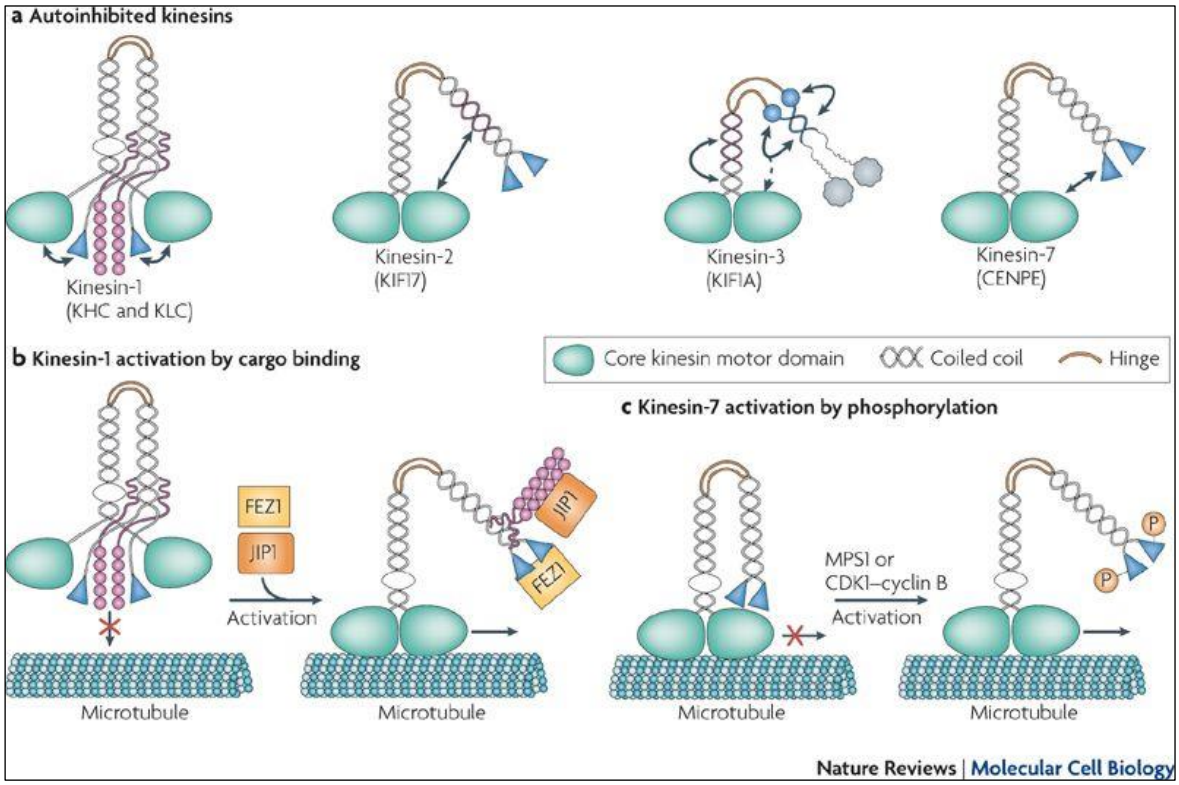


Figure 49 : Exemples de mécanismes de l'auto-inhibition des kinésines.
(A) Les kinésines-1, la kinésine KIF17 et la kinésine KIF10 (CenpE) adoptent une conformation repliée inactive dans laquelle le domaine central coiled-coil régulateur (en gris) interagit avec le domaine moteur (en vert), ce qui empêche leur fixation au réseau de MTs. Kif1a adopte également une structure repliée mais qui est plus compacte et plus globulaire. Les doubles flèches indiquent les régions qui interagissent entre elle dans la forme inactive et les flèches pointillées indiquent les possibles sites d'interaction avec les MTs (en bleu) et les domaines qui inhibent la processivité (en rose). (B) L'auto-inhibition des kinésines-1 est levée par l'interaction avec deux protéines adaptatrices FEZ1 (fasciculation and elongation protein-ζ1) et JIP1 (Jun N-terminal kinase-interacting protein 1), ce qui permet alors sa fixation sur le cytosquelette de MTs. (C) L'auto-inhibition de Kif10 (CenpE) est levée par phosphorylation du domaine carboxy-terminal inhibiteur par les kinases MPS1 (monopolar spindle protein 1) et CDK1(cyclin-dependent kinase 1)–cycline B. (Verhey and Hammond, 2009).

Cette auto-inhibition de la capacité à dimériser est également retrouvée chez les kinésines **Kif13b** et **Kif16** (Soppina et al., 2014). Chez ces kinésines, la région centrale située en aval du

domaine cc-2 interagit directement avec le domaine moteur et empêche leur dimérisation et donc l'attachement de ces kinésines aux MTs (Farkhondeh et al., 2015; Yamada et al., 2007). Par ailleurs, en plus de l'inactivation du domaine moteur, le domaine neck de ces kinésines est également inactivé par interaction avec le domaine cc-1. Une étude structurale récente menée sur les kinésines-3 a permis de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents impliqués dans l'auto-inhibition de cette famille de kinésines (Ren et al., 2018). Les auteurs ont ainsi analysé la structure de la forme inactive (repliée) du monomère formé par les domaines moteur/neck/coiled-coil (cc) de Kif13b et ont mis en évidence une structure particulière du domaine cc-1. Les auteurs identifient la présence de deux hélices α particulières (appelées a et b) dans le domaine cc-1, qui interagissent simultanément avec le domaine neck et le domaine moteur. Les auteurs mettent également en évidence deux sites particuliers dans le domaine moteur nécessaires à cette interaction (Ren et al., 2018). La levée de l'auto-inhibition de ces kinésines (Kif1a, Kif13b et Kif16) implique leur dimérisation en solution. D'autres kinésines en revanche, restent dimérisées lorsqu'elles sont inactives, comme par exemple Kif1c (Siddiqui et al., 2019). La levée de l'auto-inhibition se fait alors généralement par liaison au cargo ou à une protéine adaptatrice spécifique (voir § iii).

Kif21a est une kinésine de la famille des kinésines-4 qui partage 61% d'homologie de séquence en acide aminés avec **Kif21b** (Marszalek et al., 1999). Tout comme Kif21b, Kif21a possède trois domaines fonctionnels : un domaine moteur dans la partie amino-terminale, qui se fixe aux MTs et permet le transport intracellulaire, 3 domaines cc centraux contenant un domaine de régulation de l'auto-inhibition dans le domaine cc-3 (appelé rCC, regulatory coiled-coil domain) et un domaine WD-40 en carboxy terminal, composé d'une séquence consensus Tryptophane-Acide aspartique répétée 7 fois (Marszalek et al., 1999). Kif21a adopte une conformation auto-inhibée qui requière l'interaction du domaine rCC avec le domaine moteur. La levée de l'auto-inhibition de Kif21a, permet à Kif21a de se lier aux MTs (Cheng et al., 2014).

ii. Rôles de l'auto-inhibition dans la fonction cellulaire

Bien que les études *in vitro* aient montré que l'auto-inhibition joue un rôle crucial dans le contrôle de la fonction motrice des kinésines, les rôles cellulaires de l'auto-inhibition demeurent encore méconnus. Jusqu'à présent, le mécanisme d'auto-inhibition a été montré comme impliqué dans plusieurs processus cellulaires tels que la régulation du transport axonal de cargos (Moua et al., 2011; Niwa et al., 2016), la synaptogenèse (Niwa et al., 2016), la morphologie du cône de croissance et le guidage axonal (Cheng et al., 2014; van der Vaart et al., 2013), ainsi que la localisation spécifique de certains cargos dans les dendrites et l'arborisation dendritique (Kelliher et al., 2018).

Niwa et coll., montrent que des mutations faux-sens dans le domaine d'auto-inhibition de la kinésine Unc-104 (homologue de **Kif1a** chez *C. elegans*), augmentent la fixation de Unc-104 aux MTs et conduisent à une activation excessive *in vivo* (Niwa et al., 2016). Cette sur-activation a pour

conséquence une diminution du nombre et de la taille des synapses dendritiques et une localisation aberrante des vésicules synaptiques dans les dendrites.

Plusieurs études menées sur la kinésine **Kif21a** semblent également aller dans ce sens. Kif21a est connue pour être impliquée dans la fibrose congénitale des muscles oculomoteurs de type 1 (CFEOM1) qui limite le mouvement des yeux chez les individus atteints. De nombreuses mutations faux-sens ainsi que des délétions à l'état hétérozygote ont été identifiées dans les différents domaines de *KIF21A* (Ali et al., 2014; Chen et al., 2016; Liu et al., 2014; Ramahi et al., 2018; Yamada et al., 2003). Les souris mutées pour l'une des mutations faux-sens, qu'elles soient homozygotes ($Kif21a^{KI/KI}$) ou hétérozygotes ($Kif21a^{KI/+}$), récapitulent le phénotype humain de la maladie, avec une pénétrance de 92% et 43% respectivement (Cheng et al., 2014). En revanche, les souris inactivées pour *Kif21a* (*Kif21a*$^{-/-}$, qui n'expriment pas Kif21a) ne présentent pas de phénotype. Ces résultats suggèrent que la mutation à un effet gain de fonction. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que ces mutations faux-sens atténuent la fonction auto-inhibitrice de KIF21A en diminuant l'affinité du domaine moteur avec le domaine d'auto-inhibition central (rCC) (Bianchi et al., 2016; Cheng et al., 2014; van der Vaart et al., 2013). Comme décrit plus bas, Kif21a est une kinésine qui possède une activité stabilisatrice du réseau de MTs *in vitro* (Cheng et al., 2014; van der Vaart et al., 2013). Van der Vaart et coll., ont montré que les mutations (qui lèvent l'auto-inhibition de KIF21A), augmentent l'activité stabilisatrice de KIF21A dans des cultures de neurones et conduit à des défauts de morphologie et de guidage axonal (axones plus courts et plus branchés). Ce phénotype pourrait être à l'origine des anomalies d'innervation observés dans la maladie CFEOM1 (van der Vaart et al., 2013). En revanche, la levée de l'auto-inhibition n'affecte pas sa vitesse ou sa processivité le long des MTs, suggérant que le transport de cargos n'est pas impacté. Ainsi, l'atténuation de l'auto-inhibition par les mutations du ou des domaines impliqués dans le repliement de KIF21A, conduit à l'hyperactivation de la fonction stabilisatrice des MTs par KIF21A et au phénotype (Cheng et al., 2014; van der Vaart et al., 2013).

Comme décrit plus haut, les modifications post-traductionnelles et les MAPs permettent de contrôler, au moins en partie, la distribution des kinésines dans les différents compartiments neuronaux appropriés. Une étude menée *in vivo* chez la Drosophile, a récemment montré que la fonction auto-inhibitrice de la kinésine-1 jouait également un rôle dans sa localisation au sein du neurone (Kelliher et al., 2018). Les auteurs ont montré qu'une mutation spécifique d'un résidu glutamate (E177K) dans le domaine moteur de la kinésine-1, conduit à l'accumulation anormale des vésicules excrétées du Golgi (« Golgi outputs ») et également de la kinésine-1 dans les axones (qui sont normalement localisés dans les dendrites). Ceci a pour conséquence une altération de l'arborisation dendritique. Les auteurs montrent que la mutation E177K lève l'auto-inhibition de la kinésine-1, et entraîne une hyper-activation de son activité motrice *in vitro*. De façon intéressante, l'expression du mutant E177K qui est incapable d'hydrolyser l'ATP (donc immobile), n'entraîne plus le phénotype, ce qui indique que la mutation a pour effet un gain de fonction sur l'activité motrice. L'inhibition de la kinésine-1 par ARN interférent conduit cependant aux mêmes défauts que

l'expression de la mutation E177K. Ceci suggère que la régulation de l'activité de la kinésine-1 est cruciale pour la localisation des vésicules excrétées du Golgi et de la kinésine-1 dans les dendrites, et pour la morphogenèse neuronale (Kelliher et al., 2018).

D'autres études ont montré que des mutations faux-sens dans les domaines impliqués dans l'auto-inhibition n'entraînent pas toujours une sur-activation de la fonction motrice des kinésines *in vivo*. *In vitro*, la kinésine-1 est inactivée via l'interaction d'une séquence spécifique située en carboxy-terminale (le motif IAK) avec le domaine moteur (Cai et al., 2007; Dietrich et al., 2008). Moua et coll., ont identifié et étudié l'effet *in vivo* de diverses mutations faux-sens, retrouvées dans le motif IAK, sur le transport intracellulaire chez la Drosophile (Moua et al., 2011). De façon surprenante, les auteurs montrent que, *in vivo*, les mutations dans les motifs IAK inhibent le transport axonal des mitochondries médié par la Kinésine-1, ce qui suggère que ces mutations ont pour conséquence d'altérer (plutôt que de sur-activer) la fonction de transport de la Kinésine-1. Cependant, les conséquences de ces mutations sur le repliement de la kinésines n'ont pas été explorées. On ne sait donc pas si ces mutations lèvent l'auto-inhibition de la kinésine-1.

Ces résultats ont également été observés chez d'autres kinésines comme par exemple la kinésine OSM-3 (homologue de la Kinésine-2 chez C. elegans), impliquée dans le transport intra-flagellaire au niveau du cil. *In vitro*, une mutation faux-sens dans le domaine central de OSM-3 (qui inhibe les interactions entre le domaine carboxy-terminal et le domaine moteur) a été montré comme sur-activant la processivité de OSM-3 le long des MTs, suggérant ainsi une sur-activation de la fonction motrice de la kinésine, lorsque l'auto-inhibition est altérée (Imanishi et al., 2006). Chez *C.elegans*, la surexpression de cette même mutation conduit au même phénotype que celui observé chez le mutant nul, ce qui suggère que la mutation conduit à une perte de fonction de la kinésine (Imanishi et al., 2006; Snow et al., 2004). Les auteurs proposent deux mécanismes pour expliquer comment une perte d'auto-inhibition pourrait conduire à un phénotype de mutant nul. Premièrement, le mutant constitutivement actif pourrait être incapable de lier certains cargos. Deuxièmement, ce mutant hyper-processif pourrait ne pas être correctement délivré dans le cil.

Les conséquences de l'altération de la fonction d'auto-inhibition varient d'une kinésine à l'autre. La levée de l'auto-inhibition peut affecter le transport (Imanishi et al., 2006; Moua et al., 2011) ou la distribution de cargos (Kelliher et al., 2018), ou au contraire n'avoir aucun effet sur celui-ci (van der Vaart et al., 2013). L'ensemble de ces études montrent que l'auto-inhibition, et plus généralement l'équilibre entre la forme active et inactive des kinésines, est cruciale pour la régulation de l'activité des kinésines et pour la fonction cellulaire.

iii. Levée de l'auto-inhibition

La plupart des kinésines sont activées suite à la liaison de leur cargo ou d'une protéine adaptatrice. C'est le cas par exemple pour OSM-3/**Kinésine-2** et **Kif13b** (famille des kinésines-3)

(**Figure 49 B**), activées par interaction directe avec les protéines DYF-1 et Dlg respectivement (Ou et al., 2005; Yamada et al., 2007). Il a également été montré que la liaison de JIP1 et de FEZ1 (deux protéines adaptatrices) à la kinésine-1 suffit à activer le domaine moteur de la kinésine et sa liaison aux MTs (Blasius et al., 2007) (**Figure 49 B**). Une autre étude montre que la protéine phosphatase PTPN21 (Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 21) se lie à la région centrale de **Kif1c** et permet l'activation du transport des cargos par Kif1c. L'activation de Kif1c est également permise par la protéine adaptatrice Hook3 qui se fixe à la même région que PTPN21 (Siddiqui et al., 2019). Enfin, les protéines adaptatrices JIP1 et JIP3 coopèrent pour lever l'auto-inhibition de la kinésine-1 en permettant la fixation de TrkB (le récepteur au BDNF) à la kinésine-1, et donc assurent le transport antérograde du récepteur TrkB dans les axones (Sun et al., 2017b).

Outre la liaison aux cargos ou aux protéines adaptatrices, la phosphorylation joue également un rôle important dans la levée de l'auto-inhibition. Par exemple, la phosphorylation de la partie carboxy-terminale de kinésine **Kif10** (également connue sous le nom de CenpE (centromere protein E)) par l'enzyme CDK1-cyclin B permet l'activation de la kinésine (Espeut et al., 2008) (**Figure 49 C**).

2. Rôles des kinésines sur la dynamiques des MTs

Des études récentes ont montré que certaines kinésines étaient également impliquées dans la régulation de la dynamique des MTs en plus de leur rôle dans le transport intracellulaire, et que ces fonctions sur le cytosquelette de MT étaient essentielles à la fonction cellulaire. Les kinésines ont des effets variés sur le cytosquelette de MT. Certaines kinésines ont des activités de dépolymérisation ou de stabilisation du cytosquelette tandis que d'autres favorisent la polymérisation et la stabilité du cytosquelette.

Par exemple, les kinésines **Kif19a** et **Kif18a** sont impliquées dans la dépolymérisation du cytosquelette de MTs (Mayr et al., 2007; Niwa et al., 2012). Il a été montré que la fonction dépolymérase de Kif19a, localisée au niveau du cil primaire, permettait de contrôler la longueur du cil en dépolymérisant les MTs aux extrémités (Niwa et al., 2012). Par ailleurs, il a été montré que l'activité de dépolymérisation de Kif18a participe à l'alignement et à la séparation des chromosomes lors de la division cellulaire en jouant sur les taille des MTs localisés au niveau des kinétochores (Mayr et al., 2007). Les **kinésines-13** (Kif2a, Kif2b, Kif2c/MCAK et Kif24) sont une famille de kinésines particulières qui ne sont pas impliquées dans le transport intracellulaire mais qui utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse d'ATP pour déstabiliser et induire la dépolymérisation des MTs en augmentant la fréquence des catastrophes à partir des deux extrémités (Desai et al., 1999; Helenius et al., 2006; Hunter et al., 2003; Kinoshita et al., 2006; Moore et al., 2005). Les kinésines-13 ont été largement décrites pour leur rôle dans le cycle cellulaire notamment dans la formation du fuseau mitotique. Outre ses fonctions dans le cycle cellulaire, la fonction de dépolymérisation de Kif2a est également impliquée dans le désassemblage du cil primaire et est essentielle au développement cortical (voir § II).

Au contraire des kinésines dépolymérisantes, **Kif21a** a été montré comme réduisant la polymérisation des MTs en inhibant la catastrophe des MTs *in vitro* et en empêchant la croissance des MTs à l'extrémité cellulaire (cortex cellulaire) (Cheng et al., 2014; van der Vaart et al., 2013). Van de Vaart et Coll., ont montré que Kif21a est recrutée aux cônes de croissance par la protéine KANK1 et les protéines liprin-α1/β1. Les auteurs montrent que les mutations associées à la maladie CFEOM1, qui lèvent l'inhibition de Kif21a, résultent d'une accumulation de Kif21a dans les cônes de croissance. Ainsi, l'augmentation de l'activité stabilisatrice des MTs par Kif21a conduit à la l'apparition d'axones plus courts et plus branchés, un phénotype qui pourrait être à l'origine des défauts d'innervation observés dans la maladie. Par ailleurs, les cônes de croissance sont plus petits et moins réceptifs à la molécule de guidage Sema3F, importante pour le développement oculomoteur. Ainsi, l'accumulation de la forme mutée de Kif21a dans les cônes de croissance conduit à la dérégulation de la dynamique des MTs et est associée à des défauts de morphologie et de guidage axonal (van der Vaart et al., 2013).

II. Fonctions des kinésines au cours du développement cortical

Les kinésines sont des moteurs moléculaires qui permettent le transport intracellulaire de nombreux cargos et vésicules le long des MTs mais qui contrôlent également l'organisation et la dynamique des MTs au sein des axones et des dendrites. De nombreuses études récentes ont montré que les kinésines étaient impliquées dans pratiquement toutes les étapes du développement cortical, à savoir le contrôle de la ciliogenèse, les divisions des progéniteurs et la neurogenèse, l'établissement de la polarité neuronale, la migration des neurones, la croissance axonale et dendritique et le branchement collatéral (**Figure 50**). Notons que les kinésines, comme par exemple Kif1a, jouent également un rôle dans la synaptogenèse, (Kern et al., 2013; Kondo et al., 2012; Niwa et al., 2016), qui ne sera pas détaillé dans cette partie.

Par ailleurs, des mutations dans les kinésines sont retrouvées chez des individus présentant différentes anomalies neuro-développementales telles que des malformations du développement cortical (microcéphalies, polymicrogyries, pachygyries, lissencéphalies), des défauts de formation du corps calleux, des ciliopathies, de l'épilepsie et de la déficience intellectuelle (DI). Ceci souligne ainsi le rôle essentiel de ces moteurs moléculaires dans le développement du cerveau. Cependant, bien que l'implication de ces variants dans ces maladies ait été démontrée, les mécanismes physiopathologiques conduisant aux phénotypes demeurent encore en grande partie méconnus.

Dans cette partie je présenterai plusieurs études récentes qui mettent en évidence le rôle clé de plusieurs kinésines dans le développement cortical (**Figure 50**) et les mécanismes identifiés. L'ensemble des kinésines citées dans cette partie et impliquées dans les maladies neuro-développementales sont répertoriées dans le **tableau 2**, à la fin de cette partie.

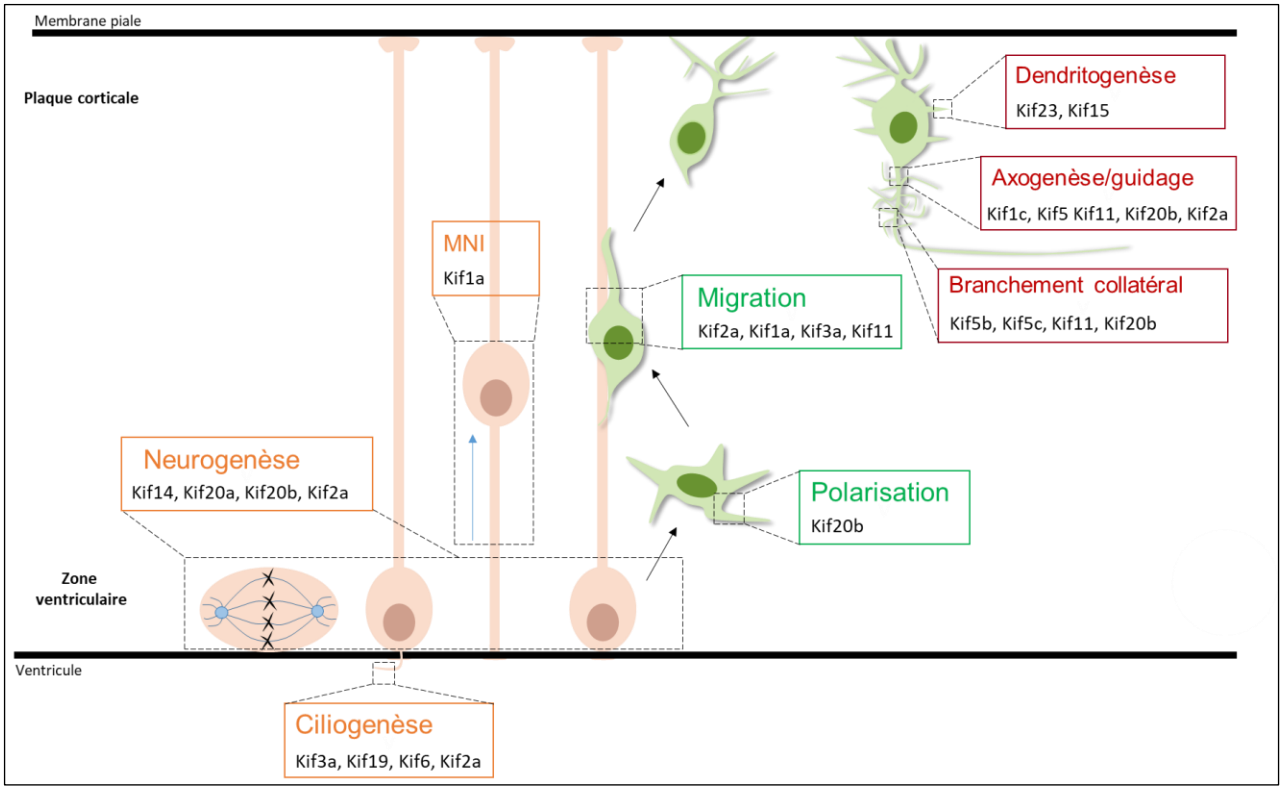


Figure 50 : Schéma récapitulatif des kinésines impliquées dans le développement cortical.
Fonctions basées sur des études menées sur des cultures de neurones primaires ou bien sur des modèles souris ou rat. MNI, migration nucléaire intercinétique.

A. Régulation de la neurogenèse

a. La migration nucléaire intercinétique

La migration nucléaire intercinétique (MNI) est un mécanisme caractéristique des cellules NE et GRa au cours duquel le noyau des cellules effectue une migration apico-basale en phase G1, puis migre vers le pôle apical en phase G2 avant de se diviser au pôle apical en phase M (voir chapitre 1, § III-B).

Tsai et son équipe ont montré que durant la phase G1, la migration basale du noyau est permise par la kinésine **Kif1a** (de la famille des kinésines-3) qui déplace le noyau de l'extrémité (-) vers l'extrémité (+) des MTs (Tsai et al., 2010). A l'inverse, durant la phase G2, le moteur moléculaire dynéine et la protéine associée aux MTs Lis1 permettent de transporter le noyau vers la région apicale en le déplaçant de l'extrémité (+) vers l'extrémité (-) des MTs (Hu et al., 2013b; Tsai et al., 2010) (**Figure 51**). Contrairement à la phase G2, les mécanismes moléculaires impliqués dans la migration basale lors de la phase G1 sont cependant sujet à controverse. Kosodo et son équipe ont proposé que la migration basale du noyau lors de la phase G1 pouvait être due à un déplacement passif du noyau (Kosodo et al., 2011). Pour montrer cela, ils ont introduit des billes fluorescentes magnétiques dans la ZV de coupes organotypiques de cerveau de souris et ont observé que ces billes avaient un mouvement apico-basal, mais qu'elles ne présentaient pas de migration baso-apicale une fois la membrane basale atteint. Outre ce rôle passif, une autre étude a montré que la

myosine II était requise pour la migration basale, mettant en avant le rôle du cytosquelette d'acto-myosine (Schenk et al., 2009).

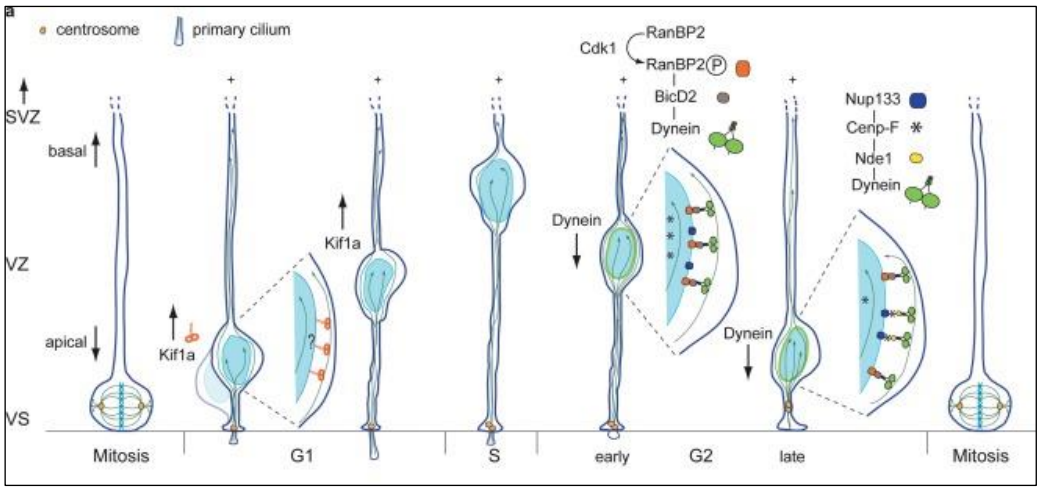


Figure 51 : Régulation de la migration nucléaire intercinétique par les moteurs moléculaires Kif1a et dynéine.
Les cellules gliales radiaires sont des cellules polarisées dont le centrosome (en orange) est localisé à la surface apicale et dont la plupart des microtubules ont leur extrémité (+) orientée vers la surface basale. La migration du noyau vers la surface piale est permise par la kinésine KIF1A qui déplace le noyau de l'extrémité (-) vers l'extrémité (+) des MTs. A l'inverse, la dynéine et Lis1 transportent le noyau vers la région apicale en le déplaçant de l'extrémité (+) vers l'extrémité (-) des MTs. Bien que le recrutement de Kif2a à l'enveloppe nucléaire demeure inconnu, deux mécanismes ont été proposés pour expliquer le recrutement de la dynéine à l'enveloppe nucléaire durant la phase G2. Ces mécanismes impliquent les nucléoporines RanBP2 et Nup133 localisées sur l'enveloppe nucléaire (Hu et al., 2013b) et la kinase Cdk1 (Baffet et al., 2015). Dans un premier temps (phase G2 précoce), RanBP2 recrute la protéine adaptatrice BicD2, qui en retour recrute la dynéine, la dynactine et la protéine associée aux MTs Lis1. Puis, durant les derniers micromètres de la migration du noyau (phase G2 tardive), la protéine CENP-F (Centromere protein F) se lie à Nup133 à la surface de l'enveloppe nucléaire et le complexe recrute alors Nde1 et Ndel1 qui recrutent à leur tour la dynéine et la dynactine. (Bertipaglia et al., 2018).

b. Les divisions symétriques/asymétriques et devenir cellulaire

La régulation du devenir cellulaire est permise par le type de division (symétrique ou asymétrique) des progéniteurs. Les divisions symétriques permettent d'augmenter la population de progéniteurs tandis que les divisions asymétriques permettent la différentiation des progéniteurs en neurones (voir chapitre 1, § III-B).

Kif20a (également connue sous le nom de MKLP2) et **Kif20b** sont deux kinésines appartenant à la famille des kinésines-6 et étant impliquées dans la cytokinèse (dernière étape de la mitose permettant la séparation des deux cellules filles) au cours de laquelle elles facilitent l'assemblage du midbody (Gruneberg et al., 2004; Janisch et al., 2013). Outre leurs fonctions dans la cytokinèse, ces deux kinésines jouent un rôle crucial au cours de la neurogenèse. La perte d'expression de *Kif20b* chez la souris conduit à une microcéphalie (réduction de l'épaisseur corticale) bien que la structure laminaire reste préservée (Janisch et al., 2013). Les auteurs montrent que cette malformation est due à une altération de la neurogenèse causée par une cytokinèse anormale (Janisch et al., 2013). Outre son rôle dans la cytokinèse, une étude récente a montré que

Kif20a régule également le mode de division des progéniteurs au cours du développement cortical (Geng et al., 2018). La diminution de l'expression de *Kif20a* par EIU de sh-RNA dans les progéniteurs conduit à la différentiation précoce des progéniteurs en neurones ce qui suggère que Kif20a favorise le maintien de l'état prolifératif des progéniteurs. Le fait que l'inhibition de Kif20a conduise à une différenciation précoce des progéniteurs, sans affecter la progression de la division cellulaire montre que cette kinésine joue deux rôles distincts au cours de la division. Dans un premier temps, Kif20a permet la formation du midbody et la progression de la cytokinèse ; puis dans un deuxième temps, la fonction kinésine de Kif20a contrôle la distribution des composants cellulaires entre les deux cellules filles, permettant ainsi une division symétrique ou asymétrique de la cellule (Geng et al., 2018) (**Figure 52**).

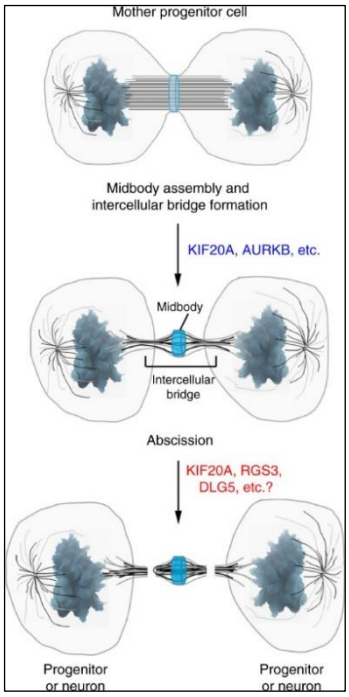


Figure 52 : Fonctions de Kif20a durant la division des progéniteurs neuraux.
Dans le modèle proposé par Geng et coll., les auteurs proposent deux rôles séquentiels de Kif20a au cours de la division des progéniteurs. Dans un premier temps, Kif20a permet la formation du midbody et la progression de la cytokinèse en facilitant la translocation de Aurora B (AURKB) dans le midbody. Kif20a joue également un rôle dans la détermination du destin cellulaire et est essentielle au maintien de l'état prolifératif des progéniteurs. Cette fonction de Kif20a a lieu au cours de l'abscission de la cellule et pourrait dépendre de l'interaction de Kif20a avec les protéines RGS3 et DGL5. Par sa fonction motrice, Kif20a contrôlerait donc la distribution des composants cellulaires entre les deux cellules filles (Geng et al., 2018).

Tout comme Kif20a et b, **Kif14** est également impliquée dans la cytokinèse au cours de laquelle elle permet le recrutement de la protéine kinase CITK (Citron kinase) (Arora et al., 2014), une kinase ayant un rôle majeur dans la cytokinèse et dont différentes mutations ont été retrouvées chez des individus atteints de microcéphalie (D'Avino, 2017). La perte de fonction de *Kif14* chez la souris conduit à une microcéphalie et à un retard de croissance (Fujikura et al., 2013). Plusieurs mutations dans le gène *KIF14* ont récemment été identifiées chez plusieurs patients atteints de microcéphalie associée ou non à de la DI (Makrythanasis et al., 2018a; Moawia et al., 2017; Reilly et al., 2018) (**tableau 2**). Les auteurs montrent un défaut de localisation de KIF14 et de CIT-K au niveau du midbody dans des fibroblastes de patients, suggérant que la microcéphalie pourrait être causée par une cytokinèse anormale des progéniteurs (Moawia et al., 2017). Des mutations faux-sens ont également été retrouvées dans les gènes KIF1A (Esmaeeli Nieh et al., 2015) et KIF23 (Karaca et al., 2015) chez des sujets atteints de microcéphalie et de retard développementaux.

c. Ciliogenèse et neurogenèse

Le cil primaire est un organite sensoriel présent à la surface de la membrane apicale des cellules NE et GRa qui permet de capter différents signaux extracellulaires présents dans le liquide cérébrospinal. Le cil primaire se forme à partir du centrosome, et ces deux composants semblent jouer un rôle particulièrement important dans la détermination cellulaire (voir chapitre 1, § III-B-3-c).

Kif2a, kinésine appartenant à la famille des kinésines-13 (qui permet la dépolymérisation des MTs), a été montrée comme étant impliquée dans la régulation de la prolifération des progéniteurs corticaux (Sun et al., 2017a) et la ciliogenèse (Broix et al., 2018; Miyamoto et al., 2015). La diminution de l'expression de *Kif2a* par EIU de sh-RNA diminue en effet la prolifération des progéniteurs corticaux et promeut également la différenciation neuronale. Miyamoto et coll ont décrit le rôle 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 dépolymérase des MTs de Kif2a est nécessaire au désassemblage du cil primaire et également pour la répression d'une ciliogenèse aberrante pendant le cycle cellulaire. Par ailleurs, l'expression des variants humains *KIF2A* impliqués dans les MDCs conduit à des altérations de la ciliogenèse et de la prolifération des progéniteurs neuronaux (Broix et al., 2018). Kif2a étant un régulateur clé dans le désassemblage du cil primaire via son activité depolymérase (Miyamoto et al., 2015), les défauts de prolifération observés pourraient donc être dus à des défauts dans la progression de la mitose ainsi que dans le couplage entre le cil primaire et le cycle cellulaire (Broix et al., 2018; Miyamoto et al., 2015).

Au contraire de Kif2a**, Kif3a** est une kinésine qui permet la formation du cil primaire présent à la surface des cellules NE, GRa et des neurones (Chen et al., 2019). Plusieurs études ont montré que l'inhibition conditionnelle de l'expression de *Kif3a* dans les progéniteurs altère la formation du cil primaire et conduit à des défauts de progression du cycle cellulaire responsables de diverses anomalies morphologiques chez l'embryon (agrandissement des ventricules latéraux, diminution de l'épaisseur corticale) (Chen et al., 2019; Foerster et al., 2017), mais également à des défauts de migration radiaire et de différenciation neuronale (Chen et al., 2019).

Chez l'humain, des mutations dans des gènes impliqués dans l'assemblage du cil primaire sont responsables de ciliopathies comme par exemple le syndrome de Joubert ou le syndrome de Bardet-Biedl. Les individus atteint de ciliopathies présentent le plus souvent une hydrocéphalie et/ou des syndromes acro-calleux associés à de l'épilepsie et à différents troubles neurologiques (Louvi and Grove, 2011). Bien que des mutations dans *KIF3A* n'aient pas été découvertes chez les patients, des mutations dans ***KIF7*** (Karaer et al., 2015; Putoux et al., 2011; Tunovic et al., 2015) et ***KIF14*** (Filges et al., 2014) ont été retrouvées chez des individus présentant des ciliopathies caractérisées par une agénésie du corps calleux, des anomalies cranio-faciales mineures et une hydrocéphalie, associées ou non à une mégalencéphalie, un retard de développement et de l'épilepsie dans le cas de *KIF7* (Ali et al., 2012; Dafinger et al., 2011; Tunovic et al., 2015) (**tableau 2**).

Une mutation tronquante dans le gène ***KIF6*** a récemment été identifiée chez un individu atteint de DI et de mégalencéphalie (augmentation de la taille du cerveau) (Konjikusic et al., 2018)

(**tableau 2**). Afin d'identifier les mécanismes pathologiques, les auteurs ont généré une souris knock-in génétiquement modifiée portant la mutation dans le gène *Kif6* et ont montré des défauts de formation du cil des cellules épendymaires (qui bordent les ventricules cérébraux et produisent et font circuler le liquide cérébro-spinal) associés à une hydrocéphalie.

Kifc1 est une kinésine de type C, dont le domaine moteur est situé en carboxy-terminal et qui se déplace de façon rétrograde le long des MTs (She and Yang, 2017). Kifc1 est connue pour son rôle dans la division cellulaire des cellules non neuronales, au cours de laquelle elle participe à la nucléation des MTs en recrutant le complexe γ-TuRC au niveau des pôles cellulaires (She and Yang, 2017). Cependant, son rôle éventuel dans les progéniteurs neuronaux et dans la neurogenèse reste à prouver.

B. Régulation de la migration neuronale

Outre son rôle dans la MNI des progéniteurs (Tsai et al., 2010), **Kif1a** est également impliquée dans la migration neuronale et la transition multipolaire à bipolaire (Carabalona et al., 2016). Les auteurs ont montré que le défaut de migration observé après inhibition de *Kif1a* par EIU de shRNA, 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). Par ailleurs, des mutations faux-sens apparaissant *de novo* dans le domaine moteur de *KIF1A* ont été retrouvées chez différents individus présentant une pachygyrie frontale (circonvolutions cérébrales trop épaisses et trop peu nombreuses), un épaississement du corps calleux et une réduction de la substance blanche (Jamuar et al., 2014), des déficits cognitifs (Lee et al., 2015) et de la DI (Hamdan et al., 2011; Ohba et al., 2015). DCX étant essentielle pour la fonction de Kif1a dans les neurones (Liu et al., 2012), les auteurs proposent que la mutation dans *KIF1A* pourrait affecter l'interaction entre KIF1A et DCX et conduire au phénotype (Jamuar et al., 2014). La surexpression de ce variant dans les progéniteurs de rat conduit en effet à un défaut de MNI basale et de migration radiaire qui est similaire à ceux observés lors de l'inhibition de *Kif1a* ou de *DCX* par ARN interférence (Carabalona et al., 2016).

Des mutations dans les kinésines ***KIF5C*** et ***KIF2A*** ont également été retrouvées chez des patients présentant des malformations du développement cortical (MDC) complexes associées à des anomalies de la gyration telles que des lissencéphalies, des polymicrogyries et des pachygyries (Cavallin et al., 2016, 2017; Jamuar et al., 2014; Poirier et al., 2013b) (**tableau 2**). **Kif2a** est enrichie dans les cônes de croissance des neurones ou elle est requise pour l'élongation et le guidage de l'axone vers sa cible en supprimant l'apparition de ramifications axonales collatérales (Homma et al., 2003; Maor-Nof et al., 2013). *In vivo*, la perte de fonction de *Kif2a* chez la souris conduit à une dérégulation des ramifications de l'axone qui est conséquente à une sur-extension des ramifications collatérales (Homma et al., 2003). En plus des défauts de ciliogenèse et de prolifération, Broix et coll., ont montré que l'expression des variants humains *KIF2A* conduisent à des altérations variées

du développement cortical tels qu'une altération de la migration des neurones de projection et des interneurones et une altération de la différenciation axonale (Broix et al., 2018).

Kif11 (aussi connue sous le nom de Eg5) permet la polymérisation des MTs 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 *Kif11* dans des cultures de neurones en migration entraîne une augmentation de la vitesse de migration associée à une réduction de la taille du processus antérieur (futur axone). En revanche, la surexpression de *Kif11 in vivo* par EIU à E14,5 mène à une altération de la migration radiaire due à la réduction de la vitesse de migration des neurones.

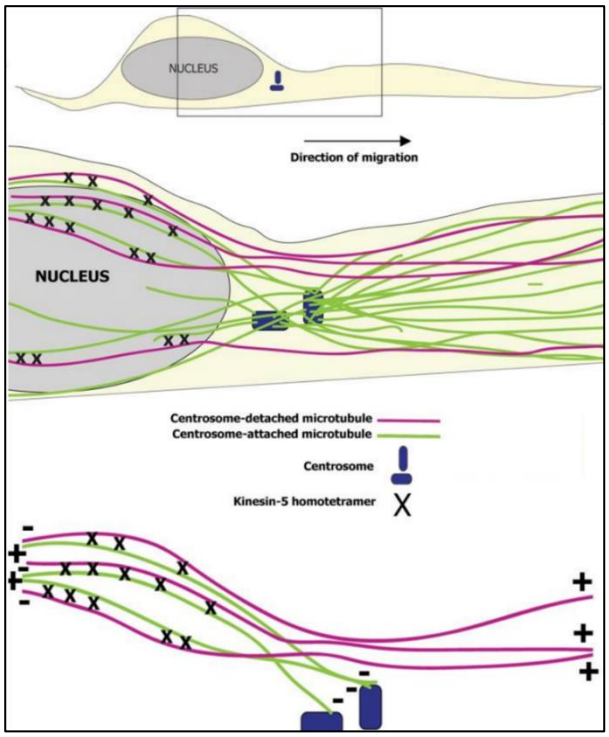


Figure 53 : Régulation de la migration neuronale par Kif11 (kinésine-5).
Dans le prolongement guide des neurones en migration, les microtubules attachés (lignes vertes) et non attachés (lignes magenta) au centrosome s'organisent de manière antiparallèle à l'arrière du centrosome. Les kinésines-5 forment des homotétramères (croix noires) qui régulent la vitesse de la migration neuronale en générant des forces faibles opposées à la dynéine cytoplasmique au niveau des microtubules antiparallèles (Falnikar et al. 2011).

Kif11 est une kinésine qui se déplace lentement le long des MTs, comparé à la dynéine par exemple (Kapitein et al., 2005). Les auteurs ont proposé que Kif11 agit comme un frein via l'interaction entre deux microtubules afin de moduler le mouvement du réseau de microtubules dans le processus antérieur (Falnikar et al., 2011) (**Figure 53**). Outre son rôle dans la migration neuronale, Kif11 est également impliquée dans l'axogenèse, le branchement collatéral et le guidage axonal (voir paragraphe suivant).

C. Régulation de l'axogenèse, de la guidance axonale et de la formation des branches axonales collatérales

La polarisation du neurone est une étape essentielle du développement cortical au cours de laquelle le neurone immature acquiert une morphologie bipolaire et forme un axone et plusieurs dendrites. L'axogenèse, la formation des branches collatérales et le guidage axonal impliquent la réorganisation du cytosquelette de MTs et de nombreuses kinésines sont impliquées dans ces évènements (voir chapitre 1, § V-B).

Une étude récente a mis en évidence que la perte de fonction de ***Kif20b*** chez la souris altère la polarisation neuronale et la croissance des neurites (McNeely et al., 2017), suggérant un rôle clé de Kif20b dans la polarisation neuronale. Puisque la diminution de l'expression de *Kif20b* dans des neurones en culture altère la distribution de Shootin-1 (McNeely et al., 2017; Sapir et al., 2013), connue pour être impliquée dans la polarisation neuronale, les auteurs proposent que les défauts de polarisation observés dans les neurones inhibés pour *Kif20b* pourraient être dus à une diminution de la protéine Shootin-1 au niveau du cône de croissance. Par ailleurs, les neurones déplétés pour *Kif20b* qui sont quand même polarisés présentent une diminution de la taille de l'axone et une augmentation du nombre de branches collatérales. Les neurites mineurs sont plus longs et la morphologie du cône de croissance est également altérée avec une augmentation de la pénétration des MTs dans la protrusion (McNeely et al., 2017) (**Figure 54**). Kif20b est donc également requis pour la croissance axonale et limite la formation des branches collatérales.

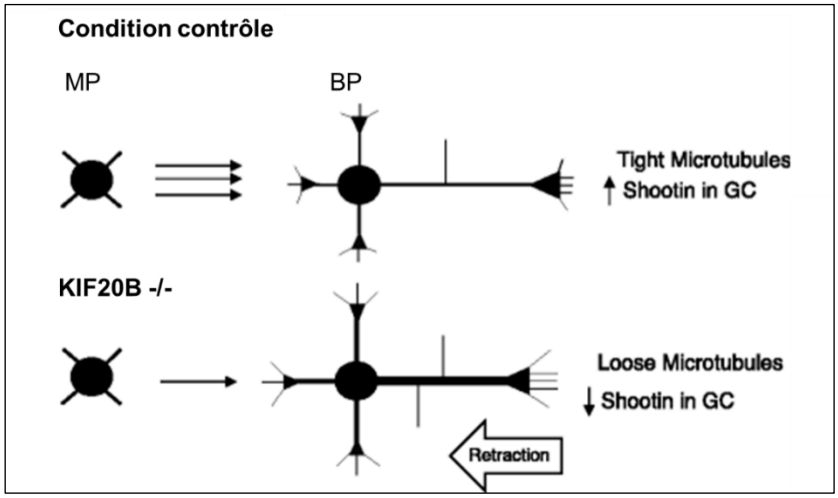


Figure 54 : Conséquence de l'inhibition de Kif20b dans la polarisation des neurones de cultures primaires.
En condition contrôle, le neurone multipolaire (MP) transite vers une forme bipolaire (BP). Kif20b réorganise et stabilise le cytosquelette de MTs dans l'axone et les cônes de croissance et limite le branchement axonale en réduisant l'invasion des MTs dans les filopodes. En recrutant Shootin-1 aux extrémités des MTs dans le cône de croissance, Kif20b pourrait favoriser la croissance axonale en empêchant la rétraction du cône de croissance. La perte de fonction de Kif20b empêche certains neurones de transiter vers une forme bipolaire. Par ailleurs, les neurones capables d'acquérir une morphologie bipolaire présentent des neurites mineurs plus longues, des axones plus courts et plus branchés et des filopodes plus allongés. Les MTs sont désorganisés en envahissent les filopodes et l'accumulation de Shootin-1 aux cônes de croissance est fortement réduite (McNeely et al., 2017) .

Dans des cultures primaires de neurones, **Kif15** et **Kif11** sont enrichies dans le cône de croissance et les dendrites (Buster et al., 2003; Myers and Baas, 2007) où elles sont essentielles à la fonction de l'axone. *In vitro*, l'inhibition de l'expression de *Kif15* ou de *Kif11* conduit à une augmentation de la taille de l'axone (Liu et al., 2010; Myers and Baas, 2007). Contrairement à *Kif15*, dont la perte de fonction diminue le branchement axonale et la taille du cône de croissance (Lin et al., 2012; Liu et al., 2010), les neurones déplétés pour *Kif11* présentent plus de branches (Myers and Baas, 2007). Les auteurs montrent que l'inhibition de *Kif15* et de *Kif11* favorise l'invasion des

MTs dans le cône de croissance (Liu et al., 2010; Myers and Baas, 2007) suggérant également un rôle potentiel de ces kinésines dans le guidage axonal. En effet, sous l'action de différents signaux extracellulaires (attractifs ou répulsifs) le cytosquelette de MTs se réorganise et l'entrée des MTs dans la périphérie du cône de croissance (domaine P) permet au cône de croissance de changer de direction. Nadar et coll., ont montré que Kif11 est essentielle à la redistribution des MTs dans le cône de croissance en réponse aux signaux extracellulaires, permettant ainsi au cône de croissance de se diriger vers les signaux attractifs (Nadar et al., 2008). Liu et coll. ont montré que l'inhibition de ***Kif23*** dans des cultures de neurones de rat conduit les dendrites à adopter une morphologie axonale (Lin et al., 2012) soulignant le rôle essentiel de Kif23 dans la formation des dendrites. Contrairement à Kif15, qui est exprimée dans tout le neurone, Kif23 n'est pas présent dans l'axone et la déplétion de *Kif23* (contrairement à *Kif15*) n'a pas d'effet sur le branchement axonal ou le guidage axonale (Lin et al., 2012; Liu et al., 2010).

Des études ont montré que les kinésines-1 (**Kif5**) sont impliquées dans l'axogenèse et le branchement collatéral. L'inhibition de Kif5 diminue la croissance axonale et le transport intracellulaire dans les axones de cultures de neurones, ce qui suggère un rôle de ces kinésines dans le transport de protéines spécifiques vers le cône de croissance (Ferreira et al., 1992). Kawano et coll., montrent que CRMP-2 (collapsin response mediator protein 2) permet le transport du complexe Sra-1/WAVE1 dans le cône de croissance, via Kif5. La déplétion de CRMP-2 et de kinesin-1 par ARN interférent délocalise le complexe Sra-1/WAVE1 du cône de croissance et empêche ainsi la formation et l'élongation axonale (Kawano et al., 2005). Une étude récente a mis en évidence que la protéine MAP7 favorise la maturation des branches collatérales en interagissant avec les kinésines **Kif5c** et **Kif5b** (Tymanskyj et al., 2018). Aux points de branchements, MAP7 permet le recrutement de ces kinésines aux MTs et ralentit ainsi le transport des organelles et des mitochondries, médiées par ces kinésines-1. En ralentissant le transport aux points de branchement, MAP7 facilite l'entrée de ces organelles dans les branches en formation et est essentielle à leur maintien et à leur maturation (Tymanskyj et al., 2018). Ainsi, une même kinésine (Kif5) peut être impliquée dans ces deux évènements (axogenèse et branchement collatéral) via le transport de différents cargos différents (Kawano et al., 2005; Tymanskyj et al., 2018).

Une étude récente a montré que **Kif1c** (kinésine de type C) était importante pour la croissance axonale et pour l'organisation des MTs au sein de l'axone (Muralidharan and Baas, 2019). Les auteurs ont observés que l'inhibition de *Kifc1* dans des cultures de neurones conduit à une diminution de la croissance axonale et à une rétractation des MTs dans les filopodes et lamellipodes des cônes de croissance. De manière intéressante, les auteurs ont observé que ces phénotypes sont assez similaires à ceux retrouvés lors de l'inhibition de la dynéine cytoplasmique ou de ses protéines adaptatrices. Par ailleurs, au sein des axones, l'inhibition de Kifc1 conduit à l'apparition de MTs mal orientés suggérant que Kifc1 est essentiel pour la préservation de la polarité des MTs au sein de l'axone. Les auteurs proposent qu'au sein de l'axone, Kif1c permet d'établir des liaisons entre les MTs via ses domaines de liaison aux MTs ATP-indépendants et empêche alors

les MTs de s'éloigner les uns des autres sous la force générée par les autres protéines motrices (Muralidharan and Baas, 2019). Kifc1 permet donc aux MTs de résister aux forces qui pourraient causer la rétractation de l'axone et est donc essentiel au maintien de l'axone.

Plusieurs mutations dans certaines kinésines ont été retrouvées associées à des pathologies du corps calleux chez l'humain, associées ou non à d'autres déficits neurologiques. Une mutation faux-sens dans le gène *KIF1A* a été identifiée chez un individu présentant un épaississement du corps calleux et une pachygirie (Jamuar et al., 2014). Des patients mutés pour les gènes *KIF2A* ou *KIF5C* présentent une réduction de l'épaisseur du corps calleux en plus de défauts de gyration et de migration neuronale (Poirier et al., 2013b). Des mutations faux-sens dans *KIF7* sont retrouvées chez plusieurs patients présentant une agénésie ou bien une hypoplasie du corps calleux généralement associées à des ciliopathies (Edwards et al., 2014; Ibisler et al., 2015; Karaer et al., 2015; Tunovic et al., 2015). Une mutation tronquante dans *KIF7* a également été identifiée chez un individu présentant une dysgénésie du CC et une déficience intellectuelle, mais sans ciliopathie (Barakeh et al., 2015).

Bien que des défauts neuro-développementaux dus à des altérations dans la fonction des kinésines peuvent être directement causées par des mutations dans leurs gènes, des mutations dans les gènes tubulines qui altèrent la dynamique ou la stabilité du réseau de MTs peuvent également inhiber le recrutement et/ou la localisation spécifiques de certaines kinésines et donc inhiber leurs fonctions. Illustrant cette idée, une étude a identifié une mutation faux-sens dans le gène *TUBB2B* chez un patient atteint de CFEOM (Cederquist et al., 2012). L'expression de ce variant dans les neurones à projection callosal chez la souris, perturbe les connections intra- et inter-corticales sans affecter la production ou la migration des neurones. Les auteurs montrent que le variant s'incorpore dans les MTs où il altère la dynamique des MTs *in vivo*. Ceci a pour conséquence une altération du recrutement et la localisation de la kinésine Kip3p chez la levure (Cederquist et al., 2012).

Kinésine	Maladies neuro-développementales humaines associées	Références
Famille des kinésines-1		
KIF5C	PMG, pachygyrie, DI, épilepsie, microcéphalie	(Cavallin et al., 2016; Hamdan et al., 2011; Jamuar et al., 2014; Lee et al., 2015; Michels et al., 2017; Poirier et al., 2013b; Willemsen et al., 2014)
Famille des kinésines-3		
KIF1A	Microcéphalie, pachygyrie frontale, épaississement du CC, TSA, DI, déficits cognitifs, atrophie cérébelleuse	(Esmaeeli Nieh et al., 2015; Hamdan et al., 2011; Jamuar et al., 2014, 2017; Lee et al., 2015; Ohba et al., 2015; Tomaselli et al., 2017)
KIF14	Ciliopathies, microcéphalie	(Filges et al., 2014; Makrythanasis et al., 2018b; Moawia et al., 2017; Reilly et al., 2018)
KIF16B	DI	(Alsahli et al., 2018)
Famille des kinésines-4		
KIF4A	DI, épilepsies	(Willemsen et al., 2014)
KIF7	Macrocéphalie, pachygyrie, ciliopathies (ACC, hydrocéphalie, défauts cranio-faciaux), hypoplasie du CC, DI, retard développementaux, épilepsie, ACC isolée	(Ali et al., 2012; Barakeh et al., 2015; Dafinger et al., 2011; Edwards et al., 2014; Ibisler et al., 2015; Jamuar et al., 2014; Karaer et al., 2015; Putoux et al., 2011; Tunovic et al., 2015)
Famille des kinésines-5		
KIF11	Microcéphalie	(Ostergaard et al., 2012; Robitaille et al., 2014)
Famille des kinésines-5		
KIF23	Microcéphalie	(Karaca et al., 2015)
Famille des kinésines-9		
KIF6	Mégalencéphalie, DI	(Konjikusic et al., 2018)
Famille des kinésines-11		
KIF26A	Hétérotopie sous-corticale en bande	(Jamuar et al., 2014)
Famille des kinésines-13		
KIF2A	Hétérotopie, pachygyrie, microcéphalie, lissencéphalie, épilepsies, diminution de l'épaisseur du CC	(Cavallin et al., 2017; Poirier et al., 2013b; Tian et al., 2016)

Tableau 2: Maladies neuro-développementales humaines associées à des mutations dans des gènes codant pour des kinésines.
ACC, agénésie du corps calleux ; CC, corps calleux ; DI, déficience intellectuelle. PMG, polymicrogyrie ; TSA, troubles du spectre autistique.

III.La kinésine KIF21B

A. Structure et expression de KIF21B

Les gènes *Kif21a* et *Kif21b* appartiennent à la famille de kinésines-4 et ont été tous les deux isolés pour la première fois en 1999 à partir d'une librairie d'ADN complémentaire de rétine de souris (Marszalek et al., 1999). *Kif21a* est situé sur le chromosome 15 chez la souris et 8 chez l'humain, tandis que *Kif21b* est situé sur le chromosome 1 chez la souris et 2 chez l'humain (Marszalek et al., 1999). Deux isoformes de *Kif21b* ont été identifiées chez la souris (une forme longue et une forme courte) et partagent plus de 99% d'homologie en acides aminés (aa). Chez l'humain, il existe quatre isoformes *KIF21B* différentes qui partagent plus de 97% d'homologie de séquence en aa avec les isoformes de souris. Le gène *KIF21B* est également présent chez le poisson zèbre avec plus de 70% d'homologie de séquence en aa comparé à la forme humaine. *KIF21B* est donc un gène très conservé d'une espèce à l'autre.

Les protéines Kif21a et Kif21b partagent 61% d'homologie en aa et sont composées de 3 domaines fonctionnels (**Figure 55**) : un domaine moteur dans la partie amino-terminale, qui se fixe aux MTs et permet le transport intracellulaire, un domaine coiled-coil central contenant un domaine de régulation de l'auto-inhibition (rCC) et un domaine WD-40 en carboxy terminal, composé d'une séquence consensus Tryptophane-Acide aspartique répétée 7 fois (Marszalek et al., 1999; van Riel et al., 2017).

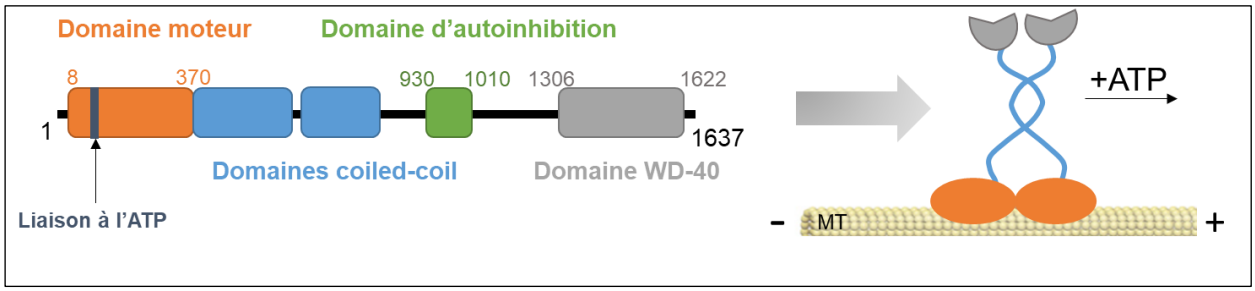


Figure 55 : Structure de la protéine KIF21B humaine.
Schéma de l'isoforme humaine n°1 (la plus longue) de la protéine KIF21B (NM001252100 ; 1637 acides aminés). Les différents domaines de KIF21B ainsi que leur position le long de la protéine sont représentés sur le schéma. Le domaine moteur (orange) localisé dans la partie amino-terminale interagit avec le cytosquelette de MT et permet le transport intracellulaire tandis que le domaine WD-40 (gris) localisé dans la région carboxy-terminale, caractéristique des kinésines KIF21A et KIF21B, a été proposé comme interagissant avec les cargos. Le domaine d'auto-inhibition (vert) est impliqué dans l'auto-inhibition de KIF21B. Il a été proposé que deux kinésines KIF21B s'homodimérisent via leur domaines coiled-coil (en bleu) avant de se lier au cytosquelette de microtubule (MT).

Le domaine WD-40 est une structure caractéristique de Kif21a et b et n'est pas retrouvé chez les autres kinésines (Marszalek et al., 1999). Le domaine de liaison aux cargos de Kif21a et b n'est pas identifié à l'heure actuelle. Puisqu'il est connu que le domaine WD-40 est impliqué dans l'interaction protéique chez d'autres protéines, et que chez la plupart des kinésines le domaine de liaison aux cargos se situe dans la partie carboxy-terminale, il a été proposé que le domaine WD-40 soit le domaine d'interaction aux cargos chez Kif21a et b (Marszalek et al., 1999). Cependant, nous

ne pouvons pas exclure la possibilité que Kif21b puissent lier les cargos via son domaine coiled-coil, comme cela a été montré chez d'autres kinésines (Hirokawa et al., 2010a). Enfin, il a été montré que deux kinésines Kif21a ou Kif21b sont capables de s'homodimériser *in vitro*, mais Kif21a et Kif21b ne s'hétérodimérisent pas (Marszalek et al., 1999).

Chez la souris, la protéine Kif21b est exprimée dans de nombreux tissus tels que le cerveau, la rate ou les testicules (Marszalek et al., 1999) (**Figure 56 A**). Dans le cerveau, le transcrit et la protéine Kif21b sont enrichis dans le cortex cérébral (**Figure 56 B, C**) où Kif21b se localise essentiellement dans les neurones post-mitotiques au niveau du corps cellulaire et des prolongements (Marszalek et al., 1999). Dans des cultures de neurones hippocampiques, Kif21b est exprimée dans le soma, l'axone et les dendrites et est enrichie dans les cônes de croissance (Ghiretti et al., 2016; Labonté et al., 2013) (**Figure 56 D**).

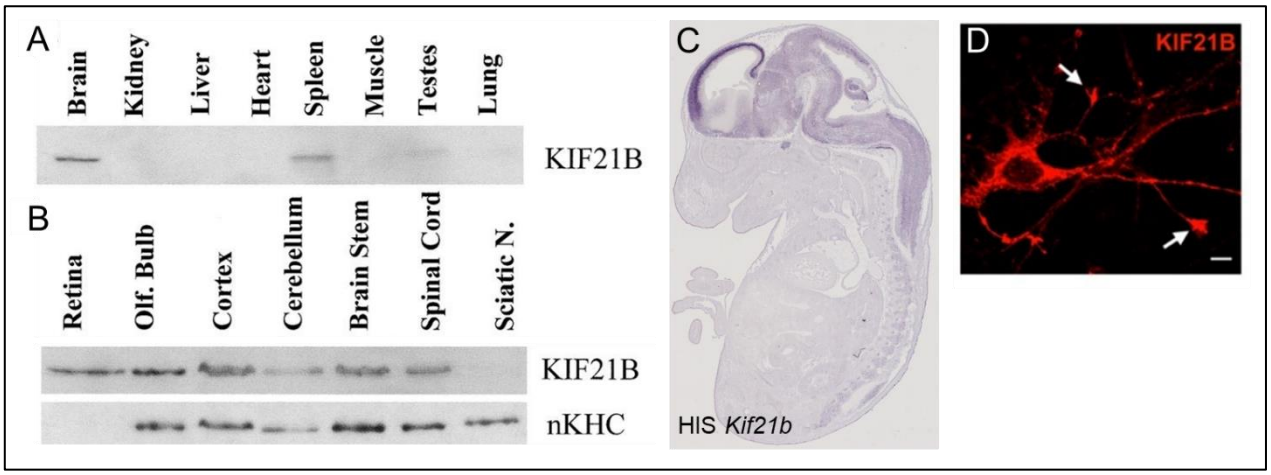


Figure 56 : Profil d'expression de Kif21b chez la souris.
(A-B) Analyses western blot de l'expression de Kif21b dans différents tissus. Kif21b est exprimée dans le cerveau (rétine, bulbe olfactif, cortex cérébral, tronc cérébral et moelle épinière), la rate et les testicules. (Marszalek et al., 1999). (C) L'hybridation *in situ* (HIS) de *Kif21b* sur une coupe sagittale d'embryon de souris à E14,5 montre que l'ARNm *Kif21b* est présent dans le cerveau et enrichi dans le cortex cérébral (source : genepaint, *www.gp3.mpg.de*). (D) Immunofluorescence de Kif21b dans une culture de neurones hippocampiques montrant l'expression de Kif21b dans le soma et les prolongements, ainsi que dans les cônes de croissances (flèches blanches) (Labonté et al., 2013).

B. Fonctions de KIF21B au sein des neurones

1. Le transport de cargos

Kif21b est une kinésine de type N qui se déplace de façon antérograde le long des MTs en utilisant l'énergie fournie par hydrolyse d'ATP (Marszalek et al., 1999). Kif21b a initialement été proposée comme une kinésine particulière qui participerait au transport intracellulaire uniquement dans les dendrites (Ghiretti et al., 2016; Marszalek et al., 1999; Muhia et al., 2016). Ceci est cependant controversé puisque d'autres études, y compris mes travaux de thèse, montrent que Kif21b est également retrouvée dans les axones (Lipka et al., 2016; Morikawa et al., 2018).

Plusieurs études ont évalué la vitesse de déplacement de Kif21b et les résultats diffèrent d'une étude à l'autre à cause de la technique et du modèle cellulaire utilisés. Des expériences de mobilité *in vitro* montrent que la vitesse moyenne de déplacement d'une kinésine est de 0,6 à 0,8 µm/s (Visscher et al., 1999). Dans les dendrites de neurones hippocampiques, la forme entière de Kif21b (full-length) a une vitesse comprise entre 0,2 et 1,5 µm/s (Ghiretti et al., 2016; Labonté et al., 2013), tandis que *in vitro*, elle se déplace à 0,14µm/s. En revanche, dans des cultures de cellules COS-7, Kif21b se déplace plus rapidement (0,63 µm/s) (van Riel et al., 2017). Cette différence de vélocité pourrait s'expliquer par la présence de protéines spécifiques (des MAP par exemple) qui ralentissent Kif21b dans les neurones. Globalement, Kif21b est une kinésine relativement lente. Ghiretti et coll., ont montré que la forme contenant le domaine moteur de Kif21b et une partie de son domaine coiled-coil (aa 1 à 657) est plus rapide (0,4 µm/s) que la forme entière (0,2 µm/s). Par ailleurs, la processivité de la forme tronquée de Kif21b est plus grande, c'est-à-dire qu'elle que peut se déplacer sur de plus longues distances le long des MTs (6 µm en moyenne) que la forme entière (3,5 µm en moyenne) (Ghiretti et al., 2016). Les auteurs suggèrent que la liaison de Kif21b (full length) aux cargos pourrait ralentir à vitesse de déplacement de la kinésine.

Lipka et coll., ont montré que Kif21b (tout comme Kif21a) participerait au transport intracellulaire dans les axones et dans les dendrites, dans des cultures de neurones hippocampiques (Lipka et al., 2016) (**Figure 58 A,B**, à la fin du paragraphe). Au sein des dendrites, Kif21b participe également au transport et à la libération de la sous unité γ2 du récepteur $GABA_AR$ ($GABA_AR$ γ2) à la surface synaptique des dendrites via la protéine ubiquitine ligase E3 TRIM3 (Tripartite motif-containing protein 3) (Labonté et al., 2013, 2014) (**Figure 58 A**). L'inhibition de l'expression de *TRIM3* chez la souris et dans des cultures neuronales montrent que Kif21b n'est pas dégradée par TRIM3. En revanche, l'inhibition de *TRIM3* diminue la vitesse du mouvement de Kif21b (Labonté et al., 2013) et affecte l'expression du récepteur au *$GABA_AR$* à la surface cellulaire (Cheung et al., 2010). Labonté et coll., montrent par ailleurs que, bien que la déplétion de *Kif21b* diminue l'expression de $GABA_AR$ γ2 à la membrane plasmique, cela n'a pas d'effet sur le nombre de synapses (Labonté et al., 2014). Ghiretti et coll., ont montré que la kinésine Kif21b surexprimée dans des cultures de neurones hippocampiques est majoritairement localisée dans les dendrites où elle se lie préférentiellement aux MTs dont l'extrémité (+) est orientée vers le soma. (Ghiretti et al., 2016). Kif21b permet le transport de BDNF (brain-derived neurotrophic factor) couplé à son récepteur TrkB (tropomyosin-related kinase B) de l'extrémité dendritique vers le soma (Ghiretti et al., 2016) (**Figure 58 A**). En revanche, Kif21b n'a pas d'effet sur la vitesse ou sur la mobilité de ces vésicules (Ghiretti et al., 2016). Kif21b participe également au recyclage des endosomes contenant les récepteurs NMDA (*N*-méthyl-D-aspartate) au niveau des synapses (Gromova et al., 2018) (**Figure 58 C**). Gromova et coll., montrent en effet que Kif21b interagit avec le complexe NBEA (neurobeachin)-GluN2B requis pour le recyclage et pour l'expression des récepteurs NMDA à la surface cellulaire. Les auteurs montrent que Kif21b régule la dynamique (vitesse et déplacement) des vésicules NBEA le long des MTs et suggèrent que Kif21b pourrait faciliter le détachement de ces vésicules de

l'extrémité des MTs (+) en initiant la catastrophe des MTs. Les auteurs proposent qu'en l'absence de Kif21b, l'augmentation de la stabilité des MTs pourrait empêcher le détachement des vésicules NBEA et contribuer à la diminution du nombre des récepteurs NMDA à la surface cellulaire (Gromova et al., 2018).

Outre la fonction de Kif21b dans le transport de ces différentes vésicules, les connaissances concernant les cargos transportés par Kif21b et le rôle de ce transport dans la fonction neuronale sont très limitées.

2. La dynamique du réseau de MTs

L'étude menée par Muhia et coll. a montré pour la première fois que Kif21b jouait un rôle dans la régulation de la dynamique des MTs (Muhia et al., 2016). Dans des cultures de cellules HeLa transfectées avec le plasmide EB3-Cherry (qui permet de mesurer la vitesse de polymérisation et la croissance des MTs ainsi que la durée de vie de leurs coiffes), les auteurs montrent que la surexpression de Kif21b favorise la stabilité du réseau de MTs en limitant leur croissance et leur catastrophe. Les MTs sont donc moins dynamiques en présence de Kif21b (Muhia et al., 2016). La même année, Ghiretti et coll. confirment que Kif21b joue un rôle dans la dynamique du réseau de MTs, mais leurs résultats contredisent ceux des auteurs précédents. En effet, les expériences de Ghiretti et coll., faites dans des cultures de neurones inactivés pour *Kif21b* ou bien surexprimant *Kif21b* montrent que Kif21b promeut l'instabilité des MTs au sein des dendrites en favorisant à la fois la croissance et la catastrophe des MTs (Ghiretti et al., 2016) (**Figure 58 A**). De manière intéressante, les auteurs montrent que les deux fonctions de Kif21b (transport de cargos et dynamique des MTs) sont découplées et permises par deux sites de liaison distincts aux MTs : (1) la liaison de Kif21b via le domaine moteur dans la partie amino-terminale permet le transport des vésicules BDNF-TrkB le long des MTs ; tandis que (2) la liaison de Kif21b aux MTs via sa partie C-terminale permet de réguler la dynamique des MTs. Les auteurs montrent que ces deux fonctions de Kif21b sont régulées par l'activité neuronale puisque l'augmentation de l'activité neuronale favorise la mobilité de Kif21b aux dépend de sa fonction sur la régulation de la dynamique des MTs (Ghiretti et al., 2016).

L'étude menée par Van Riel et coll. a permis d'affiner la localisation des différents domaines de la protéine humaine KIF21B et leurs fonctions sur le réseau de MTs. Les auteurs montrent que dans des cellules COS-7 surexprimant *KIF21B*, la kinésine s'accumule aux extrémités (+) des MTs où elle inhibe la croissance des MTs et promeut la catastrophe et ce, de manière dose-dépendante (van Riel et al., 2017). En combinant des techniques d'étude de mobilité *in vitro* à de la microscopie en temps réel dans des cultures cellulaires, les auteurs montrent que KIF21B possède trois domaines distincts de liaison aux MTs : (1) la partie amino-terminale (aa 1-660), (2) le domaine coiled-coil (aa 696-1163) divisé en deux parties 1 et 2, et (3) le domaine WD-40 (aa 1236-1624).

Kif21b est ainsi la première kinésine identifiée comme favorisant l'instabilité du cytosquelette de MTs dans les dendrites (Ghiretti et al., 2016) où elle favorise la dynamique et l'instabilité des MTs

en agissant à la fois sur leur croissance et leur catastrophe (Ghiretti et al., 2016; van Riel et al., 2017).

3. Le domaine d'auto-inhibition

Il a été montré *in vitro* que l'auto-inhibition de Kif21b est permise par une séquence régulatrice (rCC, aa 930-1010) localisée dans la région coiled-coil centrale, qui permet l'interaction entre le domaine rCC et le domaine moteur (Bianchi et al., 2016; van Riel et al., 2017) (**Figure 55**). Quelles sont les conséquences de l'auto-inhibition sur la fonction de Kif21b ?

Comme décrit plus haut, l'auto-inhibition des kinésines empêche la dimérisation de certaines kinésines et donc la formation d'un domaine moteur à deux têtes. Puisque Kif21b fonctionne sous forme de dimère (Ghiretti et al., 2016; van Riel et al., 2017), l'auto-inhibition pourrait empêcher l'homodimérisation de Kif21b et, par conséquence, inhiber sa fonction de transport de cargos.

Le domaine de régulation (930-1010) est retrouvé chez la kinésine Kif21a et permet, par liaison du domaine rCC au domaine moteur, le repliement de Kif21a, empêchant l'interaction de Kif21a aux MTs (Bianchi et al., 2016; van der Vaart et al., 2013). De manière intéressante, le domaine d'auto-inhibition de Kif21a interagit avec le domaine moteur de Kif21b, suggérant une conservation du mécanisme d'auto-inhibition entre Kif21a et Kif21b (Bianchi et al., 2016).

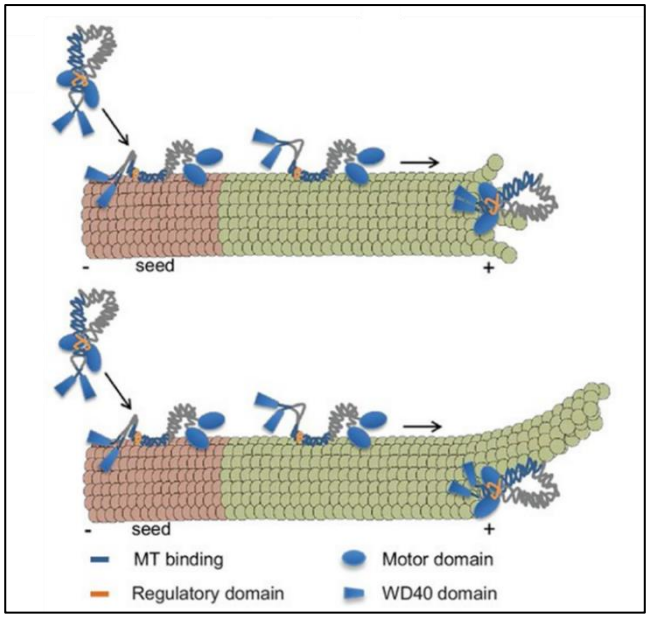


Figure 57: KIF21B est un facteur de pause des MTs.
En solution, le domaine d'auto-inhibition de KIF21B (en orange) empêche la liaison du domaine moteur aux MTs. Le domaine WD-40 se lie alors préférentiellement aux MTs stabilisés (en rouge). Une fois attaché aux MTs, l'auto-inhibition de KIF21B se lève et permet la liaison des régions motrices et coiled-coil. KIF21B se déplace vers l'extrémité (+) du MT (en vert). Arrivé à l'extrémité, KIF21B change de conformation et retourne à sa forme inactive. La liaison de KIF21B via le domaine WD-40, empêche KIF21B de se détacher du MT. KIF21B induit alors une pause dans la croissance du MT en inhibant l'élongation et le raccourcissement des protofilaments avec lequel il interagit. Les autres protofilaments vont alors soit (panel du haut) se dépolymériser rapidement ou alors (panel du bas) s'allonger et former une extrémité incomplète ce qui va mener à la catastrophe. Modèle proposé par (van Riel et al., 2017).

L'étude menée par Van Riel et coll., montre en effet que l'auto-inhibition de KIF21B inhibe l'interaction du domaine moteur aux MTs (van Riel et al., 2017). Mais, de manière surprenante, l'auto-inhibition n'empêche pas la liaison du domaine WD-40 aux MTs. Dans leur modèle, les auteurs proposent que la liaison de Kif21b aux MTs, sous sa forme inactive, via son domaine WD-40 permettrait de diminuer la croissance des MTs à l'extrémité (+) en favorisant une pause des MTs (van Riel et al., 2017) (**Figure 57**). Il faut garder à l'esprit que l'ensemble de ces études ont été faites *in vitro*. De ce fait, les rôles de l'auto-inhibition et les conséquences de l'altération de ce mécanisme

dans les cellules (notamment les neurones), demeurent inexplorées, et il n'est pas exclu que l'auto-inhibition puisse avoir d'autres répercussions *in vivo*. De plus, le(s) mécanisme(s) permettant de réguler l'auto-inhibition de Kif21b sont inconnus à l'heure actuelle.

4. Le développement et la fonction neuronale

Plusieurs études soulignent le rôle essentiel de Kif21b dans la fonction neuronale adulte, notamment dans la **transmission synaptique**. De façon intéressante, des micro-duplications *de novo* de la région chromosomique 1q32.1, contenant de nombreux gènes exprimés dans le cerveau dont *KIF21B*) ont été retrouvées chez deux individus atteints de déficience intellectuelle (DI), de troubles du spectre autistique, d'épilepsie et de déficit cognitif (Olson et al., 2012). Diverses études comportementales récentes menées chez la souris ont mis en évidence l'implication de Kif21b dans la mémoire, la cognition et le comportement social. En effet, l'inactivation homozygote de *Kif21b* chez la souris conduit à des défauts d'apprentissage et de mémorisation (Muhia et al., 2016), des troubles anxieux (Morikawa et al., 2018) ainsi que des altérations dans les comportements sociaux suggérant un phénotype autistique (Gromova et al., 2018). Des altérations de la morphologie synaptique et de l'arbre dendritique ainsi que des défauts de transmission synaptique retrouvés dans les neurones inactivés pour *Kif21b* ont été associés aux phénotypes comportementaux observés (Gromova et al., 2018; Muhia et al., 2016; Swarnkar et al., 2018). La perte de fonction de Kif21b conduit en effet à une altération de l'arbre dendritique (dendrites moins branchées), un défaut de formation des épines dendritiques (diminution du nombre total d'épines dendritiques par dendrite), ainsi qu'une altération de la formation des synapses (réduction du nombre de synapses) (Muhia et al., 2016).

Une étude récente a montré un rôle intéressant de Kif21b dans la **plasticité neuronale** via la protéine GTPase Rac1 (Morikawa et al., 2018). Pour tester le rôle de Kif21b dans la plasticité synaptique, les auteurs ont utilisé le test comportemental du « conditionnement à la peur » (Fear conditioning). Dans ce test, un stimulus conditionné (comme un bruit ou une odeur) est associé de façon durable à un stimulus aversif (ici, un choc électrique), qui déclenche alors la réaction de peur chez la souris. Après cette phase de conditionnement, la présentation du stimulus conditionné parvient alors à lui seul à déclencher la réaction de peur chez la souris. Puis, après un certain temps, le stimulus conditionné n'a plus d'effet sur la souris contrôle qui n'associe plus le stimulus conditionné au choc électrique : c'est « l'extinction de la peur » (Fear extinction). Chez les souris mutées pour *Kif21b*, il n'existe pas d'extinction de la peur, ce qui signifie que la plasticité cognitive de la souris est altérée (Morikawa et al., 2018). Les auteurs ont montré que Kif21b est essentiel à la plasticité cognitive médiée par les récepteurs NMDA. Au niveau des synapses dendritiques, Kif21b permet la translocation de Elmo1 présent dans l'épine synaptique vers le compartiment dendritique. Elmo1 est une protéine GEF impliquée dans l'inactivation de Rac1 (conversion de Rac1-GTP en Rac1-GDP), dont l'activité cyclique est requise pour le mécanisme d'extinction de la peur. Ainsi, dans les neurones déplétés pour *Kif21b*, l'activation de Rac1 est anormalement allongée, ce qui

montre que Kif21b est essentiel pour le contrôle de la durée d'activation de Rac1, en séquestrant Elmo1 (Morikawa et al., 2018) (**Figure 58 D**).

En 2017, une analyse histo-morphologique menée chez des souris inactivées pour différents gènes contenant le domaine WD-40 a permis d'identifier Kif21b comme ayant un rôle majeur dans la **morphologie cérébrale**. Les auteurs ont mis en évidence que les souris inactivées pour le gène *Kif21b* présentent des anomalies associées à un développement cérébral anormal comme une microcéphalie et une diminution de l'épaisseur du corps calleux (Kannan et al., 2017) ce qui suggère que Kif21b pourrait avoir un rôle dans le **développement cortical**.

KIF21B a également été associée à d'autres maladies dont des maladies neurodégénératives. *KIF21B* est en effet un locus de susceptibilité pour la sclérose en plaque (Goris et al., 2010), maladie auto-immune caractérisée par une inflammation et une dégradation de la gaine de myéline des axones du système nerveux central, et pour la maladie d'Alzheimer (Kreft et al., 2014), maladie qui résulte d'une dégénérescence des neurones et qui conduit à des troubles de la mémoire. Des variations génétiques appelées polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP, single-nucleotide polymorphism en anglais) sont en effet retrouvées dans le gène *KIF21B* chez des individus atteints de sclérose en plaque, mais également chez des individus atteint d'autres maladies auto-immunes telles que la maladie de Crohn (Barrett et al., 2008; Goris et al., 2010). Par ailleurs, des niveaux élevés de KIF21B sont retrouvés dans le cortex cérébral d'individus atteints par la maladie d'Alzheimer (Kreft et al., 2014).

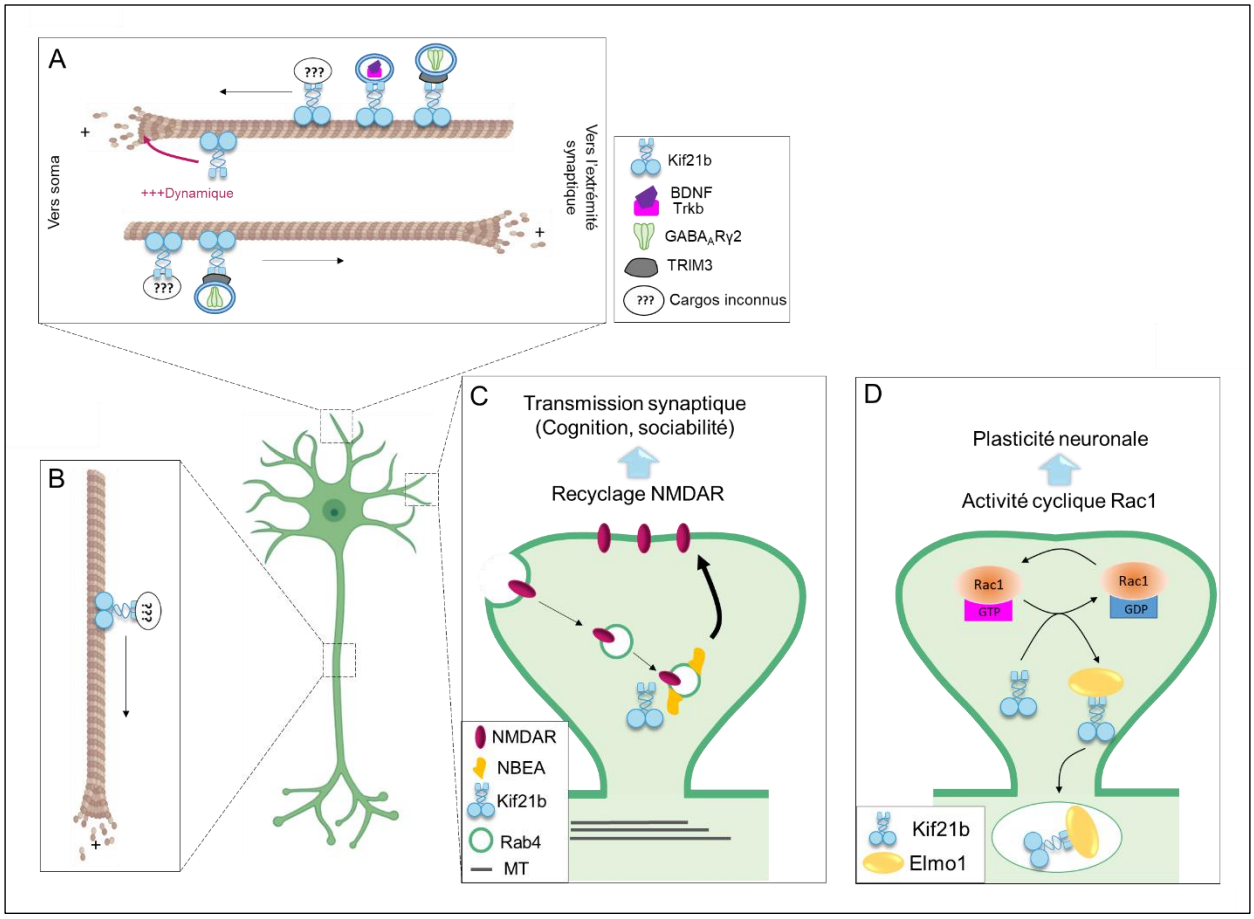


Figure 58 : Schéma récapitulatif des fonctions de Kif21b au sein des neurones.
Transport intracellulaire médié par Kif21b dans les compartiments dendritiques (A) et axonaux (B) dans des cultures de neurones hippocampiques. Kif21b permet le transport intracellulaire dans les axones et dans les dendrites (Lipka et al., 2016), mais les cargos transportés dans les axones demeurent inconnus à l'heure actuelle. Au sein des dendrites, Kif21b participe au transport du récepteur GABAARγ2 vers les synapses dendritiques, via la protéine TRIM3 (Labonté et al., 2013). Kif21b participe également au transport de BDNF couplé à son récepteur TrkB de l'extrémité dendritique vers le soma uniquement (Ghiretti et al., 2016). Kif21b promeut l'instabilité des MTs au sein des dendrites en favorisant à la fois la croissance et la catastrophe des MTs (Ghiretti et al., 2016). **(C,D) Fonctions de Kif21b dans la transmission synaptique et la plasticité neuronale.** (C) Kif21b et NBEA participent au recyclage des récepteurs au NMDA dans les synapses dendritiques (Gromova et al., 2018). La perte de fonction de *Kif21b* ou de *NBEA* chez la souris conduit à des déficits cognitifs et à une altération du comportement sociale, suggérant ainsi un lien possible entre le recyclage des endosomes et le comportement social. (D) Kif21b est requis pour la plasticité neuronale, notamment au cours du mécanisme d'extinction de peur chez les souris (Morikawa et al., 2018). Kif21b se fixe à la protéine GEF Elmo1 et permet sa translocation vers le compartiment dendritique, ce qui participe à la régulation du cycle activation/inhibition de Rac1, requis pour le mécanisme d'extinction de peur. Chez les souris mutées pour *Kif21b*, l'activation de Rac1 est anormalement allongée ce qui a pour conséquence d'inhiber le mécanisme d'extinction de peur chez ces souris.

Objectifs

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le développement cortical se déroule selon des étapes bien définies qui sont essentielles à la formation d'un cerveau fonctionnel. La perturbation de l'une ou plusieurs de ces étapes peut-être à l'origine de malformations neuro-développementales telles que les malformations du développement cortical (MDC) ou des agénésies du corps calleux (ACC), qui sont responsables de différents troubles neurologiques et cognitifs de sévérité variable, d'épilepsie ou encore de déficience intellectuelle (DI). Plusieurs études portant sur ces malformations cérébrales ont permis d'identifier un grand nombre de mécanismes génétiques et moléculaires, et de mettre en évidence le rôle de plusieurs gènes dans les différentes étapes du développement du cerveau. Ainsi, de nombreuses mutations dans des gènes codant pour les tubulines, sous unités du réseau de MTs, ou bien ses protéines associées telles que les kinésines, ont été identifiées chez des individus présentant diverses malformations neuro-développementales. Cependant, bien que les études menées chez la souris aient montré que les kinésines étaient impliquées dans pratiquement toutes les étapes du développement cortical, les mécanismes fonctionnels par lesquels ces kinésines conduisent aux phénotypes demeurent encore en grande partie méconnus.

Au cours de mon doctorat, je me suis attachée à comprendre la fonction de Kif21b, une kinésine jusqu'alors peu connue, dans le développement cortical. J'ai tout d'abord réalisé une étude fonctionnelle des variants de KIF21B *in vivo*, puis j'ai étudié les fonctions de Kif21b au cours de la migration neuronale et initié la caractérisation neuro-anatomique d'un modèle knock-out pour Kif21b.

1) Nous avons identifié 4 variants pour le gène *KIF21B* chez des individus présentant tous une DI plus ou moins sévère associée à une microcéphalie ou une ACC. *Le premier objectif de ma thèse a été de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels ces variants conduisent à un développement anormal du cerveau.* J'ai alors mis en évidence que les variants faux-sens affectent la fonction auto-inhibitrice de KIF21B dans les neurones corticaux en migration et conduisent à un défaut de migration radiaire et d'axogenèse chez la souris. Par ailleurs, en utilisant les modèles souris et poisson zèbre, j'ai montré que l'expression des variants faux-sens récapitulent les phénotypes neuro-développementaux observés chez les patients : altération de la migration radiaire, microcéphalie, défauts d'axogenèse et défauts de branchements axonaux. L'ensemble de ces travaux ont sont décrits en **Article 1**, actuellement en révision dans la revue ***Nature Communications*** (Juin 2019).

2) *Dans un second temps,* je *me suis intéressée aux mécanismes moléculaires par lesquels Kif21b contrôle la migration neuronale*. J'ai ainsi mis en évidence que Kif21b régule la migration radiaire des neurones de projection et la migration tangentielle des interneurones. *Les études des mécanismes impliqués dans ces défauts sont en cours et suggèrent un rôle*

potentiel de Kif21b dans la régulation du cytosquelette d'actine au cours de la migration. L'ensemble de ces travaux sont décrits en **Article 2** et discutés à la fin de ce manuscrit dans la partie Discussion.

3) Enfin, nous avons commencé des analyses neuro-anatomiques du modèle souris knock-out (KO) pour Kif21b. Les résultats précédents montrent que les souris homozygotes mâles KO pour *Kif21b* à 16 semaines de développement présentent une microcéphalie et une dysgénésie du corps calleux (Kannan et al., 2017). Nous souhaitons savoir i) à quel(s) stade(s) développemental ces malformations apparaissent ; ii) si ces malformations sont retrouvées chez l'hétérozygote ; et iii) si les phénotypes neuro-développementaux sont les mêmes entre les mâles et les femelles. Pour cela, nous avons commencé des analyses neuro-anatomiques des souris mâles et femelles, hétérozygotes et homozygotes KO pour *Kif21b*. Les premiers résultats obtenus sont décrits en **Résultats préliminaires**.

L'ensemble de mes travaux mettent en lumière des nouvelles fonctions de KIF21B dans les étapes clés de la mise en place du cortex cérébral et participent à une plus grande compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires qui conduisent à des malformations corticales.

Résultats

Article 1

Mutations in the *KIF21B* kinesin gene are associated with intellectual disability and cause neurodevelopmental abnormalities through imbalanced canonical motor activity.

Laure Asselin, José Rivera Alvarez[#], Solveig Heide[#], Camille S. Bonnet[#], Peggy Tilly, Hélène Vitet, Chantal Weber, Carlos A. Bacino, Kristin Baranaño, Anna Chassevent, Amy Dameron, Laurence Faivre, Neil A. Hanchard, Sonal Mahida, Kirsty McWalter, Cyril Mignot, Caroline Nava, Agnès Rastetter, Haley Streff, Christel Thauvin-Robinet, Marjan M Weiss, Gladys Zapata, Petra J. G. Zwijnenburg, Frédéric Saudou, Christel Depienne, Christelle Golzio, Delphine Héron, Juliette D. Godin*

* Corresponding author: godin@igbmc.fr

[#] These authors contributed equally to this work.

Article soumis au journal ***Nature Communications*** *le 17/06/2019.*

Résumé des résultats :

Nous avons identifié 4 variants pour le gène KIF21B chez 4 patients différents. Trois des patients ont une mutation hétérozygote faux-sens dans différents domaines de KIF21B (p.Ile678Leu dans le domaine coiled-coil – Patient 1; p.Gln313Lys dans le domaine moteur - Patient 2 et p.Ala1001Thr dans le domaine d'auto-inhibition, Patient 3) tandis que le quatrième patient possède une duplication (p.Asn988Serfs*4 – Patient 4) conduisant à un codon-stop prématuré. Bien que ces patients présentent tous une déficience intellectuelle plus ou moins sévère associée ou non à un retard de langage et des troubles moteurs, ils ne présentent pas les mêmes malformations cérébrales. En effet, le patient 2 (p.Gln313Lys) a une microcéphalie tandis que le patient 1 (p.Ile678Leu) présente une agénésie du corps calleux (ACC).

J'ai étudié la fonction des trois variants faux-sens sur la migration radiaire par électroporation *in utéro* (EIU) à E14,5 et observé un défaut de positionnement des neurones post-mitotiques à E18,5. De façon intéressante, la surexpression de la forme sauvage de *KIF21B* avec les trois variants faux-sens ne restaurent pas le phénotype de migration. J'ai montré par des expériences d'EIU que les trois variants affectent la fonction auto-inhibitrice de KIF21B, conduisant ainsi au défaut de migration radiaire. De manière intéressante, la surexpression du variant p.Ile678Leu rendu immobile par délétion du domaine de liaison à l'ATP (p.Ile678Leu–ΔATP) diminue la sévérité du phénotype de migration, prouvant ainsi que le variant p.Ile678Leu exerce son effet gain de fonction, en partie, en sur-activant la fonction motilité de KIF21B.

Concernant le variant tronquant p.Asn988Serfs*4, des analyses de séquençage et de RT-qPCR, ont montré que les transcrits p.Asn988Serfs*4 étaient dégradés, conduisant à une haplo-

insuffisance. Pour étudier les conséquences fonctionnelles de cette haplo-insuffisance, j'ai procédé à la diminution de l'expression de *Kif21b* spécifiquement dans les neurones. Les expériences d'EIU de sh-RNA à E14,5 ont révélé que la déplétion de *Kif21b* conduit à une altération de la migration radiaire, phénotype sauvé par la co-expression du gène sauvage.

En collaboration avec l'équipe de C. Golzio à l'IGBMC, j'ai étudié l'effet des différents variants *KIF21B* sur la taille du cerveau chez le poisson zèbre. Par micro-injection d'ARNm codant pour les différents variants de *KIF21B*, dans l'embryon de poisson, nous avons montré que la surexpression du variant p.Gln313Lys conduisait à une diminution de la taille du cerveau. En revanche, la surexpression des variants p.Ile678Leu et p.Ala1001Thr n'a pas eu d'effet sur la taille du cerveau, montrant ainsi que le variant p.Gln313Lys conduit spécifiquement au phénotype de microcéphalie, récapitulant ainsi le phénotype du patient.

Le patient 1 (p.Ile678Leu) présentant une ACC, j'ai donc voulu savoir si les variants faux-sens de KIF21B conduisaient à des anomalies d'axogenèse et/ou à des anomalies de branchement axonal. J'ai montré que la surexpression de la forme sauvage ou du variant p.Gln313Lys par EIU n'induisent pas de phénotype intra-cortical. En revanche, la surexpression du variant p.Ile678Leu conduit à un défaut d'axogenèse jusqu'à 22 jours après la naissance (P22). La surexpression de la forme sauvage de KIF21B avec le variant p.Ile678Leu ne restaure pas le défaut d'axogenèse. Par ailleurs, la surexpression du variant p.Ile678Leu-ΔATP (rendu immobile) ne présente plus de défauts d'axogenèse, suggérant ainsi que le variant p.Ile678Leu exerce son effet gain de fonction en sur-activant la fonction motilité de KIF21B. Outre les défauts d'axogenèse, la surexpression du variant p.Ile678Leu conduit également à une diminution du branchement callosal axonal en ispilateral à P8. J'ai par ailleurs montré que ces défauts de branchements axonaux ne sont pas les conséquences des défauts de migration radiaire ou d'axogenèse. En poussant plus loin les analyses mécanistiques, j'ai montré que le variant p.Ile678Leu altère le branchement axonal des neurones de projection callosal par un effet dominant négatif sur la fonction mobilité de KIF21B.

Mutations in the *KIF21B* kinesin gene are associated with intellectual disability and cause neurodevelopmental abnormalities through imbalanced canonical motor activity.

Laure Asselin[1,2,3,4], José Rivera Alvarez[1,2,3,4,#], Solveig Heide[5,6,7,#], Camille S. Bonnet[1,2,3,4,#], Peggy Tilly[1,2,3,4], Hélène Vitet[8], Chantal Weber[1,2,3,4], Carlos A. Bacino[9,10], Kristin Baranaño[11], Anna Chassevent[11], Amy Dameron[12], Laurence Faivre[13,14], Neil A. Hanchard[9], Sonal Mahida[15], Kirsty McWalter[12], Cyril Mignot[5,6,7,16], Caroline Nava[5,16], Agnès Rastetter[16], Haley Streff[9,10], Christel Thauvin-Robinet[13,17], Marjan M Weiss[18], Gladys Zapata[10], Petra J. G. Zwijnenburg[18], Frédéric Saudou[8], Christel Depienne[1,2,3,4,16,19], Christelle Golzio[1,2,3,4], Delphine Héron[5,6,7], Juliette D. Godin[1,2,3,4,*]

1. Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France.
2. Centre National de la Recherche Scientifique, UMR7104, Illkirch, France.
3. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM, U1258, Illkirch, France.
4. Université de Strasbourg, Strasbourg, France.
5. Département de Génétique, AP-HP, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France.
6. Groupe de Recherche Clinique (GRC) "déficience intellectuelle et autisme", UPMC, Paris, France.
7. Centre de Référence Déficiences Intellectuelles de Causes Rares Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France
8. Univ. Grenoble Alpes, INSERM, U1216, CHU Grenoble Alpes, Grenoble Institut Neuroscience, Grenoble, France.
9. Department of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA.
10. Texas Children's Hospital, Houston, TX, USA.
11. Department of Neurogenetics, Kennedy Krieger Institute, Baltimore, MD 21205, USA.
12. GeneDx, Gaithersburg, MD 20877, USA.
13. Centre de Référence Anomalies du Développement et Syndromes Malformatifs, Fédération Hospitalo-Universitaire Médecine Translationnelle et Anomalies du Développement (TRANSLAD), Centre Hospitalier Universitaire Dijon et Université de Bourgogne, Dijon, France.
14. Equipe GAD, INSERM LNC UMR 1231, Faculté de Médecine, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France.
15. Department of Neurology, Boston Children's Hospital, Boston, MA 02115, USA.
16. INSERM, U 1127, CNRS UMR 7225, Faculté de Médecine de Sorbonne Université, UMR S 1127, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, Paris, France.
17. Centre de Référence Déficiences Intellectuelles de Causes Rares, Centre Hospitalier Universitaire Dijon, Dijon, France.
18. Department of Clinical Genetics, Amsterdam UMC, Vrije Universiteit Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands.
19. Institute of Human Genetics, University Hospital Essen, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany.
* Corresponding author: godin@igbmc.fr
# These authors contributed equally to this work.

Abstract

KIF21B is a plus-end directed kinesin motor protein highly enriched in neurons that promotes intracellular transport and controls microtubule dynamics. Here we report three de novo and one inherited variants in *KIF21B* in unrelated individuals with neurodevelopmental disorder associated with brain malformations including corpus callosum agenesis (ACC) and microcephaly. By combining *in vivo* studies in mouse and zebrafish larvae, we demonstrated that the expression of *KIF21B* variants specifically recapitulates patients' neurodevelopmental abnormalities, including impaired neuronal positioning, microcephaly and reduced intra- and inter-hemispheric connectivity. We established that missense *KIF21B* variants impede neuronal migration through attenuation of kinesin autoinhibition leading to aberrant KIF21B motility activity. We also showed that the ACC-related KIF21B variant independently perturbs axonal growth and ipsilateral axon branching through two distinct mechanisms, both leading to deregulation of canonical kinesin motor activity. Altogether, our data indicate that impaired KIF21B autoregulation and function play a critical role in the pathogenicity of human neurodevelopmental disorder.

Introduction

The development of the mammalian cerebral cortex critically depends on microtubule (MT)-related processes that coordinate birth, migration and differentiation of excitatory and inhibitory neurons. MT cytoskeleton acts in concert with microtubule associated proteins (MAP) and motor proteins to promote the structural changes that underlie key developmental events such as neurogenesis, migration, neuritogenesis, axon path finding and synapse formation. Kinesin superfamily proteins (KIFs) are important molecular motors that control MT organization and dynamics in both axons and dendrites and mediate intracellular transport of various cargo, including vesicles, organelles, cellular proteins and mRNAs, along MTs[1,2]. The importance of both the force-generating and MT-regulating functions of KIFs for brain development has become evident with loss of function studies demonstrating defects in mitosis[3-9], cytokinesis[10,11], polarity[3], migration[12-14], axonal growth and branching[14-18], survival[19] and synaptogenesis[20-24]. Further reflecting the key role of KIFs in neuronal development, variants in human KIF-encoding genes (*KIF4A*[24], *KIF7*[25-28], *KIF11*[29], *KIF2A*[30-32], *KIF5C*[24,28,30,33], *KIF1A*[28,34], *KIF6*[35], *KIF14*[11,36,37], *KIF26A*[28]) have been associated with various neurodevelopmental disorders, including malformation of cortical development (MCD) (pachygyria, microcephaly, lissencephaly, polymicrogyria, subcortical band heterotopia), acrocallosal syndrome, ciliopathies, epilepsy and intellectual disability. Most KIF variants have been predicted to be highly pathogenic *in silico* but their direct implication in disease and the underlying pathophysiological mechanisms have only been elicited for only a few of them[11,26,35,38].

The MT-plus-end directed kinesin-4 motor KIF21B is mainly expressed in spleen, testes and central nervous tissues and is particularly enriched in neurons[39,40]. Within neurons, KIF21B is present in both axons and dendrites and especially abundant in growth cones[40,41]. KIF21B plays dual functions in neurons. First, it promotes intracellular transport through its N-terminal processive motor activity[21,42-44]. However, except for BDNF-TrkB signaling endosomes[44], 2-subunit-containing GABAA receptor[45] and neurobeachin recycling endosomes[43], our knowledge of KIF21B-transported cargoes is very limited. Second, KIF21B influences MT dynamics through distinct MT binding domains[21,42,44]. KIF21B positively regulates MTs dynamicity in dendrites by favoring MT growth and catastrophes[21,44]. In addition, *in vitro* studies demonstrate that KIF21B can also act as a MT pausing factor by accumulating at the MT plus ends[42]. Notably, KIF21B functions can be modulated by neuronal activity, which favors KIF21B trafficking activity at the expense of MT dynamics regulatory function[44] as well as through an autoinhibitory interaction between the N-terminal motor domain and an internal regulatory coiled-coil region (rCC)[42,46].

KIF21B homozygous knockout (KO) mice display severe morphological abnormalities including microcephaly and partial loss of commissural fibers[47], cognitive deficits[21,43,48] and altered synaptic transmission[21,23]. Together with the reduced dendritic complexity and spines density observed in KIF21B$^{-/-}$ neurons in culture[21], these results highlight a critical role for KIF21B in brain development and function. Though, there are no clear *KIF21B*-related neurodevelopmental disorders, a duplication of the locus bearing *KIF21B* has been found in individuals with neurodevelopmental delay and intellectual disability (ID)[49], and abundant KIF21B expression has been associated with disease severity in Alzheimer's disease[50]. In addition, the *KIF21B* gene has been identified as a susceptibility locus for several inflammatory diseases including multiple sclerosis, Crohn's disease and ankylosing spondylitis[51-56].

Here we provide the first evidence of a causal relationship between variants in *KIF21B* and neurodevelopmental disorders. We report the identification of three missense variants and one truncating variant in patients with neurodevelopmental delay associated and brain malformations including corpus callosum (CC) agenesis (ACC) and microcephaly. By combining *in vivo* modelling tools, we show that KIF21B pathogenic variants impede neuronal migration and connectivity through at least two distinct mechanisms both leading to dysregulation of canonical kinesin motor activity. Taken together our data suggest that *KIF21B* is a novel gene for intellectual disability associated with heterogeneous brain morphological anomalies.

Results

Identification of human *KIF21B* variants

Using trio whole exome sequencing, we identified a *de novo* variant (c.2032A>C, p.Ile678Leu) in the *KIF21B* gene in a first patient (P1) presenting with developmental delay, learning and motor disabilities, associated with isolated complete agenesis of the corpus callosum (**Fig.1a,e**, **Table 1**, **Supplementary Note**). Through the GeneMatcher platform[57], variants in *KIF21B* were found in three additional patients. Patient 2 (P2) (c.937C>A, p.Gln313Lys) presented with severe ID associated with microcephaly (**Fig.1b,f**); Patient 3 (P3) (c.3001G>A, p.Ala1001Thr) presented with global developmental delay and mild to moderate ID (**Fig.1c**) but normal brain structure at the MRI. This variant was inherited from the father, who presented with developmental delay and learning difficulties; and Patient 4 (P4) (c.2959_2962dup, p.Asn988Serfs*4) presented with mild developmental delays and hypotonia, but no brain structural anomalies on brain MRI (**Fig.1d-g**). The three identified *KIF21B* (NM_001252100.1) missense variants occur within highly conserved residues positioned in the motor domain (c.937C>A, p.Gln313Lys - P2), the coiled-coil domain (c.3001G>A, p.Ala1001Thr - P3), and

the regulatory coiled-coil (rCC) region (c.2032A>C, p.Ile678Leu - P1) (**Fig.1h, Supplementary Fig. 1a-c**). The fourth variant is a duplication (c.2959_2962dup, p.Asn988Serfs*4 - P4) that leads to the introduction of a premature termination codon in exon 20. RT-qPCR analysis and sequencing of *KIF21B* transcripts isolated from P4's blood revealed haploinsufficiency, likely due to the degradation of the mutant mRNA by nonsense-mediated decay (NMD) (**Supplementary Fig. 1d,e**). All variants were predicted pathogenic by *in silico* software (Polyphen-2, Mutation Taster, SIFT and CADD; **Supplementary Fig. 1f**) and co-segregated with the phenotype in each pedigree (**Fig.1a-d**). Of note, we found two other *de novo* variants of unknown significance in patients: one hemizygous variant in *ARHGAP4* (chromosome X) in P1 that also segregated in his healthy brother and one *de novo* in *UBR3* (NM_172070.3, c.5023G>C; p.Glu1675Gln) in P4, that showed a weak pathogenic score based on in silico predictions. None of the four *KIF21B* variants is reported in public databases, including dbSNP, 1000 Genomes and gnomAD. Overall, using whole exome sequencing, we identified variants in *KIF21B* gene in four patients presenting with mild to severe neurodevelopmental delay associated with heterogeneous brain malformations (**Table 1**, **Supplementary Note**).

Kif21b expression is restricted to neurons throughout mouse cortical development

We first examined the expression pattern of Kif21b in the mouse developing cortex. Although levels of *Kif21b* mRNA transcripts are rather stable during development (**Fig. 2a**), protein expression tends to increase from embryonic day (E) 12.5 to postnatal day (P) 2 (**Fig. 2b**). Mouse (m)*Kif21b* transcripts were detected both in ventral and dorsal telencephalons. m*Kif21b* transcripts were mostly observed in the cortical plate and almost entirely excluded from the ventricular (VZ) and subventricular (SVZ) zones, where progenitors and newborn neurons reside (**Supplementary Fig. 2a**). As corticogenesis proceeds, m*Kif21b* mRNAs accumulated in the intermediate zone which is enriched in growing axons (**Supplementary Fig. 2a**). Immunolabelling of E12.5 to E18.5 embryo brain sections showed a restricted expression of Kif21b proteins to postmitotic compartments of the neuronal epithelium with a particularly intense signal in the axon-rich zone (**Fig. 2c** and **Supplementary Fig. 2b,c**). Kif21b staining specificity was validated by the absence of labelling in *Kif21b* knock-out brain sections at birth (**Supplementary Fig. 2e,f**). Further immunostainings with antibodies against mKif21b and βIII-Tubulin or Tbr2 that label neurons and intermediate progenitors respectively, confirmed that Kif21b is exclusively expressed in post-mitotic neurons at all stages of development (**Fig. 2c,d** and **Supplementary Fig. 2b,c**). To undoubtedly exclude any expression of Kif21b in progenitors, we analyzed Kif21b protein in progenitor (YFP-; CD24-) and neuron populations (YFP+; CD24+) isolated from Rosa26-loxSTOP-YFP; $NEX^{CRE/+}$ E16.5 cortices by fluorescent-activated cell sorting (FACS). No Kif21b protein was detected in cortical

progenitors by immunoblotting (**Supplementary Fig. 2d**). Although Kif21b was previously thought to be mainly localized to dendrites[40], our data suggest an axonal localization in the developing cortex (**Supplementary Fig. 2b**). To ascertain the axonal distribution of Kif21b, we used a 2-chambers microfluidic device to analyze separately the axons from cell bodies and dendrites[58] (**Fig. 2e,f**). Channels separating both chambers are 450 μm long so only axons from neurons located in the proximal compartment can reach the distal chamber[58]. Immunolabellings of mouse primary cortical neurons with Kif21b and Tau antibodies in these devices confirmed the expression of Kif21b in Tau-positive axons and its accumulation at the axonal tips (**Fig. 2e,f**). Kif21b is thus moderately but stably expressed in both dendrites and axons of postmitotic neurons from early to late corticogenesis.

KIF21B variants impair radial migration of projection neurons

To evaluate the pathogenic nature of *KIF21B* variants, we first assessed the consequences of overexpressing *KIF21B* variants on neuronal migration using *in utero* electroporation in mice. Given that KIF21B is a post-mitotic kinesin, we used plasmids allowing expression of human KIF21B under the control of the NeuroD promoter (NeuroD-hKIF21B). Transfection in N2A neuroblastoma cell line showed even expression of wild-type (WT) and all three missense hKIF21B variants by Western Blot, suggesting that p.Gln313Lys, p.Ile678Leu and p.Ala1001Thr missense variants are unlikely to affect the production, stability or turnover of the hKIF21B proteins (**Supplementary Fig. 3a**). Consistently, cycloheximide chase experiments in N2A cells revealed a similar half-life of WT and mutant hKIF21B proteins (**Supplementary Fig. 3b**). Using immunofluorescence, we further compared the localization of the wild-type (WT) and the three missense mutant proteins in primary cortical neurons transfected with pcDNA-HA-hKIF21B cDNA constructs (**Fig. 3a, Supplementary Fig. 3c**). WT and mutant proteins showed the same homogeneous distribution in soma and neurites in cortical neurons at DIV2 (days *in vitro* 2) (**Fig. 3a**).

To investigate the effects of the variants on neuronal positioning, we individually induced neuron-specific expression of the hKIF21B mutants using *in utero* electroporation of NeuroD-hKIF21B construct together with a NeuroD-IRES-GFP reporter plasmid in mouse embryonic cortices at E14.5. Four days after *in utero* electroporation, while most of the GFP+ postmitotic neurons expressing full length WT hKIF21B reached the cortical plate as in the control (**Fig. 3b**), neurons expressing missense variants accumulated in the intermediate zone, with a decrease of 27.7%, 60.3% and 23% of the cells reaching the upper cortical plate in the p.Gln313Lys, p.Ile678Leu and p.Ala1001Thr conditions, respectively (Bonferroni adjusted $P = 0.0001$) (**Fig. 3c**). Noteworthy, hKIF21B missense variants likely disturbed neuronal migration in a cell-autonomous manner

as their expression did not affect cell survival and glia scaffold integrity (**Supplementary Fig. 3d** and data not shown). To assess the functional consequences of the p.Asn988Serfs*4 protein truncated variant (**Supplementary Fig. 1d**), we silenced *Kif21b* specifically in post-mitotic neurons using *in utero* electroporation of CRE-dependent inducible shRNA vector[59] together with a NeuroD-CRE-IRES-GFP construct at E14.5. Efficacy of the two shRNAs was confirmed by RT-qPCR (-61,4% for sh-*Kif21b* #1, -45,1% for sh-*Kif21b* #2) (**Supplementary Fig. 3e**). Four days after *in utero* electroporation, *Kif21b*-silenced neurons displayed migration defects compared to control shRNA-electroporated cells with a reduction of 23.5% and 32.2% of cells distributed in the upper cortical plate for sh-*Kif21b* #1 and sh-*Kif21b* #2, respectively (**Supplementary Fig. 3f,g**). To note, the migratory phenotype induced by sh-*Kif21b* #2 was fully recovered by co-electroporation of wild-type NeuroD-mKif21b construct (**Supplementary Fig. 3f,g**). Most of the cells overexpressing the p.Gln313Lys and p.Ala1001Thr mutants or silenced for *Kif21b* showed a correct positioning with nearly all cells found in the upper layer of the cortex after birth, indicating a delay in migration rather than a permanent arrest (**Supplementary Fig. 3h-i** and data not shown). By contrast, the p.Ile678Leu variant induced a permanent migration defect as a large number of p.Ile678Leu-expresing neurons remained in the white matter and deep-layers at P2, P4, P8 and P22 (**Supplementary Fig. 3h,i, Fig. 5a and Fig. 6a,e, Supplementary Fig. 5a,e**). Remarkably, p.Ile678Leu-expressing projection neurons permanently arrested in the white matter were expressing the upper-layer marker Cux1, which supports a faulty neuronal migration rather than specification defects (**Supplementary Fig. 3j**). Altogether, these results demonstrate that missense KIF21B variants and *KIF21B* haploinsufficiency impede, to various extents, the radial migration of projection neurons.

KIF21B **missense variants lead to aberrant KIF21B motility activity in migrating neurons by relieving KIF21B autoinhibition**

To understand the molecular mechanisms by which variants in h*KIF21*B gene lead to defective radial migration, we tested for restoration of the hKIF21B variant-induced phenotype by increasing amount of wild-type protein. *In utero* electroporation of wild-type hKIF21B together with hKIF21B mutant at a 1:1 or 1.5:1 ratio failed to rescue the migration phenotype (**Fig. 3b,c** and data not shown). Strikingly, neurons overexpressing large amount of WT hKIF21B (2 units of NeuroD-hKIF21B) failed to reach the upper cortical plate four days after *in utero* electroporation (**Fig. 3d,e**). Collectively, these results raise the possibility that *KIF21B* variants impair migration by enhancing KIF21B activity in a dominant manner. One possible mechanism by which hKIF21B mutants exert this effects is by relieving autoinhibition imposed by the rCC to the motor domain as shown for CFEOM-causing variants in KIF21A[46,60,61], a kinesin-4 family member that shares 61% identity with

KIF21B[40]. Consistent with the hypothesis that KIF21B hyperactivation cause migration phenotypes, expression of a truncated mouse mKif21b protein that lacks the rCC domain (1 unit of NeuroD-mKif21bΔrCC) led to faulty migration (**Fig. 3f,g**). To test whether identified variants alter KIF21B autoinhibition, we next sought to explore the functions of KIF21B that were enhanced by KIF21B autoinhibition release in mutant conditions. Given the processive activity of the motor domain, we tested the effect of expressing an immotile KIF21B mutant protein on neuronal migration. We performed *in utero* electroporation of truncated WT and p.Ile678Leu hKIF21B that lacks the ATP binding domain (NeuroD-p.Ile678Leu-ΔATPhKIF21B; **Fig.1h**) in wild-type E14.5 mouse cortices. While half of the neurons expressing the p.Ile678Leu hKIF21B variant were trapped in the IZ at E18.5, only 17% of the cells expressing the immotile p.Ile678Leu variant (NeuroD-p.Ile678Leu-ΔATPhKIF21B) showed an impaired distribution (**Fig. 3h,i**), demonstrating that preventing the motility of the mutant protein decreases the severity of the migration phenotype. Notably, these neurons only showed a delayed migration, with all cells reaching the cortical plate at P8 (**Fig. 6a,e**). These results confirmed that the mutant protein impairs radial migration at least by enhancing KIF21B motility activity through lessening of the kinesin autoinhibition (**Fig. 3j**). Collectively, our data indicate that modulation of kinesin autoregulation is critical in KIF21B-associated cortical migration phenotypes.

Overexpression of *KIF21B* p.Gln313Lys variant reduced head size in zebrafish

Considering the presence of microcephaly in the subject with p.Gln313Lys variant, we next asked whether this mutant could induce head size defects in an appropriate *in vivo* animal model. We therefore turned toward the developing zebrafish embryo, a model that has been extensively used for microcephaly modeling, the measure of head size being a relevant proxy for brain size[62,63]. zKIF21B protein is broadly distributed in zebrafish larval brain at five days post-fertilization (dpf), a stage characterized by strong upregulation of *zKIF21B* transcripts (**Supplementary Fig.4a,b**). Larvae injected with p.Gln313Lys human mRNA showed a significant and physiologically relevant reduction of head size compared to control at 5 dpf (-6%, Welch two sample t-test P=1.185x10^{-9}), therefore exhibiting a phenotype analogous to the microcephaly observed in the human clinical condition (**Fig.4**). By contrast, introduction of WT mRNAs or the two other missense variants (p.Ala1001Thr and p.Ile678Leu), that do not lead to head circumference defects in patients, barely affected zebrafish head size (**Fig.4**, **Supplementary Fig.4c,d**). These data suggest that this particular p.Gln313Lys variant in the motor domain of KIF21B likely drives the microcephaly phenotype observed in the individual carrier.

p.Gln313Lys *KIF21B* variant overexpression in mice does not impair cortical progenitor proliferation

We next sought to understand the mechanisms by which the p.Gln313Lys variant impairs brain size. Expression of hKIF21B missense variants in mouse cortical neurons did not induce cell death (**Supplementary Fig. 3d)**, excluding the possibility that the microcephaly phenotype arises from a poor survival of neurons. Although KIF21B expression is restricted to neurons, we further tested whether expression of the p.Gln313Lys variant could non-cell autonomously affect the progenitors' biology. We performed *in utero* electroporation of NeuroD-p.Gln313Lys-hKIF21B at E14.5 in wild-type cortices and analyzed the progenitors located in the electroporated area at E16,5. The total number and the proliferative fraction (Ki67+) of both apical (Pax6+) and intermediate progenitors (Tbr2+) were indistinguishable from control condition (**Supplementary Fig. 4e-j**), suggesting that the brain size phenotype induced by the p.Gln313Lys KIF21B variant was unlikely to have arisen from impaired neurogenesis. Altogether these results suggested that neither impaired birth nor poor survival of neurons or their progenitors contributed to the microcephaly phenotype observed in the subject with the p.Gln313Lys variant.

p.Ile678Leu KIF21B variant expression in callosal neurons impedes axonogenesis but not midline crossing nor terminal branching

The corpus callosum, the major commissure connecting the two cerebral hemispheres, is formed of hundreds of millions of axons projecting contralaterally from the callosal projection neurons. Callosal axons cross the midline around birth to reach, in the first postnatal week, the contralateral cortex where they branch extensively at layer II/III and V (reviewed in[64]). Given the corpus callosum agenesis in the patient carrying the p.Ile678Leu variant, we investigated how the missense variants in hKIF21B lead to aberrant interhemispheric connectivity by introducing wild-type (WT) or mutant cDNA (NeuroD-hKIF21B) together with a mScarlet-expressing vector (pCAG2-mScarlet) in wild-type callosal projection neuron via *in utero* electroporation of E15.5 mouse cortical progenitors. The p.Gln313Lys substitution variant was used as a negative control as we did not expect any commissural defects according to the patient clinical features (**Table 1**). At P4, soon after the axons cross the midline and at P8, when axons start invading the contralateral cortical plate, neither the expression of WT-hKIF21B nor of any of the variants perturbed midline crossing, as indicated by an equivalent scarlet intensity on each side of the CC (**Fig. 5a-c, Supplementary Fig. 5a-c**). In addition, at P22, when callosal axons achieve their adult-like arborization pattern, axons correctly invaded the homotopic contralateral cortex and successfully branched in layer II-III and V in all conditions (**Supplementary Fig. 5g,h**). Nonetheless, expression of the p.Ile678Leu, but not WT nor p.Gln313Lys mutant reduced by half the density of scarlet-positive axons in the white matter compared to the control both at P4 and P8 (-49.7% at P8, *P*=0.0043) (**Fig.**

5a,b,d, Supplementary Fig. 5a,b,d). These defects were unlikely due to delayed innervation, as the poor interhemispheric connections persisted at P22 (**Supplementary Fig. 5e,f**). Rerouting through alternate commissures was also excluded as no aberrant axonal projections were observed after electroporation of callosal neurons and as no other commissures were shown enlarged in the patient (P1). Altogether, these results indicate that the faulty CC innervation is due to an impaired axonal growth rather than to defective contralateral targeting. Accordingly, we measured the length of the longest neurites in primary cortical neurons transfected with pcDNA-HA-hKIF21B cDNA constructs. While primary cortical neurons expressing WT hKIF21B or p.Ala1001Thr and p.Gln313Lys hKIF21B variants showed normal axonal growth, expression of p.Ile678Leu mutant severely impaired axonogenesis at DIV2 and DIV5 (**Fig. 5f,g, Supplementary Fig. 6a,b**). To dig deeper into the pathogenic mechanism of the p.Ile678Leu hKIF21B variant, we performed a complementation experiment by co-electroporating p.Ile678Leu hKIF21B with increasing amounts of WT hKIF21B at E15.5 and analyzed the percentage of projecting neurons at P8. Equivalent amounts of WT hKIF21B failed to rescue the CC innervation phenotype (**Fig. 5b,e**). Further *in vitro* analysis of neurite length in primary cortical neurons expressing WT hKIF21B together with p.Ile678Leu hKIF21B mutant at a 1:1 ratio confirmed the lack of rescue of axonal growth (**Fig. 5f,g**). We next reasoned that the p.Ile678Leu variant might exert its effect through attenuation of KIF21B autoinhibition. Accordingly, primary neurons transfected with two units of NeuroD-hKIF21B displayed shorter longest neurites *in vitro* (**Fig. 5f,g**), suggesting that enhanced KIF21B activity induces axonogenesis defects. To corroborate these findings *in vivo*, we assessed the ability of neurons electroporated with ΔATP p.Ile678Leu variant (NeuroD-p.Ile678Leu-ΔATPhKIF21B) to project axons contralaterally at P8 (**Fig. 5b,c,e**). There was no significant difference between the control and the immotile p.Ile678Leu-ΔATPhKIF21B, suggesting that the p.Ile678Leu variant impedes CC innervation through aberrant motor activity. Consistent with a hyperactivation of KIF21B, neurons expressing NeuroD-mKif21bΔrCC failed to project axons at P8 (**Fig. 5b,e**). Altogether these results indicate that the loss of interhemispheric connectivity induced by the p.Ile678Leu hKIF21B variant, and the subsequent release of KIF21B autoinhibition, arises from impaired axonal growth rather than defective innervation and arborization in the contralateral cortex.

hKIF21B p.Ile678Leu variant cause defects in the formation of ipsilateral intracortical axon collaterals through dysregulation of kinesin motility

Callosal neurons not only branch contralaterally, but also send multiple ipsilateral axon collaterals within layer II-III and even more strongly to layer V. Since the p.Ile678Leu hKIF21B variant affects the interhemispheric

connectivity, we next examined if this hKIF21B missense variant also impacts the establishment of intracortical connections. We therefore performed *in utero* electroporation of WT and mutant hKIF21B in wild-type embryos at E15.5 and analyzed ipsilateral cortical collaterals at P8. While callosal neurons expressing WT or p.Gln313Lys hKIF21B displayed prominent ipsilateral branching, overexpression of the p.Ile678Leu variant greatly reduced the intracortical branching (-32%, Bonferroni adjusted *P*=0,0016) (**Fig. 6a-c**). These branching defects likely arose from impaired collateral growth as revealed by *in vitro* analysis of axon branching in primary neurons at DIV5. Expression of p.Ile678Leu hKIF21B variant but not WT nor p.Gln313Lys or p.Ala1001Thr mutants led to a shift of branch length toward short branch classes that resulted in a large decrease of the mean length of axon collaterals (**Fig. 6f,g, Supplementary Fig. 6a,c,d**). Co-electroporation of p.Ile678Leu hKIF21B variant with either half or equivalent dose of WT hKIF21B gradually restored the intrahemispheric connectivity phenotype, suggesting that p.Ile678Leu hKIF21B possibly impairs formation of ipsilateral collaterals through a dominant negative mechanism (**Fig. 6a,b,d**). Notably, migration defects were not rescued in these experiments (**Fig. 6e**) demonstrating that the branching phenotype is not an indirect consequence of neuron mispositioning. Conversely, p.Ile678Leu-ΔATPhKIF21B overexpressing neurons that migrated normally (**Fig. 6e**), failed to send axonal collaterals ipsilaterally in layer V (**Fig. 6a,b,d**). Also, those neurons (p.Ile678Leu-ΔATPhKIF21B) showed normal axonal growth (**Fig. 5b,c,e**), ruling out the possibility that defective intracortical branching arises from impaired axonogenesis (**Fig. 6a,b,d**). Consistent with a dominant negative effect, intrahemispheric connectivity is not affected upon KIF21B hyperactivation with neurons expressing NeuroD-mKif21bΔrCC displaying normal ipsilateral collaterals (**Fig. 6a,b,d**). We finally investigated which function of WT hKIF21B was negatively modulated by the mutant protein. We induced expression of p.Ile678Leu variant together with hKIF21B that either cannot bind (NeuroD-ΔATPhKIF21B; **Fig.1h**) or hydrolyze ATP (T96N-hKIF21B; **Fig.1h**)[21] at a 1:1 ratio using *in utero* electroporation at E15.5. Both constructs failed to rescue the branching phenotype induced by p.Ile678Leu hKIF21B at P8, suggesting that p.Ile678Leu hKIF21B exerts its dominant negative effect on the processive activity of KIF21B (**Fig. 6a,b,d, Supplementary Fig.3a**). Collectively, our results showed that the p.Ile678Leu variant alters the intrahemispheric connectivity beyond its effect on migration and axonal growth through a dominant negative effect on motility.

Discussion

Our findings highlight the critical role of KIF21B in the regulation of processes involved in cortical development and implicate variants in *KIF21B* in intellectual disability and brain malformation. We report one transmitted

and three *de novo* variants in four patients who all presented with intellectual disability. Two of the patients also presented with brain anomalies including ACC and microcephaly. We identified three missense variants and one duplication of four nucleotides. The duplication leads to a frameshift introducing a premature termination codon in exon 20. The resulting mutant mRNA is likely degraded by nonsense-mediated mRNA decay. We argue the pathogenicity of the p.Asn988Serfs*4 variant because it occurs *de novo* in Patient P4 and we demonstrated in mice that *Kif21b* haploinsufficiency leads to an impaired neuronal positioning (**Supplementary Fig.3e-g**). However, h*KIF21B* gene might partially tolerate loss-of-function variants. Indeed, in the gnomAD (Genome Aggregation Database, v2.1.1 “non-neuro”) populations that is supposed to be depleted in severe pediatric conditions, 28 loss-of-function variants have been reported. Nontheless, the ratio of the observed/ expected loss-of-function variants in the gnomAD populations is low (0.32, confidence interval 0.23-0.43), still questioning the penetrance of loss-of-function variants in *KIF21B*. We cannot exclude that the *de novo* variant in *UBR3* found in the patient carrying the *KIF21B* duplication variant (P4) also contributes to his phenotype.

The p.Gln313Lys and p.Ile678Leu missense variants are heterozygous mutations occurring de novo, suggesting that they exert their pathogenicity through a dominant mechanism. By inducing the expression of the three missense variants (p.Gln313Lys, p.Ala1001Thr, p.Ile678Leu) in mouse and zebrafish, we solely recapitulate the human phenotypes associated with each variant. As such, the expression of the microcephaly-related p.Gln313Lys variant reduces head size but does not alter the formation of the cortical commissure. Conversely, the expression of the ACC-related p.Ile678Leu variant impedes cortical intra- and inter-hemispheric connectivity without having any effect on brain size.

Our study provides the molecular mechanisms by which the identified variants lead to an abnormal brain phenotype. We showed that all missense variants, to various extents, impaired neuronal migration by enhancing KIF21B motor activity. Several lines of evidence suggest that the variants-induced overactivation of hKIF21B is a result of a lessening of KIF21B autoinhibition (**Fig. 3**). First, the phenotype induced by overexpression of the variants is phenocopied by the expression of a constitutively active form of KIF21B (that is truncated for the rCC domain). Second, reduction of the processivity of the mutant protein decreases the severity of the migration phenotype. Interestingly, our data from in utero electroporation suggest that WT-hKIF21B is unable to rescue the variant-induced migratory defects at equivalent dose, suggesting a possible gain of function effect of the missense variants (**Fig. 3b,c**). According to our study, hKIF21B mutants likely exert their gain-of-function effect by relieving autoinhibition. However, we cannot totally rule out a dominant

negative mechanism because: 1) expression of WT hKIF21B alters neuron distribution in a dose-dependent manner (**Fig. 3d,e**); and 2) expression of an immotile mutant protein still induce a slight phenotype (**Fig. 3h,i**). How do hKIF21B variants lead to autoinhibition release? KIF21B autoinhibition is mediated by a regulatory segment (rCC) within the second coiled-coil domain (CC2, **Fig.1h**) that fastens the CC2 domain to the motor head[42,46]. Like observed in CFEOM1-causing variants in h*KIF21A*[46,60,61], identified variants in h*KIF21B* are likely disrupting this intramolecular interaction. Accordingly, one of the KIF21B mutated residues, p.Ala1001, aligns with the p.Ala1008 KIF21A CFEOM1-associated amino acid and when mutated, it perturbs the inhibitory interaction within KIF21A[60]. It has been demonstrated in other kinesins that intramolecular interaction can also prevent the homodimerization of the protein and the formation of a functional two-headed motor domain (reviewed in[65]). Because KIF21B acts as a homodimer[42,44], the variants could also exacerbate its motor function by favoring the oligomeric state at the expense of the autoinhibited state. In any case, these models raise the possibility that the level of disruption of these interactions correlates with the degree of autoinhibition release imposed by the different missense variants and therefore dictates the severity of the phenotype. We hypothesize that the position of the identified missense variants within the motor (p.Gln313Lys), coiled-coil (p.Ile678Leu) and regulatory coiled-coil (p.Ala1001Thr) domains (**Fig. 1h**) alters the protein conformation so that it varies the impact on the intramolecular interaction between the motor and the internal coiled-coil domains. We propose a model in which a minimal level of autoinhibition is required to ensure proper function of KIF21B in the developing cortex. Below this threshold, the more KIF21B gets overactivated, the more severe and broad the phenotypes will present. In this model, the p.Gln313Lys and p.Ala1001Thr variants would partially relieve autoinhibition while the p.Ile678Leu variant would completely loose autoinhibition. Consistently, p.Gln313Lys and p.Ala1001Thr KIF21B induce a delay of migration, whereas the p.Ile678Leu variant leads to a permanent arrest of migration and an additional connectivity phenotype (**Fig. 3**, **Fig. 5**, **Supplementary Fig. 3)**. Further validating the model and confirming a nearly complete abolishment of autoregulation of this variant, the spectrum and intensity of the phenotypes induced by the p.Ile678Leu variant are very similar to those observed upon expression of the constitutively active form (ΔrCC) of KIF21B (**Fig. 3**, **Fig. 5**). As an alternative model, enhanced stability of the mutant proteins might also dictate the severity of the observed phenotypes. However, our data showing similar half-lives of mutant proteins rule out this possibility. Intriguingly, although autoinhibition conformation has been shown to inhibit both the processive activity and the MT regulatory function of KIF21B[42], loss of ATP binding seems sufficient to abrogate the phenotype induced by the ACC-related variant (p.Ile678Leu-ΔATPhKIF21B; **Fig. 3**; **Fig. 6**), suggesting that the mutant protein exerts its gain of function effect uniquely by enhancing KIF21B motility activity. However, in addition to the processive activity,

ADP-ATP cycling is also required for the binding of KIF21B motor domain to MT[42,44], raising the possibility that the p.Ile678leu variant also exacerbates the function of KIF21B on the regulation of MT dynamics. However, the contribution of this ATP-dependent MT binding domain to the KIF21B-dependent regulation of MT dynamics is controversial[21,42,44]. Conversely, the fact that KIF21B autoinhibition has been shown to regulate the ability of KIF21B to induce pausing at the MT plus ends *in vitro*[42] leaves the hypothesis open. Therefore it remains possible that depending on the conformation adopted by the variants, one or several KIF21B functions would be enhanced, further explaining the severity and range of the phenotypes associated with the corresponding variants. Similarly, KIF21B has been shown to be essential in defining the duration of Rac1 activation[48]. Interestingly, depletion of Rac1 or of its effector PAK1 (p21-activated kinase) leads to both migration and connectivity defects in mouse brain[66-70]. Because the function of KIF21B on Rac1/PAK1 pathway involves interaction within its second coiled-coil domain[48], it is tempting to postulate that disruption of Rac1 activity participates to the phenotype induced by KIF21B variants through conformational changes. p.Ile678Leu could specifically alter this function, thus conferring the severity of the p.Ile678Leu phenotype. More generally, given their position in different structural and functional domains of the protein, the various hKIF21B variants could differently impair the 3D arrangement of the protein and specifically alter protein interaction. In the absence of crystal structure for KIF21B, modeling of KIF21B motor domain and coiled-coil or rCC domains based on homology with KIF21A[46] or other kinesins, would reveal relevant information relative to the position of the mutated residues within the secondary structure of the KIF21B polypeptide.

Beyond autoinhibition, maintaining a proper level of KIF21B activity seems to be crucial for its function during development. Indeed, *KIF21B* haploinsufficiency also leads to migratory defects. Whether those defects are caused by a loss of trafficking or MT regulator functions is not clear and should be further assessed. Overall, the model could be expanded to a threshold of activity, below (haploinsufficiency) or above (identified missense variants) which KIF21B would not be properly functional leading to neurodevelopmental defects.

Convergent evidence suggests that the p.Ile678Leu variant alters axon branching through a dominant negative effect on KIF21B processivity (**Fig. 6**). First, co-expression of increasing amount of WT-hKIF21B together with the mutant protein gradually restored the intrahemispheric connectivity phenotype. Second, an immotile form of KIF21B failed to rescue the variant-induced branching defect. Third, expression of a constitutive active form (ΔrCC) of KIF21B does not affect the formation of axon branches. Fourth, p.Ile678Leu-ΔATPhKIF21B overexpressing neurons display abnormal ipsilateral collaterals. Intriguingly, the p.Ile678Leu variant also perturbs axonal growth (**Fig. 5**) and migration (**Fig. 3**) through attenuation of autoinhibition, suggesting, as

discussed above, a possible gain-of-function effect. To reconcile these seemingly conflicting findings, we propose that it could imply that KIF21B regulates the trafficking of different cargoes in axon and branches. p.Ile678Leu-induced overactivation of KIF21B might therefore lead to excessive motility of specific cargoes within axons. Conversely, the same variant could impede the transport of branch-specific cargoes by interfering with the function of the wild-type protein. At this time, none of the few KIF21B cargoes identified is specific to axon or branches[44,45], so further work is needed to identify cargoes in the different cellular compartments and validate this hypothesis. Similarly, KIF21B binding partners may differ from one cellular compartment to the other. It is also possible that the p.Ile678Leu variant reduces mitochondria immobilization at nascent presynaptic sites, a prerequisite for axon branching but not for axonal growth and maintenance[71]. This could rely on i) a direct effect on mitochondria motility; ii) an indirect effect on BDNF transport or on LBK1/NUAK1 pathway activation, both required for immobilization of mitochondria[71,72], or iii) other unknown mechanisms. Finally, as has been described for kinesin-1, KIF21B autoinhibition might help restrict the localization of organelles in a defined compartment[73]. One can conceive that attenuation of KIF21B autoinhibition limits axonal growth through mislocalization of some organelles or vesicles required for axonogenesis in dendrites and vice versa.

Expression of the KIF21B p.Gln313Lys variant recapitulates the microcephaly phenotype observed in the reported subject. Given that introduction of the p.Ala1001Thr variant that is expected to attenuate KIF21B autoinhibition at the same extent as the p.Gln313Lys substitution variant, but does not reduce brain size in zebrafish (**Fig. 5**), the hyperactivation of KIF21B is unlikely to be driving the phenotype of microcephaly. In a search for possible microcephaly-underlying mechanism, we exclude any non-cell autonomous effect on progenitors' proliferation, or any impact on cell survival. Abnormal postnatal neuronal maturation may also contribute to the global microcephaly phenotype. Accordingly microcephaly may worsen with time: the patient carrying the KIF21B p.Gly313Lys variant was born with a head circumference (HC) of 32 cm (5th percentile), but microcephaly progressed and at the age of 12 was 48.5 cm (<1st percentile, -3,9SD). These maturation defects may result from regulation of neuronal soma size[74-76] or from connectivity defects. Although the axonal branching is not impaired in callosal neurons overexpressing the microcephaly-related variant, we cannot rule out the possibility that reduced dendritic arborization of projection neurons influences the microcephaly phenotype. Interestingly, those possible maturation phenotypes might be a consequence of delayed migration of the projection neurons. Neurons overexpressing the p.Gln313Lys variant might be subject to inappropriate spatiotemporal signals during migration within the cortical plate.

In conclusion, the mechanism proposed in our study for the role of KIF21B in attenuating (p.Gln313Lys and p.Ala1001Thr) or abrogating autoinhibition (p.Ile678Leu) of one or several kinesin functions, might be expanded to other kinesins (KIF1A[28], KIF5C[30], KIF7[26], KIF4A[24]) known to be regulated by autoinhibition and for which the pathophysiological mechanisms underlying the migration and interhemispheric connectivity phenotypes have not yet been elucidated. In addition, autoinhibition of kinesins has been implicated in several physiological processes including the regulation of innervation, synaptogenesis and compartment-specific localization of cargo[60,61,73,77]. Our results indicate that fine-tuning of KIF21B activities is critical for proper neuronal migration and axonal growth, adding novel physiological roles of kinesin autoinhibition.

Online methods

Whole exome sequencing (WES)

A parent-offspring trio approach was used for whole exome sequencing (WES) in each family. Exomes were sequenced using DNA isolated from blood according to standard procedures. Informed consent was obtained from all participants in accordance with site-specific institutional review board.

Patient 1: The SeqCap EZ MedExome Enrichment Kit (Roche) was used for library preparation with 12 samples multiplexing, according to manufacturer's protocol. This library was then sequenced on a NextSeq 500 (Illumina) with a 2x150bp high output flowcell. The bioinformatic analyses was conducted by Polyweb using BWA 0.7.12, picard-tools-1.121, GenomeAnalysisTK-2014.3- 17-g0583013, SNPEff-4.2.

Patient 2: The SeqCap EZ VCRome 2.0 (Roche) was used for library preparation. Exome libraries were sequenced on an Illumina HiSeq 2500 instrument and the following sites are used to search for previously described gene pathogenic variants and polymorphisms: the Human Gene Mutation Database (HGMD), the single Nucleotide Polymorphism database (dbSNP), 1000 genomes, HapMap data.

Patient 3: Exome capture was done using the Nimblegen SeqCap_EZ_Exome_v3 (Nimblegen). Exome libraries were sequenced on an Illumina HiSeq instrument (Illumina, San Diego, USA) with 150bp paired-end reads at a median coverage of 100x. Sequence reads were aligned to the hg19 reference genome using BWA. Variants were subsequently called by the GATK unified genotyper, and annotated using a custom diagnostic annotation pipeline.

Patient 4: Exome was captured using the Clinical Research Exome kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Massively parallel (NextGen) sequencing was done on an Illumina system with 100bp or greater paired-end reads. Reads were aligned to human genome build GRCh37/UCSC hg19, and analyzed for sequence

variants using a custom-developed analysis tool. Additional sequencing technology and variant interpretation protocol has been previously described[78]. The general assertion criteria for variant classification are publicly available on the GeneDx ClinVar submission page (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/submitters/26957/)

Cloning and plasmid constructs.

Wild-type (WT) human *KIF21B* cDNA (NCBI Reference Sequence: NM_001252100.1) was obtained from Vector Builder by gene synthesis and subcloned by restriction-ligation into the NeuroD-iresGFP[79] and the pcDNA3.1+/N-HA vectors. Human *KIF21B* variants c.937C>A (p.Gln313Lys), c.2032A>C (p.Ile678Leu), c.3001G>A (p.Ala1001Thr) and the c.288 C>T substitution that abolishes KIF21B mobility[21] were created from WT CDS by Sequence and Ligation Independent Cloning (SLIC). *hKIF21B* ATP binding site (amino acids 87-94; UniProtKB O75037) was deleted by SLIC from NeuroD-WT-hKIF21B-iresGFP and NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu-iresGFP to generate WT-hKIF21B-ΔATP, and hKIF21B-p.Ile678Leu-ΔATP constructs respectively.

Wild-type mouse *Kif21b* CDS was isolated from E18.5 cDNA mouse cortices by PCR and a new isoform has been amplified. This isoform is 4920 bp long and has an insertion (c.4905_4906ins C; NM_001252100.1) that leads to the introduction of a premature stop codon in exon 35. This isoform has been subcloned by restriction-ligation into the NeuroD-IRES-GFP plasmid. This new isoform has also been fused to eGFP in the N-terminal part (pEGFP-C1-WT-mKif21b) via subcloning in pEGFP-C1 plasmid (NovoPro V12024). The amino acids 930-1010 corresponding to autoinhibitory domain (rCC)[42] were deleted by site-directed mutagenesis to generate NeuroD-mKIF21B-ΔrCC construct. Mouse *Kif21b* 3'UTR sequence (NCBI Reference Sequence: NM_001039472.2) were amplified by PCR and cloned by restriction-ligation into the pEGFP-C1 plasmid and fused to eGFP in the N-terminal part. pCR-BluntII-TOPO-mKif21b 3'UTR used to synthesize RNA probes was generated by cloning part of the mKif21b 3'UTR (255bp, Genepaint template T36548) in pCR-BluntII-TOPO vector.

shRNAs against coding sequence 3390-3410 (NM_001252100.1) (sh-*Kif21b* #1) or the 3'-UTR (sh-*Kif21b* #2) of mouse *Kif21b* were generated by annealing of sense and antisense oligos, the resulting duplex were subcloned in pCALSL-mir30[59] backbone vector digested with XhoI and EcoRI. The following oligos were used:

sh-*Kif21b* #1:

sense:5'TCGAGaaggtatattgctgttgacagtgagcgCCACGATGACTTCAAGTTCAAtagtgaagccacagatgtaTTGAACTTGAAGTCATCGTGGtgcctactgcctcgG 3'; antisense: 5'AATTCcgaggcagtaggcaCCACGATGACTTCAAGTTCAAtacatctgtggcttcactaTTGAACTTGAAGTCATCGTGGcgctcactgtcaacagcaatataccttC 3'; sh-*Kif21b* #2: sense:

5’TCGAGaaggtatattgctgttgacagtgagcgGCCTTTAACAACCAGAGTATAtagtgaagccacagatgtaTATACTCTGGT TGTTAAAGGCtgcctactgcctcgG 3’; antisense: 5’AATTCcgaggcagtaggcaGCCTTTAACAACCAGAGTATAtacatctgtggcttcactaTATACTCTGGTTGTTAAAGG CcgctcactgtcaacagcaatatacctC 3***;*** ***Scrambled shRNA:*** Sense: 5’TCGAGaaggtatattgctgttgacagtgagcgGCGCGATAGCGCTAATAATTTtagtgaagccacagatgtaAAATTATTAGC GCTATCGCGCtgcctactgcctcgG 3’; Antisense: 5’AATTCcgaggcagtaggcaGCGCGATAGCGCTAATAATTTtacatctgtggcttcactaAAATTATTAGCGCTATCGCG CcgctcactgtcaacagcaatatacctC 3’

pCAG2-mScarlet and pSCV2-CAG-mVENUS[79] expressing vectors were provided by J. Courchet (INMG, Lyon, France). Plasmid DNAs used in this study were prepared using the EndoFree plasmid purification kit (Macherey Nagel).

Mice

All animal studies were conducted in accordance with French regulations (EU Directive 86/609 – French Act Rural Code R 214-87 to 126) and all procedures were approved by the local ethics committee and the Research Ministry (APAFIS#15691-201806271458609). Mice were bred at the IGBMC animal facility under controlled light/dark cycles and were provided with food and water ad libitum.

Wild-type mice for in utero electroporation: Timed-pregnant wild-type (WT) NMRI (Janvier-labs) and CD1 (Charles River Laboratories) females were used for *in utero* electroporation of sh-*Kif21b* and NeuroD-hKIF21B constructs, respectively at embryonic day 14.5 (E14.5). Hybrid F1 females were obtained by mating inbred 129/SvJ females (Janvier-labs) with C57Bl/6J males (Charles River Laboratories). F1 females were crossed with C57Bl/6J males (Charles River Laboratories) to obtain timed-pregnant females for *in utero* electroporation at E15.5.

*Kif21b KO mic*e: Kif21b mice were generated using the International Mouse Phenotyping Consortium targeting mutation strategy[80] and obtained from= UC Davis/ KOMP repository (Kif21b$^{tm1a(KOMP)Wtsi}$). Genotyping was done as follows: Genomic DNA was extracted from tail biopsies using PCR reagent (Viagen) supplemented with Proteinase K (1 mg/mL), heated at 55°C for 5 h. Proteinase K was inactivated for 45 min at 85°C, and cell debris was removed by centrifugation. Samples were processed for PCR using the following primers: KIF21B forward: 5´-GGGGTACTTTCCATTGACCCAG-3´, KIF21B reverse: 5’-GAAGGGACCAAACCTGGGC-3’ for KIF21B targeted exon amplification and Mq forward 5’-GCTATGACTGGGCACAACAGACAATC-3’ and Mq reverse 5’-CAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTG-3’ for Neomycin gene amplification. The presence of the

wild type and knockout alleles was indicated by 346 and 261 bp products, respectively, which were detected on a 2% agarose gel.

In utero electroporation

In utero electroporation (IUE) was performed as described previously[81,82]. Timed-pregnant mice were anesthetized with isoflurane (2 l per min of oxygen, 4% isoflurane in the induction phase and 2% isoflurane during surgery operation; Tem Sega). The uterine horns were exposed, and a lateral ventricle of each embryo was injected using pulled glass capillaries (Harvard apparatus, 1.0OD*0.58ID*100mmL) with Fast Green (1 µg/µl; Sigma) combined with different amounts of DNA constructs using a micro injector (Eppendorf Femto Jet). We injected 1 µg/µl of WT or mutant NeuroD-hKIF21B-IRES-GFP constructs together with 0,5 µg/µl of empty NeuroD-IRES-GFP vector at E14.5. 1,5 µg/µl of NeuroD-IRES-GFP vector were used as control. We injected 1 µg/µl of NeuroD:Cre-GFP vector together with 3 µg/µl of either Cre inducible pCALSL-miR30-shRNA-*Kif21b* #1 or #2 or pCALSL-miR30-sh-scramble sequence. For complementation experiments, we injected 1 µg/µl of NeuroD:Cre-GFP vector together with 3 µg/µl of Cre inducible pCALSL-miR30-shRNA-*Kif21b* #2 and 1 µg/µl of NeuroD-KIF21BWT. For axonal pathfinding experiments, we injected 1 µg/µl of NeuroD-IRES-GFP (empty or containing WT or mutated human KIF21B cDNA) together with 0,8 µg/µl of pCAG2-mScarlet at E15.5. For rescue experiments, we co-injected 1mg/ml of NeuroD-Ires-GFP (WT or mutated human KIF21B cDNA) together with 0,25, 0,5 or 1 µg/µl of the indicated NeuroD-IRES-GFP constructs. Plasmids were further electroporated into the neuronal progenitors adjacent to the ventricle by discharging five electric pulses (40V) for 50 ms at 950 ms intervals using electrodes (diameter 3 mm; Sonidel CUY650P3) and ECM-830 BTX square wave electroporator (VWR international). After electroporation, embryos were placed back in the abdominal cavity and the abdomen was sutured using surgical needle and thread. For E18.5 analysis, pregnant mice were sacrificed by cervical dislocation four days after surgery. For post-natal analysis, electroporated pups were sacrificed two, four, or eight days after birth (P2, P4, P8) by head sectioning or 22 days after birth (P22) by terminal perfusion.

Mouse brain fixation and cutting

E12.5 to P8 animals were sacrificed by head sectioning and brains were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA, Electron Microscopy Sciences) in Phosphate buffered saline (PBS, HyClone) 2h at room temperature or overnight at 4°C. P22 animals were sacrificed by terminal perfusion of PBS then 4% PFA followed by overnight post-fixation at 4°C in 4% PFA. For Kif21b expression pattern (**Fig. 2 and Supplementary Fig. 2**), immunolabeling was performed on cryosections as follows: after fixation, brains were rinsed and equilibrated

in 20% sucrose in PBS overnight at 4°C, embedded in Tissue-Tek O.C.T. (Sakura), frozen on dry ice and coronal sections were cut at the cryostat (12 to 18 µm thickness, Leica CM3050S) and processed for *In situ* hybridization or immunolabeling. Sections were maintained at -80°C. For *in utero* electroporation analyses (**Fig. 3 to 6, Supplementary Fig. 3 to 6**), immunolabeling was performed on vibratome sections as follows: after fixation, brains were rinsed and embedded in a solution of 4% low-melting agarose (Bio-Rad) and cut into coronal sections (60 µm-thick for E18.5 and P2 mice, 100 µm-thick for P4 to P22 mice) using a vibrating-blade microtome (Leica VT1000S, Leica Microsystems) and processed for immunolabeling. Sections were maintained in PBS-azide 0,05% for short-term storage and in an Antifreeze solution (30% Ethyleneglycol, 20% Glycerol, 30% DH2O, 20% PO4 Buffer) for long-term storage.

RNA *in situ* hybridization

Mouse *Kif21B* sense and antisense probes were synthesized from pCR-BluntII-TOPO-mKif21b 3'UTR by either BamHI digestion followed by synthesis withT7 RNA polymerase (Roche) (sense probe) or EcoRV digestion followed by synthesis with SP6 RNA polymerase (Roche) (antisense probe). *In situ* hybridization was performed on coronal cryosections from E12.5 to E18.5 WT NMRI brain embryos with digoxigenin-labelled probes, as previously described[83]. Images were taken using a macroscope (Leica M420) connected to a Photometrics camera with the CoolSNAP (v. 1.2).

Immunolabeling

For cryosections only, an antigen retrieval was performed by boiling sections in sodium citrate buffer (0.01 M, pH 6) during 15 min. Cryo- and vibratome sections were permeabilized and blocked with 5% Normal Donkey Serum (NDS, Dominic Dutsher), 0.1% Triton-X-100 in PBS. Slides were incubated with primary antibodies diluted in blocking solution overnight at 4°C and secondary antibodies diluted in PBS-0.1% Triton one hour at room temperature, whereas cell nuclei were identified using DAPI (1mg/ml Sigma). All primary and secondary antibodies used for immunolabeling are described in **Supplementary Table 1**. All images were taken using an SP5 inverted confocal microscope (TCS SP5, Leica), connected to a LAS-X imaging software (Leica).

Primary neuronal culture, magnetofection and immunolabeling

Cortices from E15.5 CD1 mouse embryos were dissected in cold PBS supplemented with BSA (3 mg/mL), MgSO4 (1 mM, Sigma), and D-glucose (30 mM, Sigma). Cortices were dissociated in Neurobasal media containing papain (20U/mL, Worthington) and DNase I (100 µg/mL, Sigma) for 20 min at 37°C, washed 5 min with Neurobasal media containing Ovomucoïde (15 mg/mL, Worthington), and manually triturated in OptiMeM

supplemented with D-Glucose (20mM). Cells were then plated at 2 × 10^5 cells per 24-well plate coated with poly-D-lysine (1 mg/ml, Sigma) overnight at 4°C and cultured for two to five days in Neurobasal medium supplemented with B27 (1×), L-glutamine (2 mM), and penicillin (5 units/ml)-streptomycin (50 mg/ml). To transfect cultured neurons, we performed magnetofection at DIV0 (for analysis at DIV2) or DIV2 (for analysis at DIV5) using NeuroMag (OZ Bioscience) according to the manufacturer's protocol.Cells were fixed at DIV2 or DIV5 for 15 min at room temperature in 4% PFA, 4% sucrose in PBS, and incubated for 1 hour in 0.1% Triton X-100, 5% NDS in PBS. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C and secondary antibodies were incubated for 1 hour at room temperature (see **Supplementary Table 1** for antibodies). DNA was stained using DAPI (1/1000).

Fluorescent-activated cell sorting (FACS)

Cortices from 3-4 E16,5 mouse Rosa26-loxSTOP-YFP; NEXCRE/+ embryos were dissected and dissociated as described above. After dissociation, cells were resuspended in 500 µl of staining solution (10% FBS + 0.02% Sodium Azide in PBS) and stained for 20 min on ice in dark with CD24-APC Antibody (0.06 µg /100 µl final). Cells were then washed twice with HBSS (Gibco) and passed through a 40 µm filter (Filcon FACS). YFP-/CD24- population was sorted to enrich for progenitors and YFP+/CD24+ population was used to enrich for neurons.

Microfluidic fabrication and neurons plating

Design of polydimethylsiloxane microfluidic device is based on the one described by Taylor et *al*.[58] with modifications of the size of the microchannels (3 µm width, 3 µm height and 450 µm length to reduce the number of axons per microchannels)[84]. Masters production and microfluidic chamber amplification were previously described[84]. Briefly, microfluidics chambers were positioned and sealed on Iwaki boxes using plasma cleaner and then coated with poly-D-lysin (0.1 mg/ml) in the upper chamber, and with poly-D-lysin (0.1 mg/ml) and laminin (10 µg/ml) in the lower chamber. After overnight incubation at 4°C microfluidic devices were washed 2 times with Neurobasal medium and once with growing medium (Neurobasal medium supplemented with 2% B27, 2 mM Glutamax, and 1% penicillin/streptomycin). Microchambers were then placed in the incubator until neurons were plated. Primary cortical neurons were prepared as previously described[85]. Briefly, E15.5 C57Bl/6J mouse embryos were collected and cortices were dissected, followed by papain and cysteine digestion and trypsin inhibitor incubation. After mechanical dissociation, cortical neurons were resuspended in growing medium (5 x 10^6 cells in 120 µl) and plated in the upper chamber with a final

density of ~7000 cells/mm2. Neurons were kept in the incubator for 1 hour. Then, the two compartments were gently filled with growing medium.

Immunostaining in microchambers was performed as previously described from DIV5 culture[85]. Indeed, after 30' fixation in 4% PFA/Sucrose dissolved in PBS, all the compartments were blocked with a solution containing BSA 1%, normal goat serum 2%, Triton X-100 0.1%. For these two solutions, a bigger volume in the upper chamber was applied to create a pressure gradient. After 1 hour incubation with blocking solution, neurites in both compartments were incubated overnight at 4°C with primary antibody recognizing KIF21B and Tau-1. Secondary antibodies were added the following day for 4 hours and microchambers were maintained in PBS for a few days in the dark at 4°C (see **Supplementary Table 1** for antibodies).

RNA extraction, cDNA synthesis and RT–qPCR

To assess Kif21b mRNA expression in mouse and zebrafish, total RNA was extracted from the cortices of WT NMRI mouse embryos or from whole zebrafish (Danio rerio) embryos (AB strain) at different time points of development, with TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific). We used mKif21b ex2-3 and drKIF21B ex2-3 primers to target *mKif21b* or *zKif21b* cDNA and mGAPDH or drElfA (Elongation factor 1-alpha) as housekeeping genes normalizer. ShRNA-*Kif21b* knock-down efficacy was assessed by RT-qPCR. Total RNA was prepared from HEK293K cells overexpressing sh-scrambled or ShRNA-*Kif21b* #2 together with pEGFP-C1-3'UTR mKIF21B or from HEK 293K cells overexpressing sh-scrambled or ShRNA-*Kif21b* #1 together with pEGFP-C1-WT-mKif21b. We used GFP primers to target the 3'UTR sequence of *mKif21b* cDNA fused to GFP and mKIF21B ex2-3 primers to target *mKif21b* cDNA. We used mGAPDH or Hprt1 primers as housekeeping genes normalizer. cDNA samples were synthetized with SuperScript IV Reverse Transcriptase (Invitrogen) and submitted to DNAseI treatment (TurboDNAse, ThermoFisher). RT–qPCR was performed in a LightCycler PCR instrument (Roche) using SYBR Green Master Mix (Roche). RT-qPCR was also performed to assess the degradation of the mutant mRNA by nonsense-mediated decay (NMD). A blood sample was obtained from Patient 4 in PAXgene Blood RNA Tube (Qiagen, Germantown, CA, USA) and total RNA extracted using Qiagen PAXgene Blood miRNA kit (Qiagen, Germantown, CA, USA). As controls, total RNA was prepared with TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific) from blood sample obtained three male individuals aged between three to eight years who do not carry any *KIF21B* variants in PAXgene Blood RNA Tube. We used hKIF21B ex2-3 and hKIF21B ex33-34 coupled primers to target *hKIF21B* cDNA and hTBP as housekeeping gene normalizer.

Gene	Specie	Forward sequence	Reverse sequence
mKIF21B ex2-3	Mouse	AAGGCTGCTTTGAGGGCTAT	AAAGCCGGTGCCCATAGTA
hKIF21B ex3-4	Human	GTCACTTCTCGCCTCATCCA	CTCTGCACGTTCATCTGGGT
hKIF21B ex33-34	Human	TCAGTGGCTCCCGAGATAAC	CTTGTGCGCATTGGGGATTT
drKIF21B ex2-3	Zebrafish	TCATCGAGGGCTGCTTTGAG	GACACGCTCACGTCAAAACC
GFP		TACGGCAAGCTGACCCTGAAGT	GAAGTCGTGCTGCTTCATGTGG
mGAPDH	Mouse	TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG	TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT
drElfA	Zebrafish	CTTCTCAGGCTGACTGTGC	CCGCTAGCATTACCCTCC
hTBP	Human	CGGCTGTTTAACTTCGCTTC	CACACGCCAAGAAACAGTGA
Hprt1	Human	AGGCGAACCTCTCGGCTTTC	TCATCATCACTAATCACGACGCC

Cell culture and transfections

Mouse neuroblastoma N2A cells were cultured in DMEM (1g/l glucose) (GIBCO) supplemented with 5% Fetal Calf Serum (FCS) and Gentamycin 40µg/ml in a humidified atmosphere containing 5% CO2 at 37°C. Human embryonic kidney (HEK) 293T cells were cultured in DMEM (1g/l glucose) (GIBCO) supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS), penicillin 100 UI/ml, streptomycin 100 µg/ml in a humidified atmosphere containing 5% CO2 at 37°C. Mouse ST cells are neuronal progenitor cell lines from E14 striatal primordia of wild-type embryos immortalized using tsA58 SV40 large T antigen[86]. ST cells were cultured DMEM (1g/l glucose) supplemented with 10% FCS Heat-inactivated, non-essential amino acids, penicillin 100 UI/ml, streptomycin 100 µg/ml and G418 400 µg/ml in a humidified atmosphere containing 5% CO2 at 33°C. Cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Expression of transfected genes was analyzed 48 h after transfection by immunoblotting.

Protein extraction and western blot

Proteins from mouse cortices (E14.5 to P2) or from transfected cells (N2A, HEK 293T and ST cells) were extracted as follows: cells were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8.0,1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) supplemented with EDTA-free protease inhibitors (cOmplete™, Roche) for 30 min, then cells debris were removed by high speed centrifugation at 4°C for 25 min. Protein concentration was measured by spectrophotometry using Bio-Rad Bradford protein assay reagent. Samples were denatured at 95°C for 10 min in Laemmli buffer (Bio-Rad) with 2% β-mercaptoethanol and then resolved by SDS–PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked in 5% milk in PBS buffer with 0.1% Tween (PBS-T) and incubated overnight at 4°C with the appropriate primary antibody in blocking solution. Membranes were washed 3 times in PBS-T, incubated at room temperature for 1 h with HRP-coupled secondary antibodies (Invitrogen) at 1:10,000 dilution in PBS-T, followed by 3 times PBS-T washes. Visualization was performed by quantitative chemiluminescence using SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Sigma). Signal intensity was quantified using ImageQuant LAS 600 (GE

Healthcare). Primary and secondary coupled HRP antibodies used for western blot are described in **Supplementary Table 1**. All immunoblot experiments consisted of at least three independent replicates. Relative protein expression was quantified using ImageJ software.

Cycloheximide (CHX) treatment

To assess the protein half-life of WT- and mutated hKIF21B proteins, treatments using the translational inhibitor cycloheximide (CHX) were performed. N2A cells were cultured on 6-well plates and transfected with the adequate NeuroD- hKIF21B constructs using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. The day after, cells were treated with CHX (Sigma) diluted in media at 10 µg/mL for either 2h, 4h, 6h, 8h or 10h. Cells were lysed as described above. For analysis, 10 µg of protein of each sample were loaded on a SDS-gel followed by western blotting analysis as described above.

Zebrafish manipulation

Zebrafish (Danio rerio) embryos (AB strain) maintenance and experiments were performed as previously described here https://zfin.org/zf_info/zfbook/cont.html#cont1. Human WT and mutant full-length cDNA were cloned into pCS2 vector and transcribed using the SP6 Message Machine kit (Ambion). We injected 1 nL of diluted RNAs (WT or mutants) at 100 ng/µl into wild-type zebrafish eggs at 1- to 2-cell stage. Length of the head was measured at 5 days post-fertilization (dpf) as shown by the double arrow headed red lines (**Fig. 4a**). All the experiments were repeated at least three times and a unpaired two tailed Student's t-test or a Welch's two samples t-test (when the variances are unequal) was performed to determine significance. All images were taken using a macroscope (Leica M420) dedicated to brightfield acquisitions equipped with a Coolsnap CF camera controlled by Coolsnap software. To perform zebrafish Whole-Mount immunolabeling, larvae were fixed at 5dpf in Dent's fixative (80% methanol,20% dimethylsulphoxide [DMSO]) overnight at 4°C. The larvae were rehydrated slowly by decreasing concentrations of methanol. Larvae were then washed in in PBS buffer with 0.1% Tween (PBS-T). After bleaching for 30 min in (10% H202 in PBS-T with KOH (0.5g/ml)), the larvae were rinsed in PBS-T, twice for 10 min each. Then larvae were permeabilized with proteinase K, then postfixed with 4% PFA and washed in PBS-T. PFA-fixed larvae were washed in IF buffer (0.1% Tween-20, 1% BSA in PBS 1×) for 10 min, then incubated in the blocking buffer (10% FBS, 1% BSA in PBS 1×) for 1 h at room temperature. Larvae were incubated with primary antibody diluted in blocking solution, overnight at 4°C (see **Supplementary Table 1** for antibodies). After two washes in IF Buffer for 10 min each, larvae were incubated in secondary antibody diluted in blocking solution 2 h at room temperature. Larvae were washed in IF buffer for 10 min, twice. All images were taken using an epifluorescence macroscope at 5x magnification equipped with a Coolsnap CF camera controlled by Coolsnap software.

Image analyses

Countings. Images were acquired in 1024x1024 mode using confocal microscope (TCS SP5; Leica) at 20× magnification and a z stack of 1,55 µm and analyzed using ImageJ software. For migration analyses, cortical wall areas (upper cortical plate, lower cortical plate, intermediate zone, subventricular zone/ventricular zone) were identified according to cell density (nuclei staining with DAPI). The total number of GFP-positive cells in the embryonic brain sections was quantified by counting positive cells within a box of fixed size and the percentage of positive cells in each cortical area was calculated. For proliferation analyses, the total number of markers-positive cells in embryonic brain sections was quantified by counting positive cells in the intermediate zone (IZ) and in the sub ventricular zone (SVZ) below the electroporated region using square of 100-µm width or 50-µm width respectively, with anatomically matched positions in experimental groups.

In vivo branching analyses. Images were acquired in 1024x1024 mode using confocal microscope (TCS SP5; Leica) at 10× magnification and a z stack of 3 µm and analyzed using ImageJ software. For axonal midline crossing analyses, the fluorescence within a box of fixed size placed at the contralateral side of the midline of the brain section was measured and divided by the fluorescence at the ipsilateral side of the midline area (**Fig. 5c**). This value was normalized to empty vector (control) value. For projecting neurons analyses, the fluorescence intensity within a box of fixed size placed at the ipsilateral side of the midline of the brain section was measured using ImageJ and this value was divided by the number of Scarlet-positive neurons within a box of fixed size placed at the upper cortical plate (**Fig. 5d**). For quantification of layer V (ipsilateral) collateral branching, a box of fixed size was drawn encompassing layer V and the fluorescence area within this box was measured. This value was then divided by the fluorescence at the ipsilateral side of the midline area (**Fig. 6c**). We quantified contralateral branching as previously described[71]. Briefly, fluorescence within a box of fixed size placed contralaterally is measured on a vertical axis (from ventricular boundaries to pial surface) and converted from pixel size to percentile (0% : ventricular zone, 100%: pial surface) using the ProfilePlot plugin from FIJI software. Signal intensity of 100% is set as the maximum signal intensity in migration percentile 0 to 20 (considered as the white matter).

In vitro branching analyses. Images were acquired using upright fluorescence (DM 4000B; Leica) equipped with a CoolSnap FX monochrome camera (Photometrics) at 20× magnification. To measure the axonal length (at DIV2 and DIV5), the longest Scarlet positive-labeled neurite was traced and the length was measured using Simple Neurite Tracer plugin from FIJI software. Branch number and length was measured at DIV5 using Simple Neurite Tracer as previously described (ref).

Statistics

All statistics were calculated using GraphPad Prism 6 (GraphPad) and are represented as mean +/- S.E.M. All statistical tests used and n numbers have been mentioned in figure legends along with the respective data and statistical details are reported in **Supplementary Table 2**. After histological examination, only brains with comparative electroporated regions and efficiencies were conserved for quantification. Graphs were generated using GraphPad and images were assembled with Adobe Photoshop 13.0.1 (Adobe Systems).

Acknowledgments:

This work was funded by grants from INSERM (ATIP-Avenir program, J.D.G.), the Fyssen foundation (J.D.G.), the French state funds through the Agence Nationale de la Recherche under the project JCJC CREDO ANR-14-CE13-0008-01 (J.D.G.), CILAXCAL (C.D.) and AXYON ANR-18-CE16-0009-01 (F.S.), and the programme Investissements d'Avenir labelled (ANR-10-IDEX-0002-02, ANR-10-LABX-0030-INRT, to J.D.G. and C.G.), the Fondation pour la recherche sur le cerevau (F.S.), INSERM/CNRS and University of Strasbourg. N.A.H. and G.Z. are supported by USDA grant number 3092-51000-057-04S. L.A. and J.R.A. are funded through the IGBMC PhD program (ANR-10-IDEX-0002-02, ANR-10-LABX-0030-INRT). L.A is currently supported by Fondation pour la recherche médicale (FDT201805005184). P.T. and C.W. are, respectively research assistant and research engineer at the University of Strasbourg. J.D.G. and C.G. are INSERM investigators. F.S. is a professor at Univ. Grenoble Alpes. H.V. is supported by a PhD fellowship from Association Huntington France. We thank the Imaging Center of IGBMC (ici.igbmc.fr), in particular, Elvire Guiot and Erwan Grandgirard for their assistance in the imaging experiments. We are grateful to the staff of the mouse facilities of the Institut Clinique de la souris (ICS) and Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), the staff of the zebrafish facility of the IGBMC and, the molecular biology service (in particular Thierry Lerouge and Paola Rossolillo) for their involvement in the project. We thank Sandra Bour and IGBMC communication service. We also thank Dr Courchet and member of Chelly lab for sharing reagents and for discussion. We are really grateful to Pr Jamel Chelly and Dr Laurent Nguyen for their continuous support, discussion and time reading this manuscript. We warmly thank Dr Sandrine Humbert and Dr Binnaz Yalcin for helpful comments and advices. We are also grateful to members of J.D.G. and Chelly laboratories for discussion and technical assistance. In particular we thank Dr Efil Bayam for cell sorting and advices in writing the manuscript. We thank Dr Gabrielle Rudolf for reading the manuscript and for her suggestions. We finally thank Paula Hernandez for her help collecting patient samples.

N.A.H. and G.Z. are supported by USDA grant number 3092-51000-057-04S.

Author contribution:

L.A. and J.R.A. conceived and designed the experiments, performed the experiments, performed statistical analysis and analyzed the data related to cellular, and functional studies in mice. P.T. provided technical assistance and performed *in utero* electroporation. C.G. and C.S.B. conceived, designed and performed experiments in zebrafish. C.W. provided technical assistance for Zebrafish studies. S.H., K.B., C.A.B., A.C., A.M., S.M., L.F., N.A.H., K.M., C.M., H.S., M.M.W, P.J.G.Z., G.Z. and D.H. contributed clinical and imaging data and follow-up of patients and families. S.H., A.R., C.N. and C.D. contributed to the generation of whole-exome sequencing, bioinformatics tools and analysis of sequencing data. H.V. and F.S. conceived and performed the expression analysis in microdevices. J.D.G. conceived, coordinated and supervised the study, designed experiments, analyzed data and wrote the manuscript.

Conflict-of-interest statement:

A.D. and K.M. are employees of GeneDx, Inc. The other authors declare no competing interest.

Figure Legends

Figure 1: Patients with *KIF21B* variants. (**a-d**) Pedigrees of patients with identified *KIF21B* variants. (**e-g**) Sagittal brain section of MRI of patients showing a complete agenesis of the corpus callosum in Patient 1 (**e**, red arrow) and microcephaly in P2 (**f**). (**h**) Schematic representation of the human KIF21B (hKIF21B) protein indicating the different domains (motor domain, ATP binding site, coiled coil domain (CC) 1 and 2, regulatory coiled coil domain (rCC) and WD40 domain) and the position of the mutated amino acids for Patient 1 (p.Ile678Leu), 2 (p.Gln313Lys), 3 (pAla1001Thr) and 4 (p.Asn988SerfsX4). T96N substitution that abolishes KIF21B mobility is also depicted.

Figure 2: KIF21B expression in mouse developing cortex. (**a**) RT-qPCR analyses showing expression of *Kif21b* transcripts in mouse cortices at different embryonic stages (from E12.5 to E18.5) (n=4 brains per stage). (**b**) Western blot analyses of mouse cortical extracts showing similar expression of Kif21b protein from E14.5 to P2 (n=3 brains per stage). Data are represented as means ± s.e.m. Significance was calculated by one-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test, ns, non-significant; **P < 0.005; ***P < 0.001. (**c, d**) E14.5 mouse forebrain coronal sections immunolabelled for Kif21b (magenta) and β-III-tubulin (neuronal marker, green) and counterstained with DAPI (blue) show that Kif21b expression is restricted to post-mitotic neurons. (**e, f**) Left panel: schematic representation of a 2-compartment microfluidic chamber. Cortical neurons (in cyan) plated in the upper chamber (grey) grow their axons through 450μm-long microchannels. The length of the microchannels allows axons but not dendrites to reach the lower chamber. Right panel: immunolabelling of Kif21b (magenta) and tau (axonal marker, cyan) on mouse primary cortical neurons at DIV5 in microdevices showing expression of Kif21b in axons (**e**) with an enrichment in growth cones (**f**). CP, cortical plate; IZ, intermediate zone; SVZ, subventricular zone; VZ, ventricular zone. Scale bars, (**c**) 250μm and (**d-f**) 100 μm, magnifications (**e, f**) 20μm.

Figure 3: Overexpression of KIF21B missense variants induces abnormal neuronal migration through enhanced KIF21B motor activity. (**a**) HA-immunolabelling of primary cortical neurons transfected with WT or mutant HA-tagged hKIF21B cDNA constructs together with pCAGGs-mVenus showing distribution of KIF21B (HA, magenta) in soma, dendrites and axons at DIV2. (**b, d, f, h**) Coronal sections of E18.5 mouse cortices, four days after *in utero* electroporation with (**b**) NeuroD-IRES-GFP empty vector (1 μg/μl) or WT, p.Gln313Lys, p.Ile678Leu or pAla1001Thr NeuroD-hKIF21B or co-expressing WT-hKIF21B together with mutated hKIF21B

constructs (ratio 1:1); (**d**) increasing amount (1, 1.5 and 2 µg/µl) of NeuroD-WT-hKIF21B; (**f**) mKIF21BΔrCC construct; and (**h**) NeuroD-WT-hKIF21B, p.Ile678Leu-hKIF21B or immotile p.Ile678LeuΔATP-hKIF21B. GFP positive electroporated cells are depicted in green. Nuclei are stained with DAPI. Scale bars, (**a**) 20µm; (**b**) 100 µm; (**d, f, h**) 50 µm. (**c, e, g, i)** Analysis (means ± s.e.m) of the percentage of electroporated GFP-cells in different regions (Up CP, Lo CP, and SVZ /IZ) showing (**c**) effect of expressing hKIF21B variants; (**e**) effect of expressing hKIF21B in a dose dependent manner, (**g**) effect of increasing activity of KIF21B and (**i**) contribution of the processive activity to the p.Ile678Leu-induced phenotype. Data from at least three embryos per condition were analyzed by two-way ANOVA, with Bonferroni's multiple comparisons test, ns, non-significant; *P < 0.05; **P < 0.005; ***P < 0.001; ****P < 0.0001. Up CP, Upper cortical plate; Lo CP, Lower cortical plate; IZ, intermediate zone; SVZ, subventricular zone. (**j**) Model for KIF21B-dependant regulation of neuronal migration. In control condition, KIF21B switches between its autoinhibition state and its conformational active state (purple arrows), ensuring a proper neuronal migration. h*KIF21B* variants (mutated amino acid marked by a star) alters the protein conformation that relieve the autoinhibition state of KIF21B in favor of its active state (purple arrows). KIF21B hyper-motility (pink arrow) leads to radial migration defects.

Figure 4: Overexpression of the p.Gln313Lys hKIF21B variant is associated with a decreased head size in zebrafish larvae. (**a**) Dorsal view of representative control zebrafish larvae (non-injected) or injected with 100 pg of wild-type (WT) or mutated *hKIF21B* mRNAs (p.Gln313Lys and p.Ala1001Thr) at five days post-fertilization (dpf). Double arrow indicates the distance between the forebrain and hindbrain, a measure used as a proxy for head size. (**b**) Dot plot of the head measurements (red double arrow) of control and injected larvae at 5dpf. Red diamond corresponds to the mean of the batch measured. Experiments were repeated three times with at least n=31 larvae per batch. Significance was calculated by unpaired two-tailed Student's t-test or a Welch's two sample t-test between control and RNA-injected larvae, ns, non-significant, *P < 0.05, *P < 0.005, *** p<0.001.

Figure 5: p.Ile678Leu hKIF21B variant impedes interhemispheric connectivity through aberrant motor activity. (**a**) Coronal sections of P8 mouse brains after *in utero* electroporation with pCAG2-Scarlet and a NeuroD (ND)-IRES-GFP empty vector or WT or p.Ile678Leu NeuroD-IRES-GFP constructs at E15.5. Scale bar, 200 µm. (**b**) Close-up views of the red boxed area in (**a**) showing impaired axonal interhemispheric connectivity upon expression of the p.Ile678Leu variant or the hyperactive mKIF21B-ΔrCC but not upon expression of WT, p.Gln313Lys or immotile p.Ile678LeuΔATP. Rescue experiment were done by co-

expressing p.Ile678Leu-hKIF21B (1 µg/µl) together with WT-hKIF21B constructs at 1 µg/µl (p.Ile678Leu + WT 1). Scale bars, 250 µm. (**c-d**) Left panel, schematic describing methods used to quantify (**c**) the percentage of axon crossing the midline (ratio between the intensity of the scarlet signal in the contralateral side (green box) and the ipsilateral side (red box)) and (**d**) the percentage of projecting neurons (intensity of the scarlet signal in the corpus callosum (red box) normalized on the number of electroporated neurons (blue box)). Right panels, histograms presenting the quantification of (**c**) the percentage of axon crossing the midline and (**d, e**) the percentage of projecting neurons for all conditions tested as indicated. Data are shown as means ± s.e.m. Data from at least four animals per condition were analyzed by one-way ANOVA, with Bonferroni's multiple comparisons test, *P < 0.05, **P < 0.005; ***P < 0.001; ns, non-significant. (**f**) Representative DIV2 cortical neurons transfected at DIV0 with pCAG2-Scarlet together with empty pCDNA-HA (HA-EV) or WT (at 1 µg/µl (WT) or 2 µg/µl (WT x2)), p.Gln313Lys, p.Ile678Leu or pAla1001Thr pCDNA-HA-hKIF21B constructs. Rescue experiments were done by co-expressing mutated p.Ile678Leu hKIF21B variant together with NeuroD-WT-hKIF21B (ratio 1:1; p.Ile678Leu + WT 1). Red arrowheads point to the axon tip. Scale bar, 50 µm. (**g**) Quantification of the longest neurite length (axon) at DIV2 after overexpression of the indicated constructs. Bars represent the means of the longest neurite length ± s.e.m. of ≥ 94 neurons from at least three independent neuronal cultures for each condition. Significance was calculated by one-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test, ns, non-significant; **P < 0.005; ****P < 0.0001.

Figure 6: Overexpression of p.Ile678Leu hKIF21B variant impairs ipsilateral intracortical axon collaterals formation through a dominant negative effect on motility. (**a**) Representative images of ipsilateral P8 mouse cortices after electroporation at E15.5, with pCAG2-Scarlet and a NeuroD (ND)-IRES-GFP empty vector or WT, p.Gln313Lys, p.Ile678Leu, p.Ile678LeuΔATP NeuroD-hKIF21B-IRES-GFP or the hyperactive ΔrCC NeuroD-mKIF21B-IRES-GFP constructs. Rescue experiments were done by co-expressing mutated p.Ile678Leu hKIF21B together with increasing amount of WT-hKIF21B (at 0.25 µg/µl (WT 0.25) or 1 µg/µl (WT 1)) or equivalent amount of hKIF21B-ΔATP or hKIF21B-T96N, that both lost their processivity. Scale bar, 250 µm. (**b**) Close-up views of red boxed area in (**a**) showing axon ipsilateral branching within layer V for all the indicated conditions. Scale bar, 250 µm. (**c-e**) Histograms showing (**c-d**) the quantification of the ipsilateral branching in layer V (intensity of scarlet signal in layer V (blue box) normalized on the intensity of the scarlet signal in the corpus callosum (red box) – as shown on the schematic in the upper panel) and (**e**) the distribution of electroporated neurons in three different regions (Up CP (upper cortical plate), Lo CP (Lower cortical plate), and WM (White matter)). Data are represented as means ± s.e.m. Data from at least five animals

per condition were analyzed by (**c**, **d**) one-way ANOVA or (**e**) two-ways ANOVA, with Bonferroni's multiple comparisons test, *P < 0.05; **P < 0.005; ns, non-significant. (**f**) Representative DIV5 cortical neurons transfected at DIV2 with pCAG2-Scarlet together with a pCDNA-HA empty vector or p.Ile678Leu pCDNA-HA-hKIF21B constructs. Scale bar, 150 µm. (**g**) Distribution of axonal collateral branches length at DIV5 after overexpression of the indicated constructs. Bars represent the means ± s.e.m. of ≥160 collaterals of ≥30 neurons from at least three independent neuronal cultures for each condition. Significance was calculated by two-ways ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test, ns, non-significant; **P < 0.005; ***P < 0.001; ****P < 0.0001.

References

1. Hirokawa, N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* **279**, 519-26 (1998).
2. Hirokawa, N. & Tanaka, Y. Kinesin superfamily proteins (KIFs): Various functions and their relevance for important phenomena in life and diseases. *Exp Cell Res* **334**, 16-25 (2015).
3. Carabalona, A., Hu, D.J. & Vallee, R.B. KIF1A inhibition immortalizes brain stem cells but blocks BDNF-mediated neuronal migration. *Nat Neurosci* **19**, 253-62 (2016).
4. Chen, J.L., Chang, C.H. & Tsai, J.W. Gli2 Rescues Delays in Brain Development Induced by Kif3a Dysfunction. *Cereb Cortex* (2018).
5. Foerster, P. *et al.* mTORC1 signaling and primary cilia are required for brain ventricle morphogenesis. *Development* **144**, 201-210 (2017).
6. Sun, D. *et al.* Regulation of neural stem cell proliferation and differentiation by Kinesin family member 2a. *PLoS One* **12**, e0179047 (2017).
7. Tsai, J.W., Lian, W.N., Kemal, S., Kriegstein, A.R. & Vallee, R.B. Kinesin 3 and cytoplasmic dynein mediate interkinetic nuclear migration in neural stem cells. *Nat Neurosci* **13**, 1463-71 (2010).
8. Wilson, S.L., Wilson, J.P., Wang, C., Wang, B. & McConnell, S.K. Primary cilia and Gli3 activity regulate cerebral cortical size. *Dev Neurobiol* **72**, 1196-212 (2012).
9. Geng, A. *et al.* KIF20A/MKLP2 regulates the division modes of neural progenitor cells during cortical development. *Nat Commun* **9**, 2707 (2018).
10. Janisch, K.M. *et al.* The vertebrate-specific Kinesin-6, Kif20b, is required for normal cytokinesis of polarized cortical stem cells and cerebral cortex size. *Development* **140**, 4672-82 (2013).
11. Reilly, M.L. *et al.* Loss of function mutations in KIF14 cause severe microcephaly and kidney development defects in humans and zebrafish. *Hum Mol Genet* (2018).
12. Falnikar, A., Tole, S. & Baas, P.W. Kinesin-5, a mitotic microtubule-associated motor protein, modulates neuronal migration. *Mol Biol Cell* **22**, 1561-74 (2011).
13. Falnikar, A., Tole, S., Liu, M., Liu, J.S. & Baas, P.W. Polarity in migrating neurons is related to a mechanism analogous to cytokinesis. *Curr Biol* **23**, 1215-20 (2013).
14. Homma, N. *et al.* Kinesin superfamily protein 2A (KIF2A) functions in suppression of collateral branch extension. *Cell* **114**, 229-39 (2003).
15. Liu, M. *et al.* Kinesin-12, a mitotic microtubule-associated motor protein, impacts axonal growth, navigation, and branching. *J Neurosci* **30**, 14896-906 (2010).
16. Myers, K.A. & Baas, P.W. Kinesin-5 regulates the growth of the axon by acting as a brake on its microtubule array. *J Cell Biol* **178**, 1081-91 (2007).
17. Peretti, D., Peris, L., Rosso, S., Quiroga, S. & Caceres, A. Evidence for the involvement of KIF4 in the anterograde transport of L1-containing vesicles. *J Cell Biol* **149**, 141-52 (2000).
18. Xu, M. *et al.* Kinesin-12 influences axonal growth during zebrafish neural development. *Cytoskeleton (Hoboken)* **71**, 555-63 (2014).

19. Midorikawa, R., Takei, Y. & Hirokawa, N. KIF4 motor regulates activity-dependent neuronal survival by suppressing PARP-1 enzymatic activity. *Cell* **125**, 371-83 (2006).
20. Kondo, M., Takei, Y. & Hirokawa, N. Motor protein KIF1A is essential for hippocampal synaptogenesis and learning enhancement in an enriched environment. *Neuron* **73**, 743-57 (2012).
21. Muhia, M. *et al.* The Kinesin KIF21B Regulates Microtubule Dynamics and Is Essential for Neuronal Morphology, Synapse Function, and Learning and Memory. *Cell Rep* **15**, 968-77 (2016).
22. Nakajima, K. *et al.* Molecular motor KIF5A is essential for GABA(A) receptor transport, and KIF5A deletion causes epilepsy. *Neuron* **76**, 945-61 (2012).
23. Swarnkar, S., Avchalumov, Y., Raveendra, B.L., Grinman, E. & Puthanveettil, S.V. Kinesin Family of Proteins Kif11 and Kif21B Act as Inhibitory Constraints of Excitatory Synaptic Transmission Through Distinct Mechanisms. *Sci Rep* **8**, 17419 (2018).
24. Willemsen, M.H. *et al.* Involvement of the kinesin family members KIF4A and KIF5C in intellectual disability and synaptic function. *J Med Genet* **51**, 487-94 (2014).
25. Najmabadi, H. *et al.* Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature* **478**, 57-63 (2011).
26. Putoux, A. *et al.* KIF7 mutations cause fetal hydrolethalus and acrocallosal syndromes. *Nat Genet* **43**, 601-6 (2011).
27. Dafinger, C. *et al.* Mutations in KIF7 link Joubert syndrome with Sonic Hedgehog signaling and microtubule dynamics. *J Clin Invest* **121**, 2662-7 (2011).
28. Jamuar, S.S. *et al.* Somatic mutations in cerebral cortical malformations. *N Engl J Med* **371**, 733-43 (2014).
29. Ostergaard, P. *et al.* Mutations in KIF11 cause autosomal-dominant microcephaly variably associated with congenital lymphedema and chorioretinopathy. *Am J Hum Genet* **90**, 356-62 (2012).
30. Poirier, K. *et al.* Mutations in TUBG1, DYNC1H1, KIF5C and KIF2A cause malformations of cortical development and microcephaly. *Nat Genet* **45**, 639-47 (2013).
31. Tian, G. *et al.* A patient with lissencephaly, developmental delay, and infantile spasms, due to de novo heterozygous mutation of KIF2A. *Mol Genet Genomic Med* **4**, 599-603 (2016).
32. Cavallin, M. *et al.* Recurrent KIF2A mutations are responsible for classic lissencephaly. *Neurogenetics* **18**, 73-79 (2017).
33. Michels, S. *et al.* Mutations of KIF5C cause a neurodevelopmental disorder of infantile-onset epilepsy, absent language, and distinctive malformations of cortical development. *Am J Med Genet A* **173**, 3127-3131 (2017).
34. Ohba, C. *et al.* De novo KIF1A mutations cause intellectual deficit, cerebellar atrophy, lower limb spasticity and visual disturbance. *J Hum Genet* **60**, 739-42 (2015).
35. Konjikusic, M.J. *et al.* Mutations in Kinesin family member 6 reveal specific role in ependymal cell ciliogenesis and human neurological development. *PLoS Genet* **14**, e1007817 (2018).
36. Filges, I. *et al.* Exome sequencing identifies mutations in KIF14 as a novel cause of an autosomal recessive lethal fetal ciliopathy phenotype. *Clin Genet* **86**, 220-8 (2014).
37. Makrythanasis, P. *et al.* Biallelic variants in KIF14 cause intellectual disability with microcephaly. *Eur J Hum Genet* **26**, 330-339 (2018).
38. Broix, L. *et al.* Ciliogenesis and cell cycle alterations contribute to KIF2A-related malformations of cortical development. *Hum Mol Genet* **27**, 224-238 (2018).
39. Labonte, D., Thies, E. & Kneussel, M. The kinesin KIF21B participates in the cell surface delivery of gamma2 subunit-containing GABAA receptors. *Eur J Cell Biol* **93**, 338-46 (2014).
40. Marszalek, J.R., Weiner, J.A., Farlow, S.J., Chun, J. & Goldstein, L.S. Novel dendritic kinesin sorting identified by different process targeting of two related kinesins: KIF21A and KIF21B. *J Cell Biol* **145**, 469-79 (1999).
41. Huang, C.F. & Banker, G. The translocation selectivity of the kinesins that mediate neuronal organelle transport. *Traffic* **13**, 549-64 (2012).
42. van Riel, W.E. *et al.* Kinesin-4 KIF21B is a potent microtubule pausing factor. *Elife* **6**(2017).
43. Gromova, K.V. *et al.* Neurobeachin and the Kinesin KIF21B Are Critical for Endocytic Recycling of NMDA Receptors and Regulate Social Behavior. *Cell Rep* **23**, 2705-2717 (2018).
44. Ghiretti, A.E. *et al.* Activity-Dependent Regulation of Distinct Transport and Cytoskeletal Remodeling Functions of the Dendritic Kinesin KIF21B. *Neuron* **92**, 857-872 (2016).

45. Labonte, D. *et al.* TRIM3 regulates the motility of the kinesin motor protein KIF21B. *PLoS One* **8**, e75603 (2013).
46. Bianchi, S. *et al.* Structural basis for misregulation of kinesin KIF21A autoinhibition by CFEOM1 disease mutations. *Sci Rep* **6**, 30668 (2016).
47. Kannan, M. *et al.* WD40-repeat 47, a microtubule-associated protein, is essential for brain development and autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E9308-E9317 (2017).
48. Morikawa, M., Tanaka, Y., Cho, H.S., Yoshihara, M. & Hirokawa, N. The Molecular Motor KIF21B Mediates Synaptic Plasticity and Fear Extinction by Terminating Rac1 Activation. *Cell Rep* **23**, 3864-3877 (2018).
49. Olson, H.E. *et al.* Micro-duplications of 1q32.1 associated with neurodevelopmental delay. *Eur J Med Genet* **55**, 145-50 (2012).
50. Kreft, K.L. *et al.* Abundant kif21b is associated with accelerated progression in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol Commun* **2**, 144 (2014).
51. Hares, K. *et al.* Reduced axonal motor protein expression in non-lesional grey matter in multiple sclerosis. *Mult Scler* **20**, 812-21 (2014).
52. Robinson, P.C. *et al.* Genetic dissection of acute anterior uveitis reveals similarities and differences in associations observed with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheumatol* **67**, 140-51 (2015).
53. Yang, X. *et al.* Association of KIF21B genetic polymorphisms with ankylosing spondylitis in a Chinese Han population of Shandong Province. *Clin Rheumatol* **34**, 1729-36 (2015).
54. Goris, A., Boonen, S., D'Hooghe M, B. & Dubois, B. Replication of KIF21B as a susceptibility locus for multiple sclerosis. *J Med Genet* **47**, 775-6 (2010).
55. International Multiple Sclerosis Genetics, C. Comprehensive follow-up of the first genome-wide association study of multiple sclerosis identifies KIF21B and TMEM39A as susceptibility loci. *Hum Mol Genet* **19**, 953-62 (2010).
56. Liu, Y. *et al.* Association of common variants in KIF21B and ankylosing spondylitis in a Chinese Han population: a replication study. *Immunogenetics* **65**, 835-9 (2013).
57. Sobreira, N., Schiettecatte, F., Valle, D. & Hamosh, A. GeneMatcher: a matching tool for connecting investigators with an interest in the same gene. *Hum Mutat* **36**, 928-30 (2015).
58. Taylor, A.M. *et al.* A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat Methods* **2**, 599-605 (2005).
59. Matsuda, T. & Cepko, C.L. Controlled expression of transgenes introduced by in vivo electroporation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1027-32 (2007).
60. Cheng, L. *et al.* Human CFEOM1 mutations attenuate KIF21A autoinhibition and cause oculomotor axon stalling. *Neuron* **82**, 334-49 (2014).
61. van der Vaart, B. *et al.* CFEOM1-associated kinesin KIF21A is a cortical microtubule growth inhibitor. *Dev Cell* **27**, 145-60 (2013).
62. Golzio, C. *et al.* KCTD13 is a major driver of mirrored neuroanatomical phenotypes of the 16p11.2 copy number variant. *Nature* **485**, 363-7 (2012).
63. Loviglio, M.N. *et al.* The Immune Signaling Adaptor LAT Contributes to the Neuroanatomical Phenotype of 16p11.2 BP2-BP3 CNVs. *Am J Hum Genet* **101**, 564-577 (2017).
64. Fenlon, L.R. & Richards, L.J. Contralateral targeting of the corpus callosum in normal and pathological brain function. *Trends Neurosci* **38**, 264-72 (2015).
65. Verhey, K.J. & Hammond, J.W. Traffic control: regulation of kinesin motors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 765-77 (2009).
66. Causeret, F. *et al.* The p21-activated kinase is required for neuronal migration in the cerebral cortex. *Cereb Cortex* **19**, 861-75 (2009).
67. Chen, L. *et al.* Rac1 controls the formation of midline commissures and the competency of tangential migration in ventral telencephalic neurons. *J Neurosci* **27**, 3884-93 (2007).
68. Kassai, H. *et al.* Rac1 in cortical projection neurons is selectively required for midline crossing of commissural axonal formation. *Eur J Neurosci* **28**, 257-67 (2008).
69. Konno, D., Yoshimura, S., Hori, K., Maruoka, H. & Sobue, K. Involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase/rac1 and cdc42 pathways in radial migration of cortical neurons. *J Biol Chem* **280**, 5082-8 (2005).

70. Pan, X. *et al.* PAK1 regulates cortical development via promoting neuronal migration and progenitor cell proliferation. *Mol Brain* **8**, 36 (2015).
71. Courchet, J. *et al.* Terminal axon branching is regulated by the LKB1-NUAK1 kinase pathway via presynaptic mitochondrial capture. *Cell* **153**, 1510-25 (2013).
72. Su, B., Ji, Y.S., Sun, X.L., Liu, X.H. & Chen, Z.Y. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced mitochondrial motility arrest and presynaptic docking contribute to BDNF-enhanced synaptic transmission. *J Biol Chem* **289**, 1213-26 (2014).
73. Kelliher, M.T. *et al.* Autoinhibition of kinesin-1 is essential to the dendrite-specific localization of Golgi outposts. *J Cell Biol* **217**, 2531-2547 (2018).
74. Igarashi, A. *et al.* Nuclear PTEN deficiency causes microcephaly with decreased neuronal soma size and increased seizure susceptibility. *J Biol Chem* **293**, 9292-9300 (2018).
75. Thomanetz, V. *et al.* Ablation of the mTORC2 component rictor in brain or Purkinje cells affects size and neuron morphology. *J Cell Biol* **201**, 293-308 (2013).
76. Xing, L. *et al.* Layer specific and general requirements for ERK/MAPK signaling in the developing neocortex. *Elife* **5**(2016).
77. Niwa, S. *et al.* Autoinhibition of a Neuronal Kinesin UNC-104/KIF1A Regulates the Size and Density of Synapses. *Cell Rep* **16**, 2129-2141 (2016).
78. Retterer, K. *et al.* Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. *Genet Med* **18**, 696-704 (2016).
79. Hand, R. & Polleux, F. Neurogenin2 regulates the initial axon guidance of cortical pyramidal neurons projecting medially to the corpus callosum. *Neural Dev* **6**, 30 (2011).
80. Skarnes, W.C. *et al.* A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature* **474**, 337-42 (2011).
81. Volvert, M.L. *et al.* MicroRNA targeting of CoREST controls polarization of migrating cortical neurons. *Cell Rep* **7**, 1168-83 (2014).
82. Laguesse, S. *et al.* A Dynamic Unfolded Protein Response Contributes to the Control of Cortical Neurogenesis. *Dev Cell* **35**, 553-67 (2015).
83. Godin, J.D. *et al.* p27(Kip1) Is a Microtubule-Associated Protein that Promotes Microtubule Polymerization during Neuron Migration. *Dev Cell* **23**, 729-44 (2012).
84. Zala, D. *et al.* Vesicular glycolysis provides on-board energy for fast axonal transport. *Cell* **152**, 479-91 (2013).
85. Virlogeux, A. *et al.* Reconstituting Corticostriatal Network on-a-Chip Reveals the Contribution of the Presynaptic Compartment to Huntington's Disease. *Cell Rep* **22**, 110-122 (2018).
86. Trettel, F. *et al.* Dominant phenotypes produced by the HD mutation in STHdh(Q111) striatal cells. *Hum Mol Genet* **9**, 2799-809 (2000).

Supplementary material

Content:

- Supplementary Figure legends
- Supplementary Table 1: List of primary and secondary antibodies used in this work.

Supplementary Figure legends

Supplementary Figure 1: Patients with *KIF21B* mutations, related to Figure 1. (**a-c**) Alignment of the KIF21B protein across several species (human, macaque, mouse, fish, chicken, zebrafish) shows the conservation of the mutated amino acid residue (red arrow head) in patients. (**d**) RT-qPCR analyses showing a decrease of *KIF21B* mRNA expression in Patient 4 (carrying a duplication c.2959_2962dup, p.Asn988SerfsX4). Three male individuals were used as control and each dot represent one independent measure. Data are represented as means ± s.e.m. Position of the primers used for qPCR are shown in the upper panel. (**e**) Chromatogram showing the results of Sanger sequencing of RNA isolated from Patient 4's blood. (**f**) *In silico* prediction of sequence changes identified in patients, based on human *KIF21B* transcript variant 1 (RefSeq: NM_001252100.1) and human *UBR3* transcript (RefSeq: NM_172070.3).

Supplementary Figure 2: KIF21B expression in mouse developing cortex, related to Figure 2. (**a**) *In situ* hybridization of mouse brain sections (from E12.5 to E18.5) show *Kif21b* transcripts distribution. (**b-c**) E12.5, E16.5 and E18.5 mouse brains section immunolabelled for Kif21b (magenta), β-III-tubulin (neuronal marker, green) and Tbr2 (intermediate progenitor marker, light grey) showing restricted expression of Kif21b in post-mitotic neurons and enrichment in the axon-rich zone (b, white arrowhead). (**d**) Western blot of extracts from progenitors (YFP-; CD24-, expressing Pax6 and Tbr2 transcription factors) and neurons (YFP+; CD24+, expressing β-III-tubulin) isolated by FACS from Rosa26-loxSTOP-YFP; $NEX^{CRE/+}$ E16.5 mouse cortices showing that Kif21b expression is restricted to neuronal population (n=3 independent experiments). GAPDH was used as a loading control. (**e**) Immunolabelling of Kif21b on P0 wild-type (WT) or Kif21b knock-out (KO) mouse brain confirm the specificity of the Kif21B staining. (**f**) Western blot of extracts from WT or Kif21b KO cortices showing the absence of Kif21b expression in KO brain (n=3 brains per genotype). Scale bars, (**a**) 500µm, (**b**) 250µm and (**c, e**) 100µm. (**b, c, e**) Nuclei are stained with DAPI.

Supplementary Figure 3: Overexpression of KIF21B missense variants induce abnormal neuronal migration through enhanced KIF21B motor activity, related to Figure 3. (**a-c**) Western blot of extract from (**a, b**) N2A cells transfected with the indicated NeuroD-IRES-GFP constructs or (**c**) ST cells transfected with the indicated HA-tagged constructs, show similar expression of both WT and mutant hKIF21B protein. Actin was used as a loading control. (**b**) Cycloheximide (CHX, 10µg/ml) treatment for the indicated duration show similar half-life of WT and mutant hKIF21B proteins. Data (means ± s.e.m) from at least 3 independent experiments. (**d**) Activated caspase3 (a-casp3, magenta)-immunolabelling of E18.5 mouse brain coronal sections electroporated at E14.5 with the indicated NeuroD-hKIF21B IRES-GFP constructs, showing no apoptosis defects. (**e**) RT-qPCR of HEK293T cells transfected with the indicated constructs showing *Kif21b* knock-down efficiency. Data (means ± s.e.m) from 3 independents experiments. (**f**) Coronal sections of E18.5 mouse brains electroporated at E14.5 with NeuroD:Cre-GFP together with either Cre inducible shRNA-*Kif21b* #1 or #2 or sh-scramble sequence. Rescue experiments were done by co-expressing NeuroD:Cre-GFP, inducible shRNA-*Kif21b* #2 together with WT-hKIF21B at 1 µg/µl. (**h**) Coronal sections of P2 mouse brains electroporated at E14.5 with the indicated NeuroD-IRES-GFP constructs. (**g, i**) Histograms (means ± s.e.m.) showing the distribution of GFP-positive neurons in different regions (Up CP, Lo CP, SVZ /IZ or WM) in all conditions as indicated (n≥ 7 (**g**) or n≥3 (**i**) embryos per condition). (**j**) Cux1-immunolabelling (grey) of P2 coronal sections of mouse brains electroporated at E14.5 with the indicated NeuroD-hKIF21B-IRES-GFP showing no specification defects of arrested neurons (green). (**d, f, h**) GFP positive electroporated cells are depicted in green. Nuclei are stained with DAPI. Scale bar, 50 µm. Significance was calculated by (**b**, **g, i**) two-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test or (**e**) un paired two-tailed Student t-test, ns, non-significant; *P < 0.05; **P < 0.005; ***P < 0.001, ****P < 0.0001. Up CP, Upper cortical plate; Lo CP, Lower cortical plate; IZ, intermediate zone; SVZ, subventricular zone, WM, white matter.

Supplementary Figure 4: Overexpression of the p.Gln313Lys hKIF21B variant does not impair proliferation in the developing mouse brain, related to Figure 4. (**a**) qRT-PCR analyses show expression of *drKif21b* transcripts in developing zebrafish larvaes at 1, 2, 4 and 5 days post-fertilization (dpf). Datas (means ± s.e.m) from 3 technical replicates per stage were analyzed by one-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test, non-significant. (**b**) Kif21b-immunolabelling (grey) of whole zebrafish larvae show Kif21b enrichment in different region of the brain (OT, optic tectum; Ey, eye; Fo, forebrain; Mid, midbrain; Ce, cerebellum). (**c**) Dorsal view of representative control zebrafish larvae (non-injected) or injected with 100 pg of p.Ile678Leu *hKIF21B* RNAs at 5 dpf. Double arrow indicates the distance between the forebrain and hindbrain, a measure used as a proxy for head size. (**d**) Dot plot of the head measurements (red double arrow)

of control and larvae at 5dpf. Red diamond corresponds to the mean of the batch measured. Experiments were repeated three times with at least n=39 larvae per batch. Significance was calculated by unpaired tow-tailed Student t-test comparisons between control and RNA-injected larvae, ns, non-significant. (**e, f, h, i**) Tbr2 (magenta) (**e**, **f**) of Pax6 (magenta) (**h**, **i**) and Ki67 (grey) double immunolabeling of coronal sections of E16.5 mouse cortices electroporated at E14.5 with NeuroD-IRES-GFP empty vector or NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys. GFP positive electroporated cells are depicted in green. Nuclei are stained with DAPI. (**g**, **j**) Analysis (means ± s.e.m) of the percentage of Tbr2-positive cells, Pax6-positive cells, Ki67-positive cells or cells double positive for Tbr2 (**g**) or Pax6 (**i**) and Ki67 in the intermediate zone (IZ) or sub-ventricular zone (SVZ) in a fixed-size square represented in (**e**) and (**h**). Data from at least 3 embryos per condition were analyzed by unpaired tow-tailed Student t-test, ns, non-significant. Scale bars, (**b**) 10 µm; (**e, h**) 100 µm (**f**, upper panel) 100 µm, (**f**, lower panel and **i**) 50 µm.

Supplementary Figure 5: p.Ile678Leu hKIF21B variant impedes interhemispheric connectivity through aberrant motor activity, related to Figure 5. (**a, e**) Coronal sections of (**a**) P4 or (**e**) P22 mouse brains after *in utero* electroporation with pCAG2-Scarlet and a NeuroD (ND)-IRES-GFP empty vector or WT or p.Ile678Leu NeuroD-hKIF21B-IRES-GFP constructs at E15.5. (**b, f**) Close-up views of the red boxed area in (**a**) or (**e**) showing impaired axonal interhemispheric connectivity upon expression of the p.Ile678Leu variant both at P4 and P22. (**c-d**) Histograms presenting the quantification of (**c**) the percentage of axon crossing the midline and (**d**) the percentage of projecting neurons for all conditions tested as indicated at P4. Data (means ± s.e.m) from at least 3 animals per condition were analyzed by one-way ANOVA, with Bonferroni's multiple comparisons test, **P < 0.005; ns, non-significant. (**g**) Contralateral side of P22 mouse brain coronal sections electroporated with pCAG2-Scarlet and a NeuroD (ND)-IRES-GFP empty vector or WT or p.Ile678Leu NeuroD-IRES-GFP constructs at E15.5 showing no terminal branching defects for all conditions tested. (**h**) Quantification of normalized pScarlet fluorescence along the radial axis of the cortical wall in the contralateral cortex. Data (means ± s.e.m) from at least 3 animals per condition were analyzed by two-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test, ns, non-significant. Scale bars (a, b, e, f and g), 250 µm.

Supplementary Figure 6: Overexpression of p.Ile678Leu hKIF21B variant impairs ipsilateral intracortical axon collaterals formation through a dominant negative effect on motility, related to figure 6. (**a**) Representative DIV5 cortical neurons magnetofected at DIV2 with pCAG2-Scarlet together with control empty pCDNA-HA (HA-EV) or WT, p.Gln313Lys, pAla1001Thr, p.Ile678Leu or pCDNA-HA-hKIF21B constructs. Scale bar, 150 µm. (**b-d**) Quantification of (**b**) the longest neurite length (axon) or (**c**) the mean of

collaterals length at DIV5 after overexpression of the indicated constructs. (**d**) Distribution of axon collateral branches length at DIV5 after overexpression of the indicated constructs. (**b-d**) Data (means ± s.e.m.) of (**b**) the longest neurite length (n≥30 neurons), (**c**) the mean of collateral length (n≥160 collaterals, ≥30 neurons) or (**d**) distribution of axon collaterals length (n≥160 collaterals, ≥30 neurons) from at least 3 independent neuronal cultures were analyzed by (**b**) unpaired two-tailed Student t-test, (**c**) one-way ANOVA or (**d**) two-ways ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test, ns, non-significant; *P < 0.05; **P < 0.005; ***P < 0.001.

Supplementary Table 1: List of primary and secondary antibodies used in this work. IHC, immunohistochemistry, IF, immunofluorescence; WB, western blot.

Primary antibody	**Host**	**Dilution**	**Used for**	**Compagny**	**reference**
β-III-tubulin	Mouse	1/200	IHC, WB	Eurogentec	MMS-435P-0100
Caspase-3	Rabbit	1/100	IHC	R and D system	AF835
Cux1	Rabbit	1/200	IHC	Proteintech	HPA003317
GFP	Goat	1/500	IHC	Abcam	ab6673
GFP	Chicken	1/500	IHC	Abcam	GFP-1020
HA	Rat	1/1000	IF, WB	Sigma-Aldrich	11867423001
Myc-Tag	Rabbit	1/1500	WB	Cell Signalling	71D10
Nestin	Mouse	1/1000	IHC	Abcam	Ab6142
KIF21B	Rabbit	1/200	IHC, IF, WB	Sigma-Aldrich	HPA027274
KIF21B	Rabbit	1/500	IF (zebrafish staining)	Abcam	ab135410
Pax6	Rabbit	1/500	IHC	Biolegends	901301
Tau	Mouse	1/1000	IF	Millipore	MAB3420
Tbr2	Rat	1/250	IHC, WB	EBiosciences	14-4875-80

Secondary antibody	**Host**	**Dilution**	**Used for**	**Provenance**	**References**
Actin coupled HRP	Mouse	1/100 000	WB	Sigma-Aldrich	A3854
Goat-mouse-HRP	Mouse	1/10 000	WB	ThermoFisher Sc.	G-21040
Goat-rabbit-HRP	Rabbit	1/10 000	WB	ThermoFisher Sc.	G-21234

Goat-rat-HRP	Rat	1/10 000	WB	ThermoFisher Sc.	62-9520
Donkey-goat-488	Goat	1/1000	IF	ThermoFisher Sc.	A-11055
Donkey-mouse-488	Mouse	1/1000	IF	ThermoFisher Sc.	A-21202
Donkey-mouse-555	Mouse	1/1000	IF	ThermoFisher Sc.	A-31570
Donkey-rabbit-488	Rabbit	1/1000	IF	ThermoFisher Sc.	R-37118
Donkey-rabbit-555	Rabbit	1/1000	IF	ThermoFisher Sc.	A-31572
Donkey-rat-488	Rat	1/1000	IF	ThermoFisher Sc.	A-21208
Ki67 coupled-570	Rat	1/500	IF	eBioscience	41 5698 80

Supplementary Note

Clinical features of patients with KIF21B variants

Patient 1 (c.2032A>C, p.Ile678Leu)

Patient 1 is the second child of healthy, Caucasian ,non- consanguineous parents. He was born at full term with normal growth parameters and had an uncomplicated neonatal course. Concerns about development were raised at 18 months when he started to walk. He had an uneven gait, stereotypies and no speech. Brain MRI at age two years revealed isolated complete agenesis of the corpus callosum (**Fig.1e**). He presented with down-slanting palpebral fissures and downturned corners of the mouth. His first words was at 36 months. He currently has appropriate expressive language despite persistent dysarthria. He was evaluated at six years and nine months (WISC IV) and total IQ was 78 which is consistent with borderline intellectual disability (ID). He has learning disabilities and is therefore cared for in a medico educational institution. He takes methylfenidate due to hyperactivity. Most recent neurological examination was unremarkable. The patient has muscle stiffness, but benefits from physical therapy to ease pain.

Patient 2 (c.937C>A, p.Gln313Lys)

Patient 2 is the child of healthy, non-consanguineous, African American parents. The pregnancy was complicated by intra uterine growth restriction and oligohydramnios. He was born at 38 gestation with height at 49cm (49^{th} percentile), weight at 2.584kg (7^{th} percentile) and head circumference at 32cm (5^{th} percentile). He had a nuchal cord at birth transient cyanosis associated with mild respiratory distress, but was discharged home without complications. He presented with severe developmental delay and at 12 years old. He was unable to sit and was non-verbal. Clinical examination at 12 years showed growth difficulties with weight at 20kg ($<1^{st}$ percentile), height at 139 cm (8^{th} percentile) and microcephaly with head circumference at 48.5cm ($<1^{st}$ percentile, -3.9 SD). He had poor visual fixation with constant tongue thrusting and poor head control. He presented with bilateral ankle tightness, and right wrist contracture.

Patient 3 (c.3001G>A, p.Ala1001Thr)

Patient 3 is a girl of non-consanguineous Dutch parents. Both parents have a reported personal history of mild intellectual disability. The father is a carrier of the variant and present with developmental delay and learning diffculties. The pregnancy was routine and she was born at full term with normal growth parameters.. Her psychomotor development was delayed, she sat at ten months and walked at 24 months. She said her first

words at 36 months of age. At age five years, she was able to speak in sentences. She presented with mild to moderate ID. Upon clinical examination, she had mild dysmoprhic features including epicanthal folds, mild ptosis, and tented upperlip. Her legs were mildly hypertonic. The brain MRI did not show any structural abnormalities.

Patient 4 (c.2959_2962dup, p.Asn988Serfs*4)

Patient 4 was born to non-canguinous parents. Mother had a seizure disorder and she took Topiramate during the pregnancy. Antenatal ultrasound was positive for the fetus measuring small for gestational age. He was born at 38 weeks gestation by cesarean section secondary to repeat maternal seizures. Neonatal mensurations confirmed hypotrophy with birth height at 43 cm (<1st percentile), birth weight at 2633 g (8th percentile). He had feeding difficulties in the neonatal period requiring an NG tube. Problems persisted and he received a G-tube at 18 months. Currently, he takes mainly by mouth and uses the G-tube for medications. He has a history of moderate to severe constipation. At 37 months of age, he had a developmental quotient of 97 consistent with a history of mild global developmental delays. He was diagnosed with right Duane syndrome and has central sleep apnea requiring C pap after adenoidectomy. He had a chromosome microarray (CMA) that was non-diagnostic; it showed he was a carrier for Poretti-Boltshauser syndrome [OMIM: 615960] due to a single heterozygous LAMA1 deletion and a gain on 22q11.23 with no clinical consequence associated. He has also had normal mitochondrial sequencing.

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
Age at last evaluation	10y	10y	5y8m	3y8m
Sex	Male	Male	Female	Male
Genetics				
Gene	KIF21B	KIF21B	KIF21B	KIF21B
NM_001252100.1	c.2032A>C	c.937C>A	c.3001G>A	c.2959_2962dupGCCA
HGVS protein nomenclaure	p.Ile678Leu	p.Gln313Lys	p.Ala1001Thr	p.Asn988Serfs*4
Inheritance	de novo	de novo	inherited from the affected father	de novo
Pregnancy and delivery				
Pregnancy	Normal	Oligohydramnios and IUGR	Normal	Small for gestational age
Height (perc)/weight(perc)/Head Circumference(perc) at birth	51cm (97th p), 3.750kg (97th p), 33cm (15th p)	49cm (49th p), 2.584kg (7th p), 32cm (5th p)	3.480kg (50th p)	46.4cm (7th p), 2.633kg (5.87th p), *34cm (25th p) *measurements done at age 6 days
Neonatal findings	None	Nuchal cord at birth and was blue, mild respiratory distress, but discharged with mother	None	Feeding issues, NG tube
Developmental stages				
Age of sitting (months)	10	does not	14	9
Age of walking (months)	18	does not	24	15-16
Language delay	yes	yes	yes	no
Age of first words (m:months, y:years)	36m		36m	12m
Age of first sentences (m:months, y:years)	NA		N/A	24m
Current language ability	Short sentences, dysarthria	Non-verbal	Sentences	Short sentences
Intellectual disability (ID)				
Estimated level of ID (mild, moderate, severe)	Borderline	Severe	Mild	Mild
Age at evaluation (y)	10y			
Total IQ	66 - 79 (WISC V)			
Clinical Examination				
Age at examination (years)	5y	12y1m	3y9m	3y8m
Height (SD)/weight(SD)/Head Circumference(SD)	118cm (+1,5), 21,3kg (+2), 52cm (+0,5)	139cm (-1.3), 20kg (-3.4), 48.5cm (-3.9)	99cm (-1,1), 17,8kg (+1,8), 49,6cm (-0,2)	90.7cm (-1.67), 16.3kg (+0.09), 50.7cm (+0.72)
Neurologic examination	Slow	Poor visual fixation, constant toungue thrusting, poor gag, poor head control, bilateral ankle tightness, right wrist contracture	Mildly hypertonic legs	Hypotonia
Dysmorphic features (yes please describe)	Plagiocephaly	Large eyes, fleshy ears, hypertelorism	Epicanthic folds, mild ptosis, tented upperlip	Upslanting palpebral fissures, prominent eyebrows, broad nose with bulbous tip, anteverted nares. Micrognathia. Right sided Duane syndrome
Brain imaging (MRI)				
Age at examination (m:months, y:years)	3y	6m and 12 y	2y	1y9m
Brain anomalies (MRI)	Complete agenesis of the corpus callosum	Normal	No structural abnormalites, myelinisation not completed yet. Normal differentiation white and grey matter. No focal lesions. Normal spectroscopy.	A few scattered punctate foci of T2 prolongation in subcortical white matter and periventricular white matter of bilateral cerebral hemispheres with no associated restricted diffusion or hemorrhage
Other				
				History of falling spells with normal EEG. Severe constipation, Central sleep apnea, History of feeding issues requiring G tube.

Figure 1

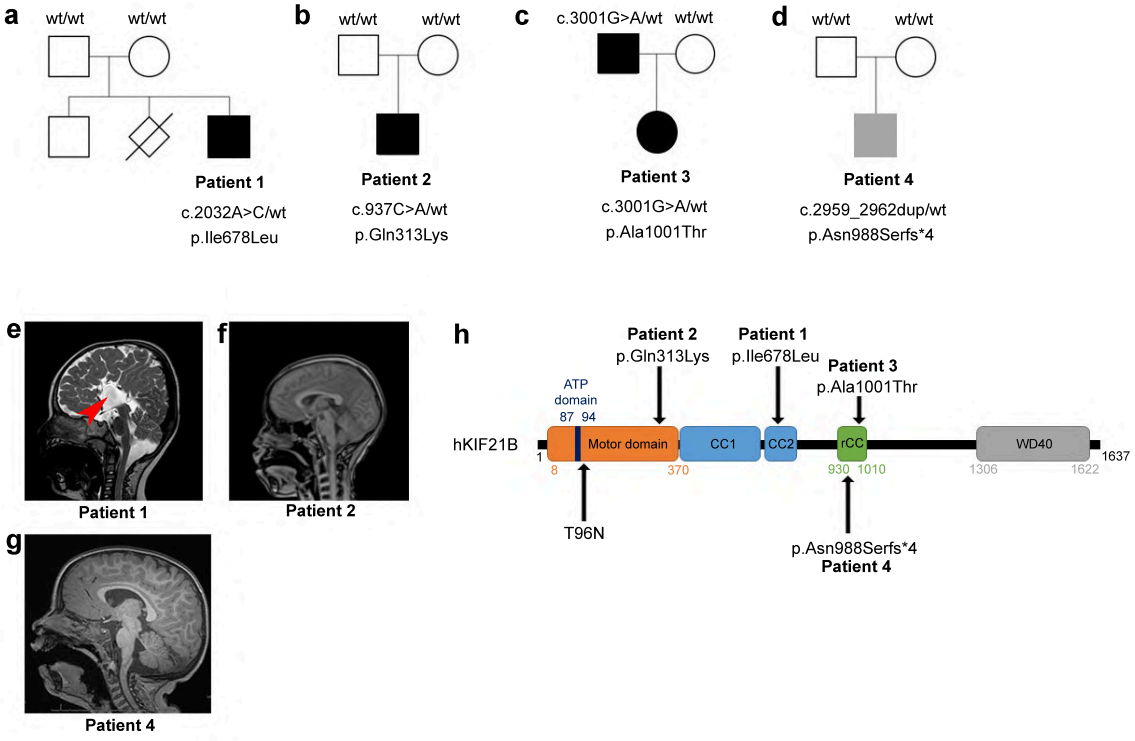

a
wt/wt
wt/wt
Patient 1
c.2032A>C/wt
p.Ile678Leu
b
wt/wt
wt/wt
Patient 2
c.937C>A/wt
p.Gln313Lys
c
c.3001G>A/wt
wt/wt
Patient 3
c.3001G>A/wt
p.Ala1001Thr
d
wt/wt
wt/wt
Patient 4
c.2959_2962dup/wt
p.Asn988Serfs*4
e
Patient 1
f
Patient 2
g
Patient 4
h
Patient 2
p.Gln313Lys
Patient 1
p.Ile678Leu
Patient 3
p.Ala1001Thr
ATP
domain
87 94
hKIF21B
Motor domain
CC1
CC2
rCC
WD40
1
8
370
930 1010
1306
1622
1637
T96N
p.Asn988Serfs*4
Patient 4

Figure 2

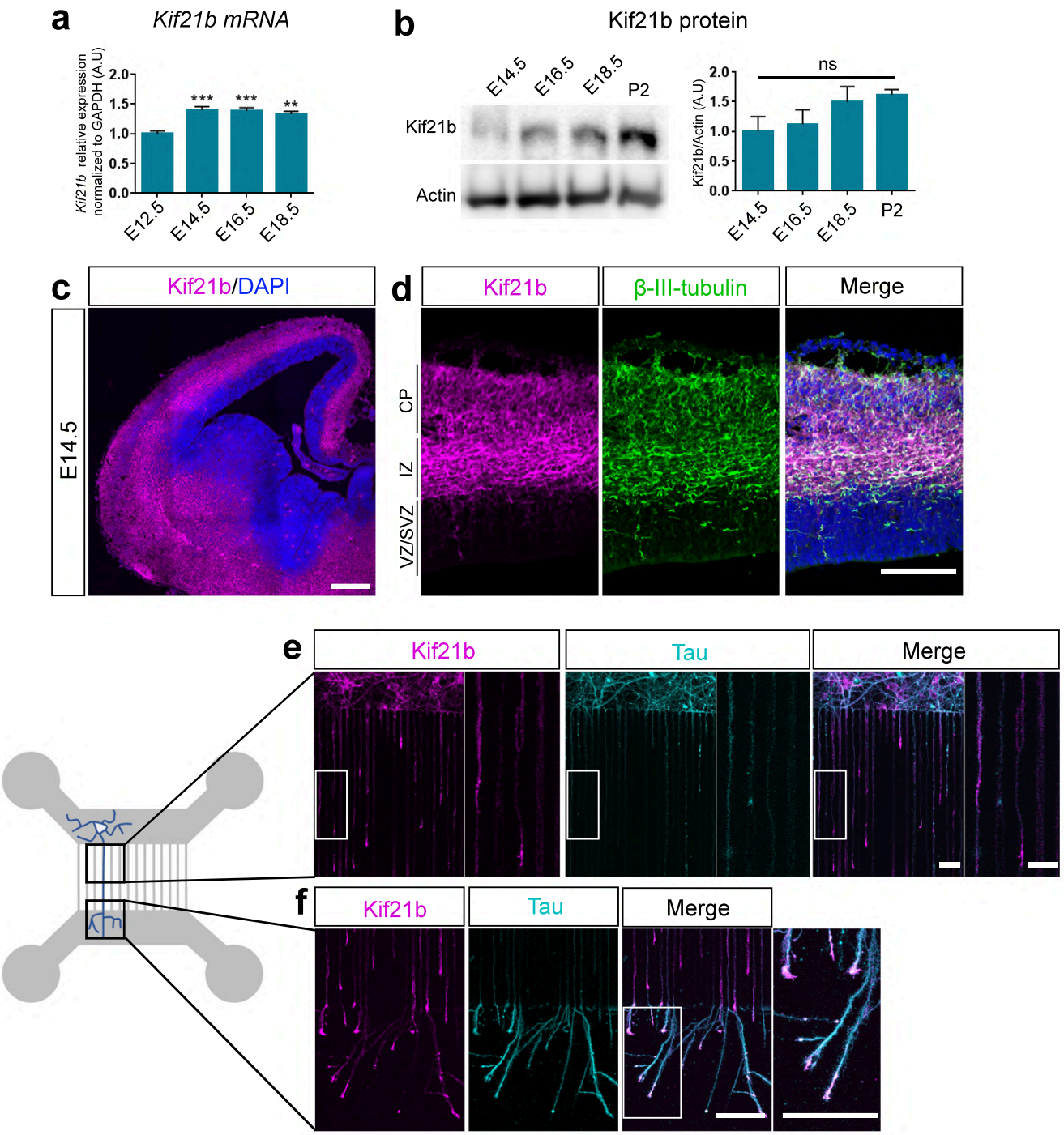

a
Kif21b mRNA
Kif21b relative expression normalized to GAPDH (A.U)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
***
**
E12.5
E14.5
E16.5
E18.5
b
Kif21b protein
E14.5
E16.5
E18.5
P2
Kif21b
Actin
ns
Kif21b/Actin (A.U)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
E14.5
E16.5
E18.5
P2
c
Kif21b/DAPI
E14.5
d
Kif21b
β-III-tubulin
Merge
CP
IZ
VZ/SVZ
e
Kif21b
Tau
Merge
f
Kif21b
Tau
Merge

Figure 3

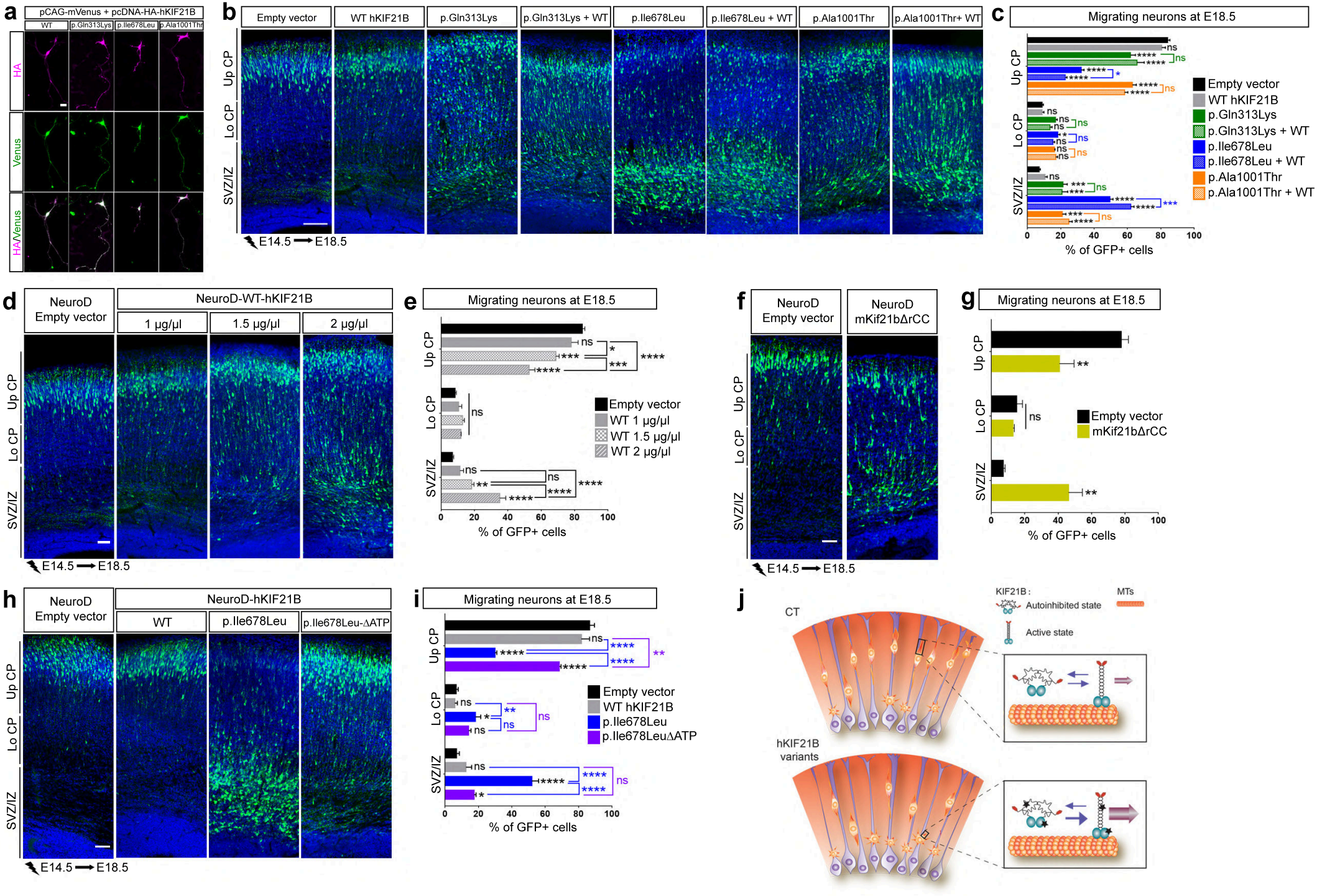

a
pCAG-mVenus + pcDNA-HA-hKIF21B
WT
p.Gln313Lys
p.Ile678Leu
p.Ala1001Thr
HA
Venus
HA/Venus
b
Empty vector
WT hKIF21B
p.Gln313Lys
p.Gln313Lys + WT
p.Ile678Leu
p.Ile678Leu + WT
p.Ala1001Thr
p.Ala1001Thr+ WT
Up CP
Lo CP
SVZ/IZ
E14.5 → E18.5
c
Migrating neurons at E18.5
Up CP
Lo CP
SVZ/IZ
% of GFP+ cells
Empty vector
WT hKIF21B
p.Gln313Lys
p.Gln313Lys + WT
p.Ile678Leu
p.Ile678Leu + WT
p.Ala1001Thr
p.Ala1001Thr + WT
d
NeuroD Empty vector
NeuroD-WT-hKIF21B
1 µg/µl
1.5 µg/µl
2 µg/µl
E14.5 → E18.5
e
Migrating neurons at E18.5
% of GFP+ cells
Empty vector
WT 1 µg/µl
WT 1.5 µg/µl
WT 2 µg/µl
f
NeuroD Empty vector
NeuroD mKif21bΔrCC
E14.5 → E18.5
g
Migrating neurons at E18.5
% of GFP+ cells
Empty vector
mKif21bΔrCC
h
NeuroD Empty vector
NeuroD-hKIF21B
WT
p.Ile678Leu
p.Ile678Leu-ΔATP
E14.5 → E18.5
i
Migrating neurons at E18.5
% of GFP+ cells
Empty vector
WT hKIF21B
p.Ile678Leu
p.Ile678LeuΔATP
j
CT
hKIF21B variants
KIF21B :
Autoinhibited state
Active state
MTs

Figure 4

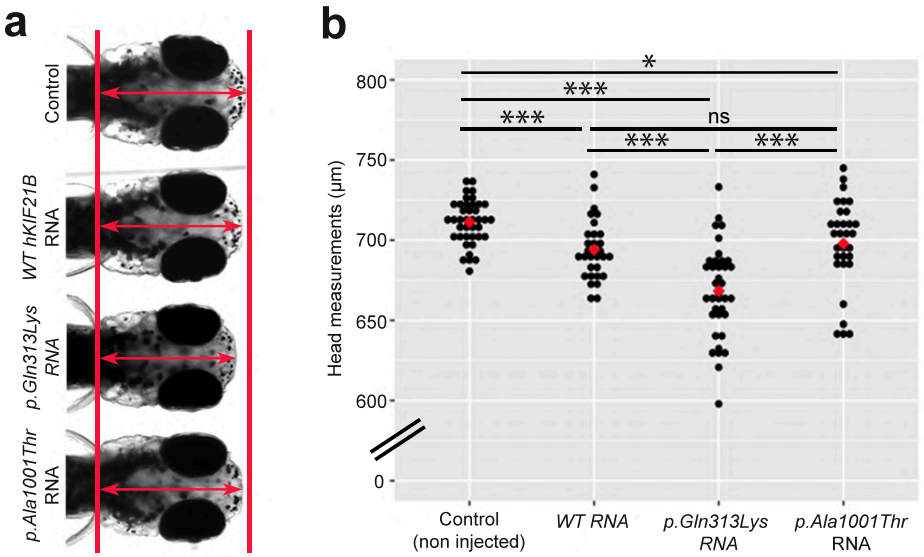

a
Control
WT hKIF21B RNA
p.Gln313Lys RNA
p.Ala1001Thr RNA
b
Head measurements (µm)
800
750
700
650
600
0
*
***
***
ns
***
***
Control (non injected)
WT RNA
p.Gln313Lys RNA
p.Ala1001Thr RNA

Figure 5

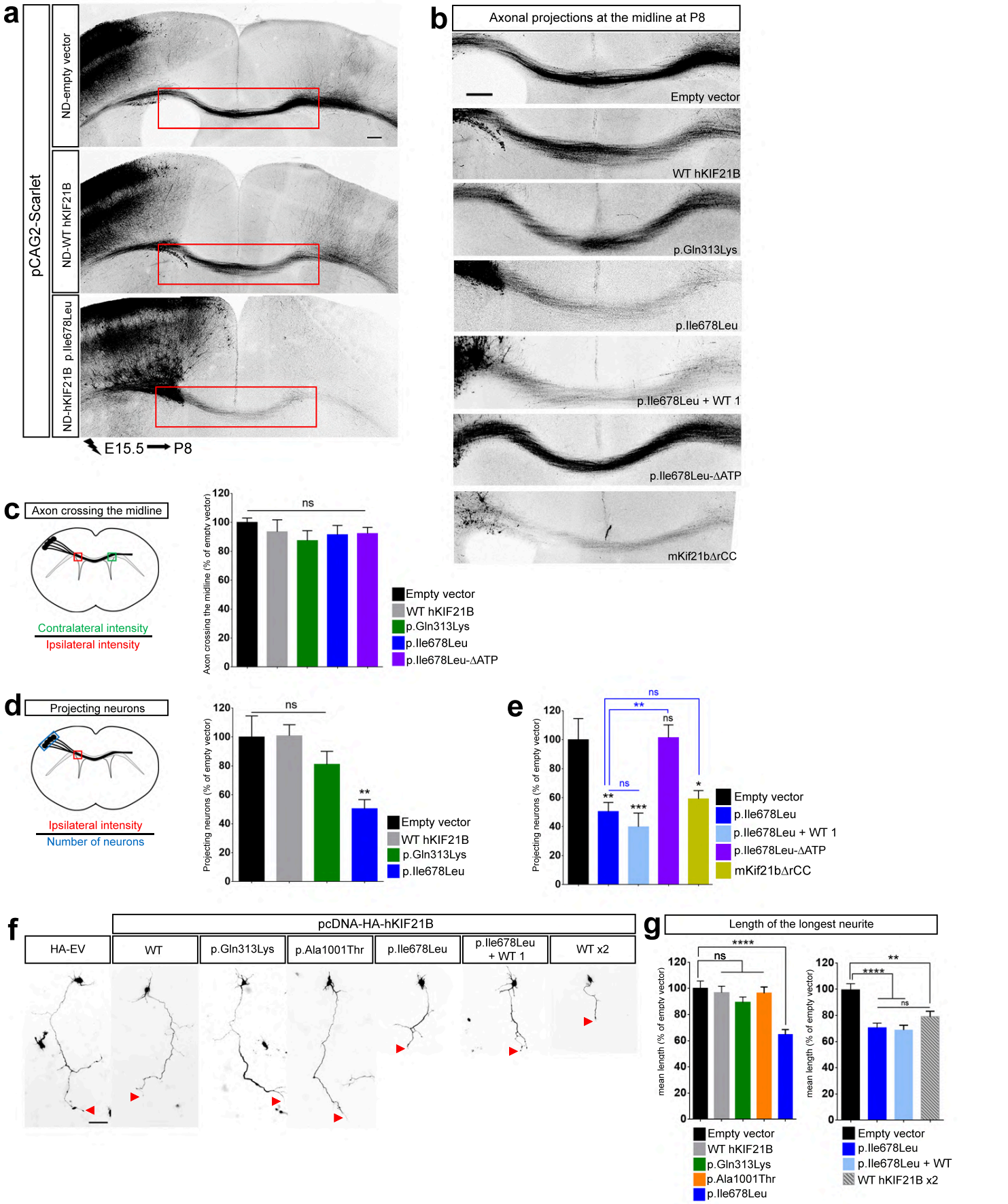
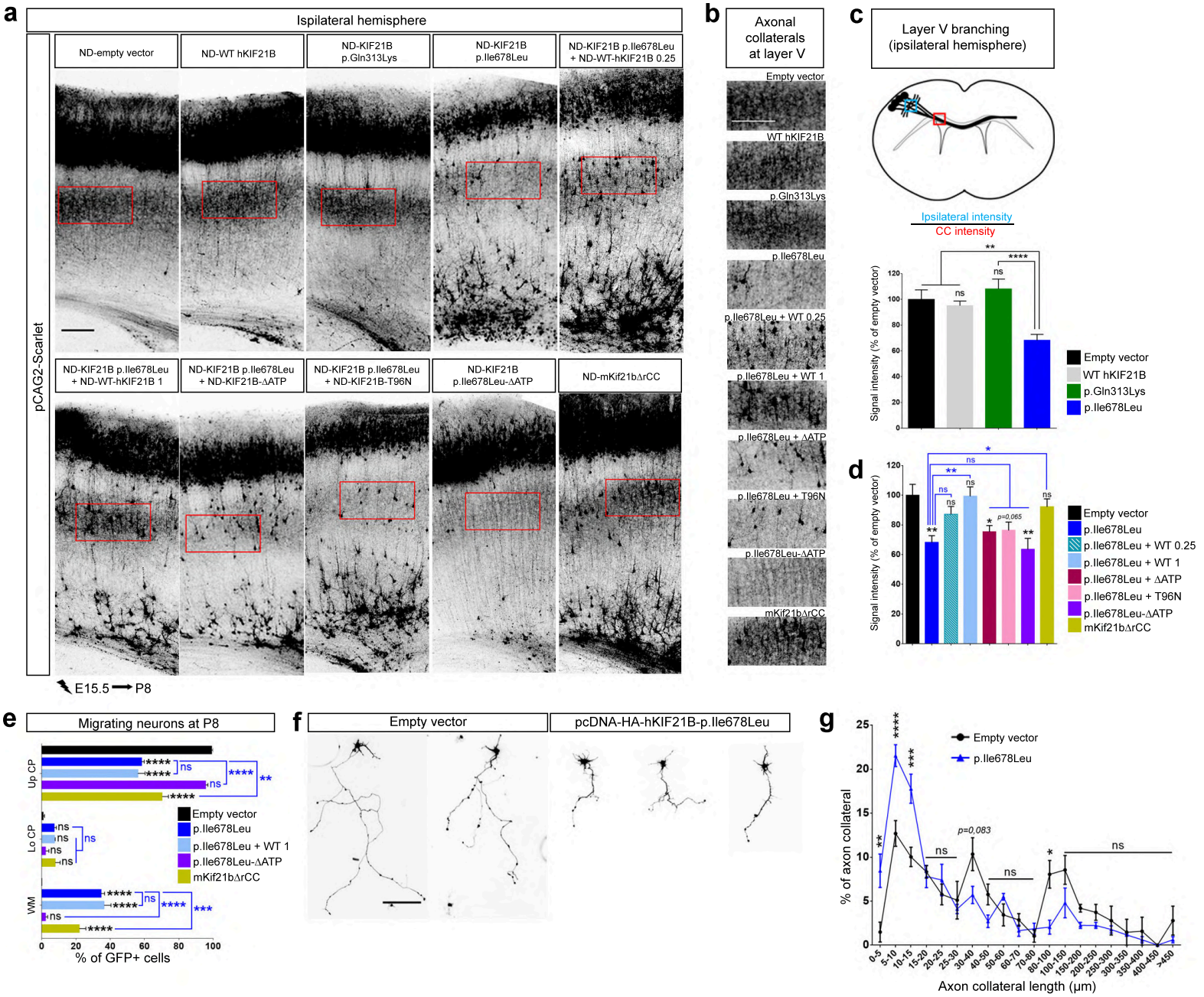
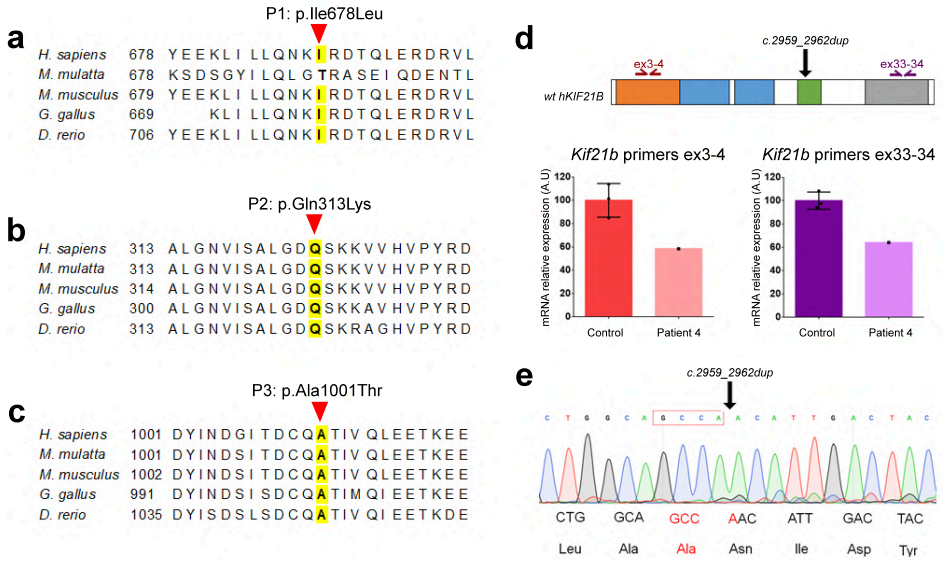

a
pCAG2-Scarlet
ND-empty vector
ND-WT hKIF21B
ND-hKIF21B p.Ile678Leu
E15.5 → P8
b
Axonal projections at the midline at P8
Empty vector
WT hKIF21B
p.Gln313Lys
p.Ile678Leu
p.Ile678Leu + WT 1
p.Ile678Leu-ΔATP
mKif21bΔrCC
c
Axon crossing the midline
Contralateral intensity
Ipsilateral intensity
Axon crossing the midline (% of empty vector)
ns
Empty vector
WT hKIF21B
p.Gln313Lys
p.Ile678Leu
p.Ile678Leu-ΔATP
d
Projecting neurons
Ipsilateral intensity
Number of neurons
Projecting neurons (% of empty vector)
ns
**
Empty vector
WT hKIF21B
p.Gln313Lys
p.Ile678Leu
e
Projecting neurons (% of empty vector)
ns
**
ns
ns
**
***
*
Empty vector
p.Ile678Leu
p.Ile678Leu + WT 1
p.Ile678Leu-ΔATP
mKif21bΔrCC
f
pcDNA-HA-hKIF21B
HA-EV
WT
p.Gln313Lys
p.Ala1001Thr
p.Ile678Leu
p.Ile678Leu + WT 1
WT x2
g
Length of the longest neurite
mean length (% of empty vector)
****
ns
Empty vector
WT hKIF21B
p.Gln313Lys
p.Ala1001Thr
p.Ile678Leu
mean length (% of empty vector)
**
****
ns
Empty vector
p.Ile678Leu
p.Ile678Leu + WT
WT hKIF21B x2

Figure 6


a
Ispilateral hemisphere
pCAG2-Scarlet
ND-empty vector
ND-WT hKIF21B
ND-KIF21B p.Gln313Lys
ND-KIF21B p.Ile678Leu
ND-KIF21B p.Ile678Leu + ND-WT-hKIF21B 0.25
ND-KIF21B p.Ile678Leu + ND-WT-hKIF21B 1
ND-KIF21B p.Ile678Leu + ND-KIF21B-ΔATP
ND-KIF21B p.Ile678Leu + ND-KIF21B-T96N
ND-KIF21B p.Ile678Leu-ΔATP
ND-mKif21bΔrCC
E15.5 → P8
b
Axonal collaterals at layer V
Empty vector
WT hKIF21B
p.Gln313Lys
p.Ile678Leu
p.Ile678Leu + WT 0.25
p.Ile678Leu + WT 1
p.Ile678Leu + ΔATP
p.Ile678Leu + T96N
p.Ile678Leu-ΔATP
mKif21bΔrCC
c
Layer V branching (ipsilateral hemisphere)
Ipsilateral intensity
CC intensity
Signal intensity (% of empty vector)
Empty vector
WT hKIF21B
p.Gln313Lys
p.Ile678Leu
d
Signal intensity (% of empty vector)
Empty vector
p.Ile678Leu
p.Ile678Leu + WT 0.25
p.Ile678Leu + WT 1
p.Ile678Leu + ΔATP
p.Ile678Leu + T96N
p.Ile678Leu-ΔATP
mKif21bΔrCC
e
Migrating neurons at P8
Up CP
Lo CP
WM
% of GFP+ cells
Empty vector
p.Ile678Leu
p.Ile678Leu + WT 1
p.Ile678Leu-ΔATP
mKif21bΔrCC
f
Empty vector
pcDNA-HA-hKIF21B-p.Ile678Leu
g
Empty vector
p.Ile678Leu
% of axon collateral
p=0,083
Axon collateral length (µm)

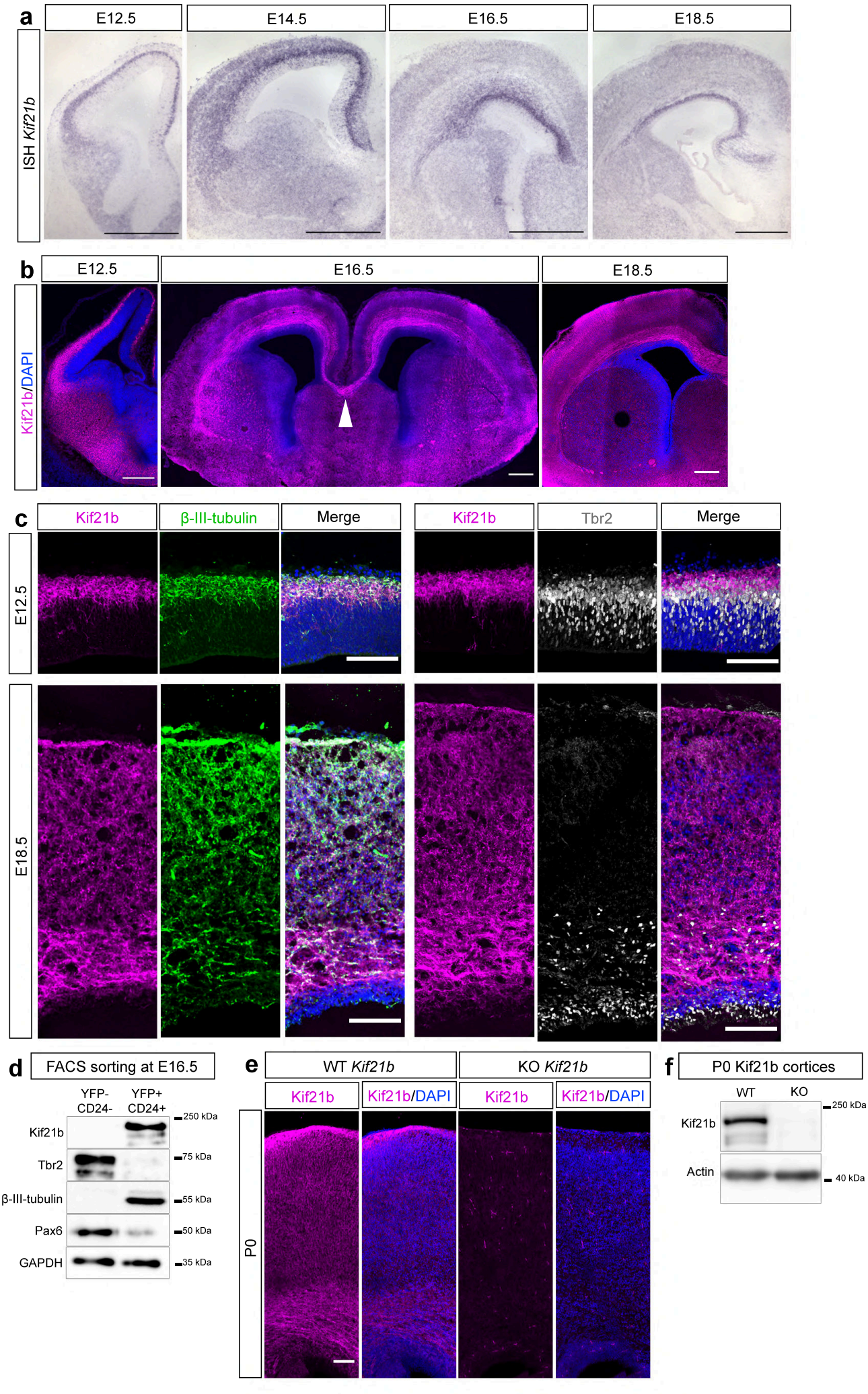
Supplementary Figure 1



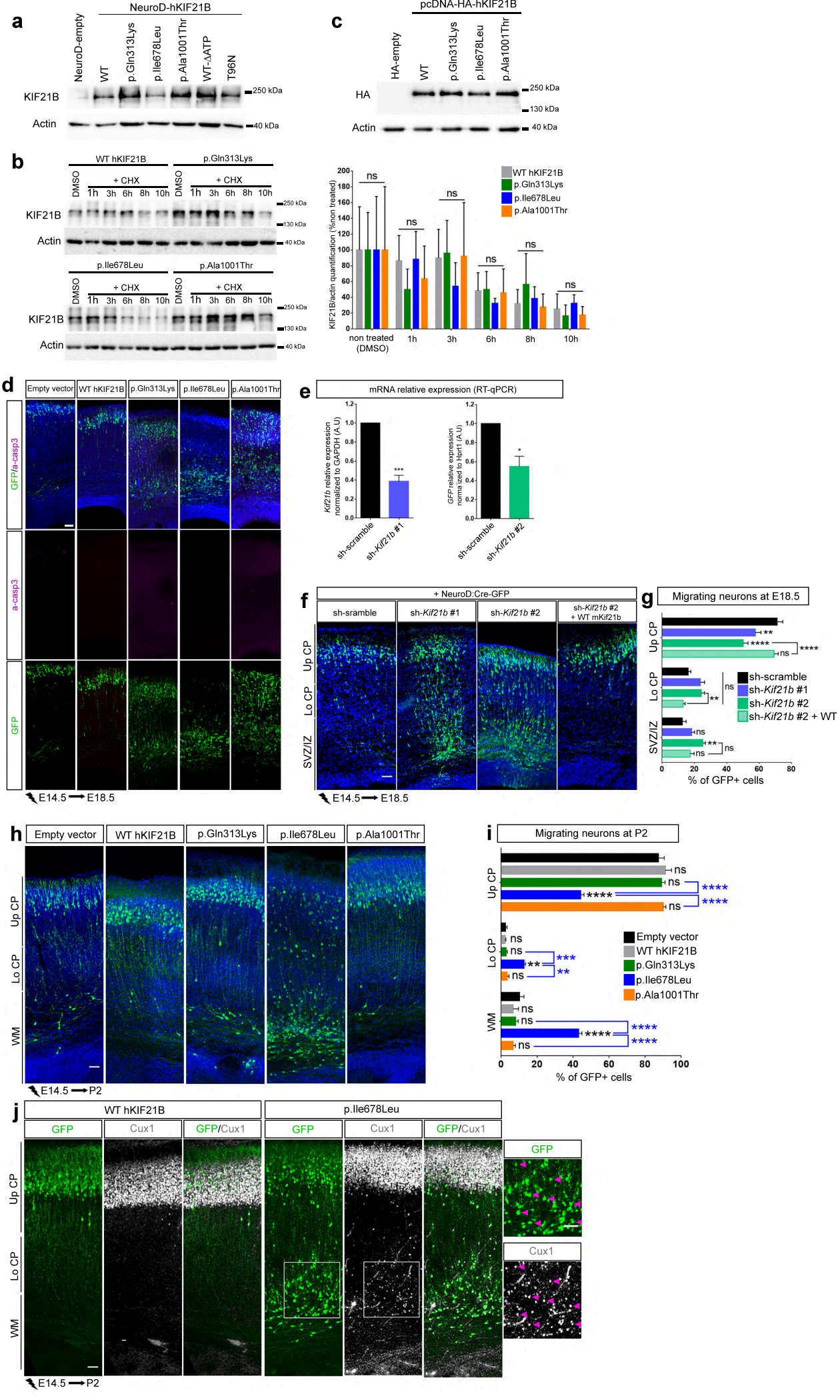
f

Patient No.	Sequence changes in *KIF21B* gene	Align GVGD	SIFT	Mutation Taster	Polyphen-2	CADD
1	c.2032A>C, p.Ile678Leu	Class C0 (GV: 241.08 - GD: 4.86)	Tolerated (score: 0.05)	**Disease causing** (p-value: 1)	**Probably damaging** with a score of 0.960 (sensitivity: 0.78; specificity: 0.95)	25.4
2	c.937C>A, p.Gln313Lys	Class C0 (GV: 223.30 - GD: 36.80)	**Deleterious** (score: 0)	**Disease causing** (p-value: 1)	**Probably damaging** with a score of 0.985 (sensitivity: 0.74; specificity: 0.96)	38
3	c.3001G>A, p.Ala1001Thr	Class C55 (GV: 0.00 - GD: 58.02)	**Deleterious** (score: 0)	**Disease causing** (p-value: 1)	**Probably damaging** with a score of 0.997 (sensitivity: 0.41; specificity: 0.98)	29.1

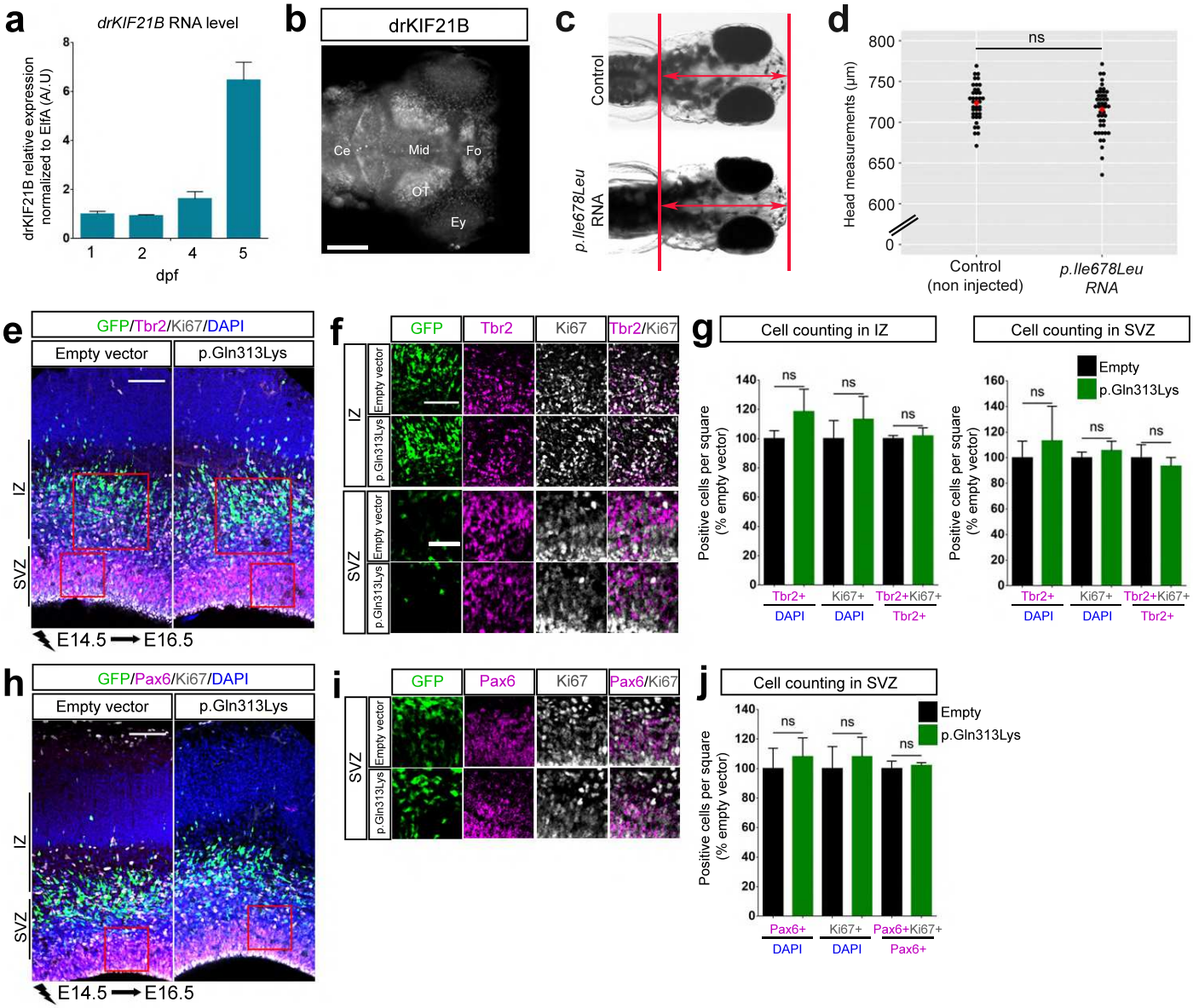
Supplementary Figure 2



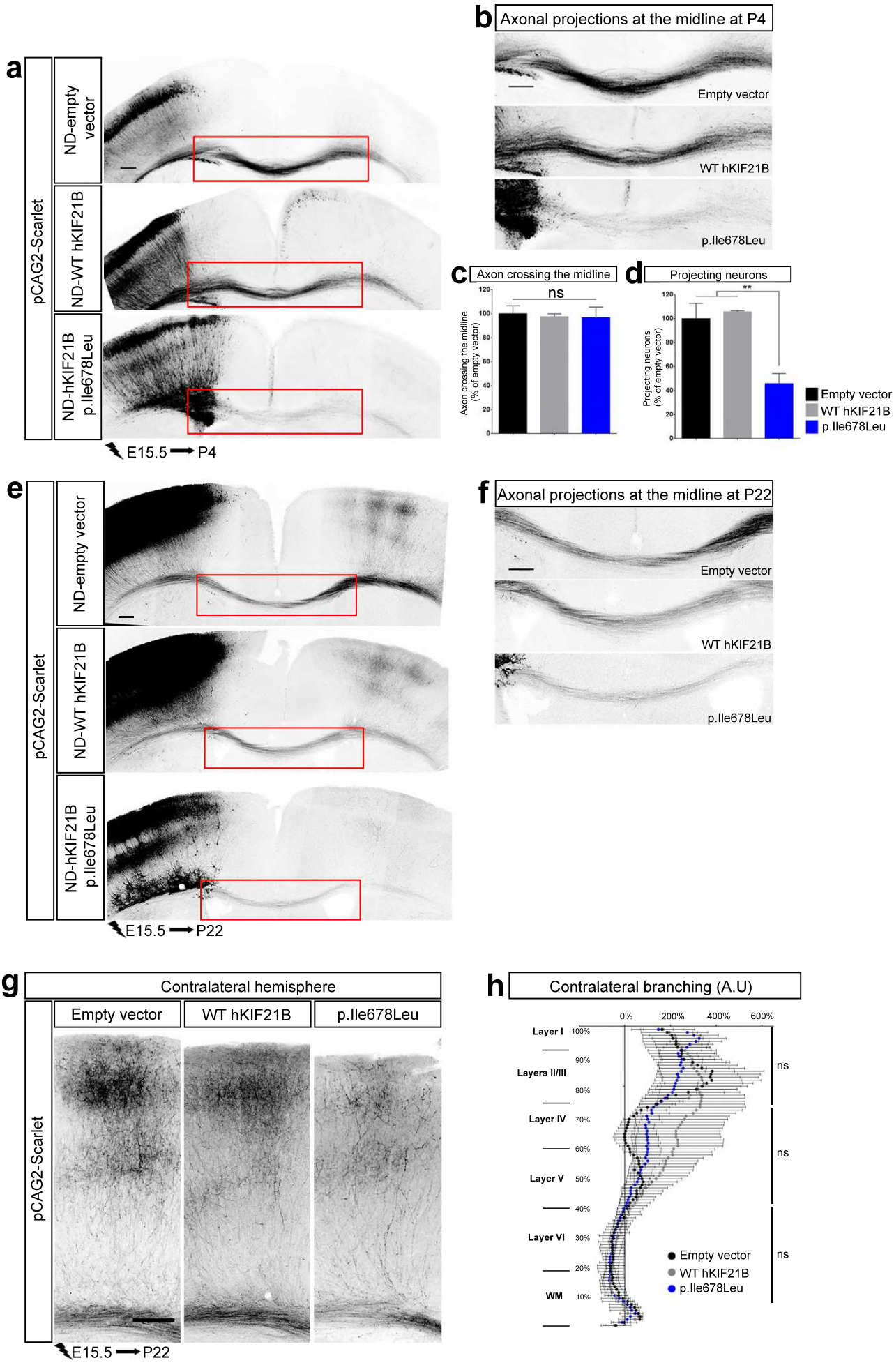
Supplementary Figure 3



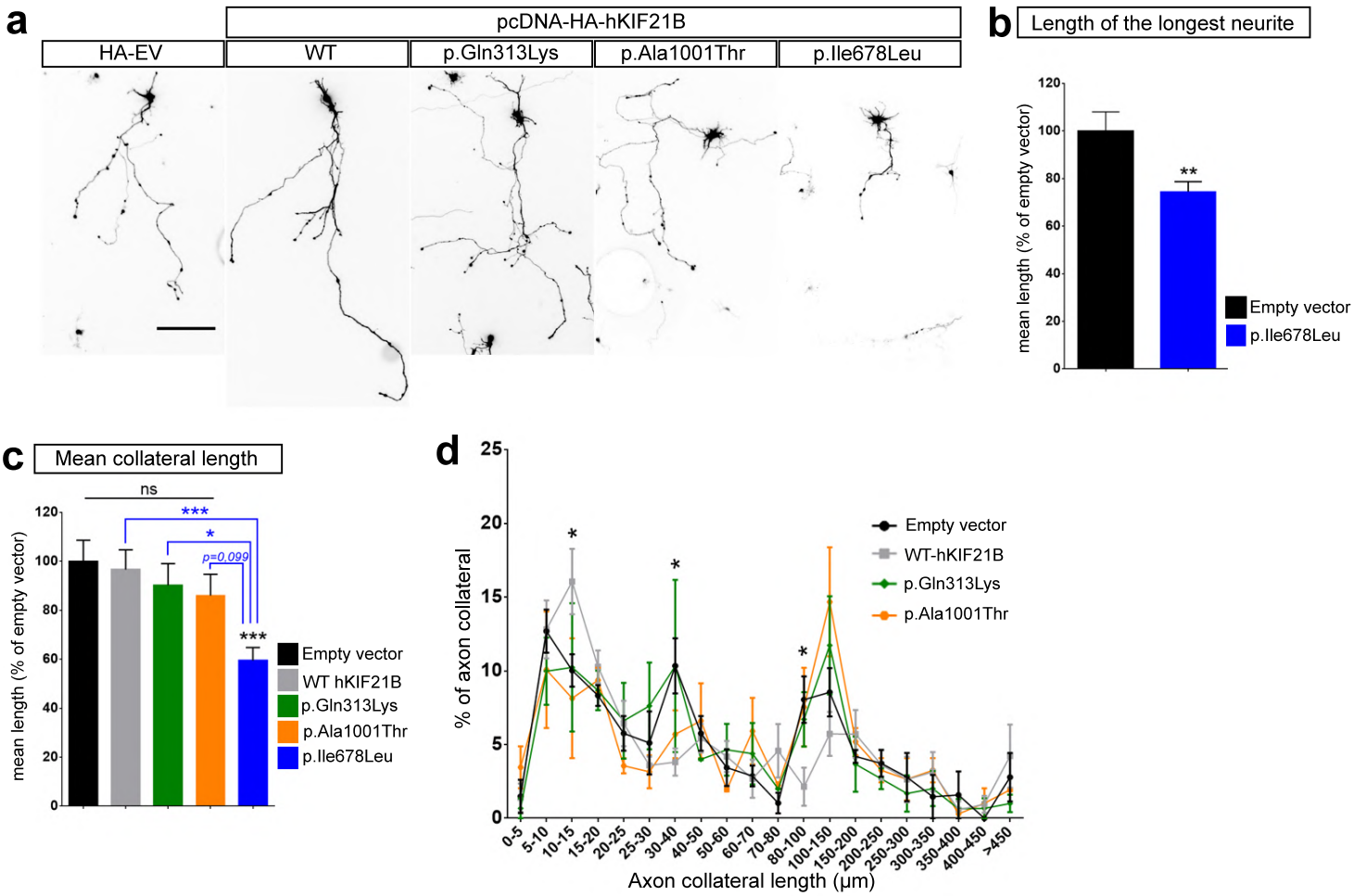
Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 6



Supplemental Table 2 : Statistics

Panel	Figure 2					
a	**Anova table. One-way ordinary ANOVA**					
	Number of families	1				
	Number of comparisons per family	3				
	Alpha	0,05				
	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
	E12.5 vs. E14.5	-0,3978	-0,6035 to -0,1922	Yes	***	0,0005
	E12.5 vs. E16.5	-0,3825	-0,5881 to -0,1768	Yes	***	0,0007
	E12.5 vs. E18.5	-0,3293	-0,5350 to -0,1237	Yes	**	0,0024
b	**Anova table. One-way ordinary ANOVA**					
	Number of families	1				
	Number of comparisons per family	3				
	Alpha	0,05				
	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
	E14.5 vs. E16.5	-0,123	-1,29 to 1,05	No	ns	> 0,9999
	E14.5 vs. E18.5	-0,497	-1,67 to 0,674	No	ns	0,6369
	E14.5 vs. P2	-0,617	-1,79 to 0,554	No	ns	0,4013

Panel	Figure 3					
c	**Anova table. 2-way ordinary ANOVA**					
	Number of families	3				
	Number of comparisons per family	28				
	Alpha	0,05				
	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
	IZ SVZ					
	NeuroD-empty vector vs. NeuroD-h-KIF21B-WT	-3,35	-11,8 to 5,09	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-empty vector vs. NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys	-14,1	-24,0 to -4,24	Yes	***	0,0003
	NeuroD-empty vector vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu	-42,4	-51,1 to -33,7	Yes	****	< 0,0001
	NeuroD-empty vector vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr	-13,7	-23,0 to -4,48	Yes	***	0,0001
	NeuroD-empty vector vs. RESCUE 1 WT + p.Gln313Lys	-13,6	-23,5 to -3,75	Yes	***	0,0006
	NeuroD-empty vector vs. RESCUE 1 WT + p.Ile678Leu	-54,9	-64,8 to -45,0	Yes	****	< 0,0001
	NeuroD-empty vector vs. RESCUE 1 WT + p.Ala1001Thr	-17,6	-27,5 to -7,76	Yes	****	< 0,0001
	NeuroD-h-KIF21B-WT vs. NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys	-10,8	-19,2 to -2,32	Yes	**	0,0022
	NeuroD-h-KIF21B-WT vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu	-39	-46,1 to -32,0	Yes	****	< 0,0001
	NeuroD-h-KIF21B-WT vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr	-10,4	-18,1 to -2,68	Yes	***	0,0009
	NeuroD-h-KIF21B-WT vs. RESCUE 1 WT + p.Gln313Lys	-10,3	-18,7 to -1,83	Yes	**	0,0045
	NeuroD-h-KIF21B-WT vs. RESCUE 1 WT + p.Ile678Leu	-51,5	-60,0 to -43,1	Yes	****	< 0,0001
	NeuroD-h-KIF21B-WT vs. RESCUE 1 WT + p.Ala1001Thr	-14,3	-22,7 to -5,84	Yes	****	< 0,0001
	NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu	-28,3	-37,0 to -19,6	Yes	****	< 0,0001
	NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr	0,396	-8,84 to 9,64	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys vs. RESCUE 1 WT + p.Gln313Lys	0,495	-9,38 to 10,4	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys vs. RESCUE 1 WT + p.Ile678Leu	-40,8	-50,7 to -30,9	Yes	****	< 0,0001
	NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys vs. RESCUE 1 WT + p.Ala1001Thr	-3,52	-13,4 to 6,36	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr	28,7	20,7 to 36,6	Yes	****	< 0,0001
	NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu vs. RESCUE 1 WT + p.Gln313Lys	28,8	20,1 to 37,5	Yes	****	< 0,0001
	NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu vs. RESCUE 1 WT + p.Ile678Leu	-12,5	-21,2 to -3,82	Yes	***	0,0003
	NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu vs. RESCUE 1 WT + p.Ala1001Thr	24,8	16,1 to 33,4	Yes	****	< 0,0001
	NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr vs. RESCUE 1 WT + p.Gln313Lys	0,0986	-9,14 to 9,34	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr vs. RESCUE 1 WT + p.Ile678Leu	-41,2	-50,4 to -31,9	Yes	****	< 0,0001
	NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr vs. RESCUE 1 WT + p.Ala1001Thr	-3,91	-13,2 to 5,32	No	ns	> 0,9999
	RESCUE 1 WT + p.Gln313Lys vs. RESCUE 1 WT + p.Ile678Leu	-41,3	-51,1 to -31,4	Yes	****	< 0,0001
	RESCUE 1 WT + p.Gln313Lys vs. RESCUE 1 WT + p.Ala1001Thr	-4,01	-13,9 to 5,86	No	ns	> 0,9999
	RESCUE 1 WT + p.Ile678Leu vs. RESCUE 1 WT + p.Ala1001Thr	37,3	27,4 to 47,1	Yes	****	< 0,0001
	Lo CP					
	NeuroD-empty vector vs. NeuroD-h-KIF21B-WT	-0,125	-8,57 to 8,32	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-empty vector vs. NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys	-8,14	-18,0 to 1,74	No	ns	0,271
	NeuroD-empty vector vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu	-9,43	-18,1 to -0,743	Yes	*	0,0201
	NeuroD-empty vector vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr	-7,37	-16,6 to 1,87	No	ns	0,3418
	NeuroD-empty vector vs. RESCUE 1 WT + p.Gln313Lys	-4,66	-14,5 to 5,21	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-empty vector vs. RESCUE 1 WT + p.Ile678Leu	-6,52	-16,4 to 3,36	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-empty vector vs. RESCUE 1 WT + p.Ala1001Thr	-8,17	-18,0 to 1,71	No	ns	0,2638
	NeuroD-h-KIF21B-WT vs. NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys	-8,02	-16,5 to 0,427	No	ns	0,0834
	NeuroD-h-KIF21B-WT vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu	-9,3	-16,3 to -2,29	Yes	**	0,0012
	NeuroD-h-KIF21B-WT vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr	-7,25	-14,9 to 0,440	No	ns	0,0891
	NeuroD-h-KIF21B-WT vs. RESCUE 1 WT + p.Gln313Lys	-4,54	-13,0 to 3,90	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-h-KIF21B-WT vs. RESCUE 1 WT + p.Ile678Leu	-6,4	-14,8 to 2,05	No	ns	0,4825
	NeuroD-h-KIF21B-WT vs. RESCUE 1 WT + p.Ala1001Thr	-8,05	-16,5 to 0,397	No	ns	0,0805
	NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu	-1,28	-9,97 to 7,40	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr	0,769	-8,47 to 10,0	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys vs. RESCUE 1 WT + p.Gln313Lys	3,48	-6,40 to 13,4	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys vs. RESCUE 1 WT + p.Ile678Leu	1,62	-8,26 to 11,5	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys vs. RESCUE 1 WT + p.Ala1001Thr	-0,0299	-9,91 to 9,85	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr	2,05	-5,90 to 10,0	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu vs. RESCUE 1 WT + p.Gln313Lys	4,76	-3,92 to 13,4	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu vs. RESCUE 1 WT + p.Ile678Leu	2,9	-5,78 to 11,6	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu vs. RESCUE 1 WT + p.Ala1001Thr	1,25	-7,43 to 9,94	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr vs. RESCUE 1 WT + p.Gln313Lys	2,71	-6,53 to 11,9	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr vs. RESCUE 1 WT + p.Ile678Leu	0,85	-8,39 to 10,1	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr vs. RESCUE 1 WT + p.Ala1001Thr	-0,799	-10,0 to 8,44	No	ns	> 0,9999
	RESCUE 1 WT + p.Gln313Lys vs. RESCUE 1 WT + p.Ile678Leu	-1,86	-11,7 to 8,02	No	ns	> 0,9999
	RESCUE 1 WT + p.Gln313Lys vs. RESCUE 1 WT + p.Ala1001Thr	-3,51	-13,4 to 6,37	No	ns	> 0,9999
	RESCUE 1 WT + p.Ile678Leu vs. RESCUE 1 WT + p.Ala1001Thr	-1,65	-11,5 to 8,23	No	ns	> 0,9999
	Up CP					
	NeuroD-empty vector vs. NeuroD-h-KIF21B-WT	3,48	-4,97 to 11,9	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-empty vector vs. NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys	22,3	12,4 to 32,1	Yes	****	< 0,0001
	NeuroD-empty vector vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu	51,8	43,1 to 60,5	Yes	****	< 0,0001
	NeuroD-empty vector vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr	21,1	11,9 to 30,3	Yes	****	< 0,0001
	NeuroD-empty vector vs. RESCUE 1 WT + p.Gln313Lys	18,3	8,41 to 28,2	Yes	****	< 0,0001
	NeuroD-empty vector vs. RESCUE 1 WT + p.Ile678Leu	61,4	51,5 to 71,3	Yes	****	< 0,0001
	NeuroD-empty vector vs. RESCUE 1 WT + p.Ala1001Thr	25,8	15,9 to 35,7	Yes	****	< 0,0001
	NeuroD-h-KIF21B-WT vs. NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys	18,8	10,3 to 27,2	Yes	****	< 0,0001
	NeuroD-h-KIF21B-WT vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu	48,3	41,3 to 55,4	Yes	****	< 0,0001
	NeuroD-h-KIF21B-WT vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr	17,6	9,93 to 25,3	Yes	****	< 0,0001
	NeuroD-h-KIF21B-WT vs. RESCUE 1 WT + p.Gln313Lys	14,8	6,37 to 23,3	Yes	****	< 0,0001
	NeuroD-h-KIF21B-WT vs. RESCUE 1 WT + p.Ile678Leu	57,9	49,5 to 66,4	Yes	****	< 0,0001

NeuroD-h-KIF21B-WT vs. RESCUE 1 WT + p.Ala1001Thr	22,3	13,9 to 30,8	Yes	****	< 0,0001
NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu	29,6	20,9 to 38,2	Yes	****	< 0,0001
NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr	-1,17	-10,4 to 8,07	No	ns	> 0,9999
NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys vs. RESCUE 1 WT + p.Gln313Lys	-3,97	-13,8 to 5,91	No	ns	> 0,9999
NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys vs. RESCUE 1 WT + p.Ile678Leu	39,2	29,3 to 49,0	Yes	****	< 0,0001
NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys vs. RESCUE 1 WT + p.Ala1001Thr	3,55	-6,33 to 13,4	No	ns	> 0,9999
NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr	-30,7	-38,7 to -22,8	Yes	****	< 0,0001
NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu vs. RESCUE 1 WT + p.Gln313Lys	-33,5	-42,2 to -24,9	Yes	****	< 0,0001
NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu vs. RESCUE 1 WT + p.Ile678Leu	9,6	0,913 to 18,3	Yes	*	0,0162
NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu vs. RESCUE 1 WT + p.Ala1001Thr	-26	-34,7 to -17,3	Yes	****	< 0,0001
NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr vs. RESCUE 1 WT + p.Gln313Lys	-2,81	-12,0 to 6,43	No	ns	> 0,9999
NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr vs. RESCUE 1 WT + p.Ile678Leu	40,3	31,1 to 49,6	Yes	****	< 0,0001
NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr vs. RESCUE 1 WT + p.Ala1001Thr	4,71	-4,53 to 14,0	No	ns	> 0,9999
RESCUE 1 WT + p.Gln313Lys vs. RESCUE 1 WT + p.Ile678Leu	43,1	33,3 to 53,0	Yes	****	< 0,0001
RESCUE 1 WT + p.Gln313Lys vs. RESCUE 1 WT + p.Ala1001Thr	7,52	-2,36 to 17,4	No	ns	0,4673
RESCUE 1 WT + p.Ile678Leu vs. RESCUE 1 WT + p.Ala1001Thr	-35,6	-45,5 to -25,7	Yes	****	< 0,0001

e **Anova table. 2-way ordinary ANOVA**

Number of families	3
Number of comparisons per family	6
Alpha	0,05

Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
svz/iz					
NeuroD-empty vector vs. NeuroD-hKIF21B-WT 1	-4,532	-13,77 to 4,705	No	ns	> 0,9999
NeuroD-empty vector vs. NeuroD-hKIF21B-WT 1,5	-11,55	-20,79 to -2,318	Yes	**	0,0081
NeuroD-empty vector vs. NeuroD-hKIF21B-WT 2	-28,41	-38,29 to -18,54	Yes	****	< 0,0001
NeuroD-hKIF21B-WT 1 vs. NeuroD-hKIF21B-WT 1,5	-7,023	-15,57 to 1,528	No	ns	0,164
NeuroD-hKIF21B-WT 1 vs. NeuroD-hKIF21B-WT 2	-23,88	-33,12 to -14,65	Yes	****	< 0,0001
NeuroD-hKIF21B-WT 1,5 vs. NeuroD-hKIF21B-WT 2	-16,86	-26,10 to -7,623	Yes	****	< 0,0001
LoCP					
NeuroD-empty vector vs. NeuroD-hKIF21B-WT 1	-2,103	-11,34 to 7,134	No	ns	> 0,9999
NeuroD-empty vector vs. NeuroD-hKIF21B-WT 1,5	-4,419	-13,66 to 4,817	No	ns	> 0,9999
NeuroD-empty vector vs. NeuroD-hKIF21B-WT 2	-3,441	-13,31 to 6,434	No	ns	> 0,9999
NeuroD-hKIF21B-WT 1 vs. NeuroD-hKIF21B-WT 1,5	-2,317	-10,87 to 6,234	No	ns	> 0,9999
NeuroD-hKIF21B-WT 1 vs. NeuroD-hKIF21B-WT 2	-1,338	-10,57 to 7,899	No	ns	> 0,9999
NeuroD-hKIF21B-WT 1,5 vs. NeuroD-hKIF21B-WT 2	0,9789	-8,258 to 10,22	No	ns	> 0,9999
up CP					
NeuroD-empty vector vs. NeuroD-hKIF21B-WT 1	6,634	-2,602 to 15,87	No	ns	0,3085
NeuroD-empty vector vs. NeuroD-hKIF21B-WT 1,5	15,97	6,738 to 25,21	Yes	***	0,0002
NeuroD-empty vector vs. NeuroD-hKIF21B-WT 2	31,85	21,98 to 41,73	Yes	****	< 0,0001
NeuroD-hKIF21B-WT 1 vs. NeuroD-hKIF21B-WT 1,5	9,34	0,7886 to 17,89	Yes	*	0,0261
NeuroD-hKIF21B-WT 1 vs. NeuroD-hKIF21B-WT 2	25,22	15,98 to 34,46	Yes	****	< 0,0001
NeuroD-hKIF21B-WT 1,5 vs. NeuroD-hKIF21B-WT 2	15,88	6,644 to 25,12	Yes	***	0,0002

g **Anova table. 2-way ordinary ANOVA**

Number of families	1
Number of comparisons per family	3
Alpha	0,05

Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
neuroD-empty vector vs. NeuroD-mKIF21B delta rCC					
SVZ/IZ	-39,01	-64,39 to -13,64	Yes	**	0,0022
loCP	2,024	-23,35 to 27,40	No	ns	> 0,9999
UpCP	36,99	11,61 to 62,36	Yes	**	0,0035

i **Anova table. 2-way ordinary ANOVA**

Number of families	3
Number of comparisons per family	6
Alpha	0,05

Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
svz IZ					
neuroD-empty vector vs. neuroD-hKIF21B p.Ile678Leu	-45,1	-56,33 to -33,88	Yes	****	< 0,0001
neuroD-empty vector vs. NeuroD hKIF21B p.Ile678Leu delta ATP	-10,51	-20,76 to -0,2591	Yes	*	0,0415
neuroD-empty vector vs. Nd-hKIF21B WT	-5,658	-16,46 to 5,144	No	ns	0,9461
neuroD-hKIF21B I678L vs. NeuroD hKIF21B p.Ile678Leu delta ATP	34,6	25,06 to 44,14	Yes	****	< 0,0001
neuroD-hKIF21B I678L vs. Nd-hKIF21B WT	39,45	29,31 to 49,58	Yes	****	< 0,0001
NeuroD hKIF21B I678Ldelta ATP vs. Nd-hKIF21B WT	4,849	-4,189 to 13,89	No	ns	0,8879
lo cp					
neuroD-empty vector vs. neuroD-hKIF21B p.Ile678Leu	-11,58	-22,80 to -0,3496	Yes	*	0,0397
neuroD-empty vector vs. NeuroD hKIF21B p.Ile678Leu delta ATP	-7,51	-17,76 to 2,738	No	ns	0,2995
neuroD-empty vector vs. Nd-hKIF21B WT	0,7756	-10,03 to 11,58	No	ns	> 0,9999
neuroD-hKIF21B I678L vs. NeuroD hKIF21B p.Ile678Leu delta ATP	4,066	-5,475 to 13,61	No	ns	> 0,9999
neuroD-hKIF21B I678L vs. Nd-hKIF21B WT	12,35	2,218 to 22,48	Yes	**	0,0091
NeuroD hKIF21B I678Ldelta ATP vs. Nd-hKIF21B WT	8,286	-0,7521 to 17,32	No	ns	0,0905
up CP					
neuroD-empty vector vs. neuroD-hKIF21B p.Ile678Leu	56,68	45,45 to 67,91	Yes	****	< 0,0001
neuroD-empty vector vs. NeuroD hKIF21B p.Ile678Leu delta ATP	18,02	7,769 to 28,27	Yes	****	< 0,0001
neuroD-empty vector vs. Nd-hKIF21B WT	4,882	-5,920 to 15,68	No	ns	> 0,9999
neuroD-hKIF21B I678L vs. NeuroD hKIF21B p.Ile678Leu delta ATP	-38,66	-48,20 to -29,12	Yes	****	< 0,0001
neuroD-hKIF21B I678L vs. Nd-hKIF21B WT	-51,8	-61,93 to -41,66	Yes	****	< 0,0001
NeuroD hKIF21B I678Ldelta ATP vs. Nd-hKIF21B WT	-13,13	-22,17 to -4,097	Yes	**	0,0012

Panel **Figure 4**

b	**Student Unpaired Two Sample t-test**	Significant? (P<0.05)	P value summary	P Value	t, df	F test (to compare two variances)
	contol vs. WT vector	Yes	***	2.473e-05	t = 4.5223, df = 69	0.09161
	Welch unpaired Two Sample t-test					
	contol vs. p.Gln313Lys vector	Yes	***	1.185e-09	t = 7.5387, df = 47.438	4.451e-08
	control vs. p.Ala1001Thr vector	Yes	*	0.01695	t = 2.4881, df = 41.482	6.194e-05
	WT vs .p.Gln313Lys vector	Yes	***	4.843e-05	t = 4.3935, df = 57.636	0.0003816
	WT vs. p.Ala1001Thr vector	No	ns	0.5313	t = -0.63023, df = 52.171	0.02849
	Student Unpaired Two Sample t-test					
	p.Gln313Lys vector vs. p.Ala1001Thr vector	Yes	***	7.481e-05	t = -4.2212, df = 67	0.1632

Panel **Figure 5**

c	**Anova table. One-way ordinary ANOVA**					
	Number of families	1				
	Number of comparisons per family	10				
	Alpha	0,05				
	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
	neuroD-empty vector vs. neuroD-hKIF21B WT	6,516	-22,73 to 35,76	No	ns	> 0,9999
	neuroD-empty vector vs. neuroD-hKIF21B p.Ile678Leu	8,531	-21,71 to 38,78	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-empty vector vs. NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys	12,69	-17,56 to 42,93	No	ns	> 0,9999
	neuroD-empty vector vs. neuroD-hKIF21B p.Ile678Leu deltaATP	7,696	-25,81 to 41,20	No	ns	> 0,9999
	neuroD-hKIF21B WT vs. neuroD-hKIF21B p.Ile678Leu	2,016	-25,77 to 29,80	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B WT vs. NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys	6,173	-21,62 to 33,96	No	ns	> 0,9999
	neuroD-hKIF21B WT vs. neuroD-hKIF21B p.Ile678Leu deltaATP	1,18	-30,13 to 32,49	No	ns	> 0,9999
	neuroD-hKIF21B p.Ile678Leu vs. NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys	4,157	-24,68 to 32,99	No	ns	> 0,9999
	neuroD-hKIF21B p.Ile678Leu vs. neuroD-hKIF21B p.Ile678Leu deltaATP	-0,8351	-33,08 to 31,41	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys vs. neuroD-hKIF21B p.Ile678Leu deltaATP	-4,992	-37,23 to 27,25	No	ns	> 0,9999
d and e	**Anova table. One-way ordinary ANOVA**					
	Number of families	1				
	Number of comparisons per family	6				
	Alpha	0,05				
	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
	empty vector vs. hKIF21B-WT	-0,8842	-40,91 to 39,14	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Ile678Leu	49,67	14,74 to 84,61	Yes	**	0,0021
	empty vector vs. p.Gln313Lys	19,01	-17,13 to 55,14	No	ns	0,893
	empty vector vs. RESCUE p.Ile678Leu + WT 1	60,13	24,00 to 96,26	Yes	***	0,0003
	empty vector vs. p.Ile678Leu deltaATP	-1,446	-39,18 to 36,29	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. mKIF21B-delta rCC	40,83	4,698 to 76,96	Yes	*	0,0197
d and e	**Anova table. One-way ordinary ANOVA**					
	Number of families	1				
	Number of comparisons per family	6				
	Alpha	0,05				
	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
	p.Ile678Leu vs. empty vector	-49,67	-84,61 to -14,74	Yes	**	0,0021
	p.Ile678Leu vs. hKIF21B-WT	-50,56	-87,96 to -13,16	Yes	**	0,0037
	p.Ile678Leu vs. p.Gln313Lys	-30,67	-63,86 to 2,529	No	ns	0,0843
	p.Ile678Leu vs. RESCUE p.Ile678Leu + WT 1	10,46	-22,74 to 43,65	No	ns	> 0,9999
	p.Ile678Leu vs. p.Ile678Leu deltaATP	-51,12	-86,06 to -16,18	Yes	**	0,0015
	p.Ile678Leu vs. mKIF21B-delta rCC	-8,844	-42,04 to 24,35	No	ns	> 0,9999
g	**Anova table. One-way ordinary ANOVA**					
	Number of families	1				
	Number of comparisons per family	4				
	Alpha	0,05				
	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	
	HA-empty vector vs. HA-hKIF21B-WT	3,262	-14,95 to 21,47	No	ns	
	HA-empty vector vs. HA-hKIF21B- p.Gln313Lys	10,84	-7,023 to 28,70	No	ns	
	HA-empty vector vs. HA-hKIF21B-p.Ile678Leu	35,33	18,68 to 51,97	Yes	****	
	HA-empty vector vs. HA-hKIF21B-p.Ala1001Thr	3,679	-13,23 to 20,59	No	ns	
g	**Anova table. One-way ordinary ANOVA**					
	Number of families	1				
	Number of comparisons per family	6				
	Alpha	0,05				
	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	
	HA-empty vector vs. HA-hKIF21B-WT 2	20,28	4,468 to 36,08	Yes	**	
	HA-empty vector vs. HA-hKIF21B-p.Ile678Leu	28,81	13,28 to 44,34	Yes	****	
	HA-empty vector vs. RESCUE HA-hKIF21B-p.Ile678Leu + WT	30,39	15,18 to 45,60	Yes	****	
	HA-hKIF21B WT 2 vs. HA-hKIF21B-p.Ile678Leu	8,536	-7,243 to 24,32	No	ns	
	HA-hKIF21B WT 2 vs. RESCUE p.Ile678Leu + WT	10,11	-5,349 to 25,58	No	ns	
	HA-hKIF21B p.Ile678Leu vs. RESCUE p.Ile678Leu + WT	1,578	-13,60 to 16,76	No	ns	
Panel	**Figure 6**					
c and d	**Anova table. One-way ordinary ANOVA**					
	Number of families	1				
	Number of comparisons per family	9				
	Alpha	0,05				
	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
	empty vector vs. WT	4,849	-20,31 to 30,01	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Gln313Lys	-8,019	-35,19 to 19,15	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Ile678Leu	31,76	9,380 to 54,15	Yes	**	0,0012
	empty vector vs. p.Ile678Leu + WT 1	0,7282	-26,44 to 27,90	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Ile678Leu + deltaATP	24,66	0,1655 to 49,15	Yes	*	0,0474
	empty vector vs. p.Ile678Leu+T96N	23,68	-0,8137 to 48,17	No	ns	0,065
	empty vector vs. p.Ile678Leu + WT 0,25	12,84	-12,32 to 38,00	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Ile678LeudeltaATP	36,45	9,275 to 63,62	Yes	**	0,0025
	empty vector vs. delta rCC	7,76	-18,26 to 33,78	No	ns	> 0,9999
c and d	**Anova table. One-way ordinary ANOVA**					
	Number of families	1				
	Number of comparisons per family	9				
	Alpha	0,05				
	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
	p.Ile678Leu vs. empty vector	-31,76	-54,15 to -9,380	Yes	**	0,0012
	p.Ile678Leu vs. WT	-26,91	-46,80 to -7,026	Yes	**	0,0023
	p.Ile678Leu vs. p.Gln313Lys	-39,78	-62,17 to -17,40	Yes	****	< 0,0001
	p.Ile678Leu vs. p.Ile678Leu + WT 1	-31,04	-53,42 to -8,652	Yes	**	0,0016
	p.Ile678Leu vs. p.Ile678Leu + deltaATP	-7,105	-26,15 to 11,94	No	ns	> 0,9999
	p.Ile678Leu vs. p.Ile678Leu+T96N	-8,084	-27,13 to 10,96	No	ns	> 0,9999
	p.Ile678Leu vs. p.Ile678Leu + WT 0,25	-18,92	-38,81 to 0,9651	No	ns	0,0733
	p.Ile678Leu vs. p.Ile678LeudeltaATP	4,685	-17,70 to 27,07	No	ns	> 0,9999
	p.Ile678Leu vs. delta rCC	-24	-44,97 to -3,039	Yes	*	0,0149

e **Anova table. 2-way ordinary ANOVA**

Number of families	3
Number of comparisons per family	4
Alpha	0,05

Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
WM					
scarlett + ND-p.Ile678Leu vs. scarlett + NeuroD-EMPTY	34,5	27,0 to 42,1	Yes	****	< 0,0001
scarlett + ND-p.Ile678Leu vs. scarlett + ND-p.Ile678Leu + ND-WT 1 µg/µl	-1,87	-9,91 to 6,18	No	ns	> 0,9999
scarlett + ND-p.Ile678Leu vs. scarlett + p.Ile678Leu-delta ATP	32,4	23,6 to 41,3	Yes	****	< 0,0001
scarlett + ND-p.Ile678Leu vs. scarlett + mKIF21B delta rCC	12,6	4,59 to 20,7	Yes	***	0,0007
Lower CP					
scarlett + ND-p.Ile678Leu vs. scarlett + NeuroD-EMPTY	6,36	-1,19 to 13,9	No	ns	0,1353
scarlett + ND-p.Ile678Leu vs. scarlett + ND-p.Ile678Leu + ND-WT 1 µg/µl	-0,336	-8,38 to 7,71	No	ns	> 0,9999
scarlett + ND-p.Ile678Leu vs. scarlett + p.Ile678Leu-delta ATP	5	-3,81 to 13,8	No	ns	0,591
scarlett + ND-p.Ile678Leu vs. scarlett + mKIF21B delta rCC	-0,643	-8,69 to 7,40	No	ns	> 0,9999
Upper CP					
scarlett + ND-p.Ile678Leu vs. scarlett + NeuroD-EMPTY	-40,9	-48,5 to -33,4	Yes	****	< 0,0001
scarlett + ND-p.Ile678Leu vs. scarlett + ND-p.Ile678Leu + ND-WT 1 µg/µl	2,2	-5,84 to 10,2	No	ns	> 0,9999
scarlett + ND-p.Ile678Leu vs. scarlett + p.Ile678Leu-delta ATP	-37,4	-46,3 to -28,6	Yes	****	< 0,0001
scarlett + ND-p.Ile678Leu vs. scarlett + mKIF21B delta rCC	-12	-20,0 to -3,95	Yes	**	0,0013
WM					
scarlett + NeuroD-EMPTY vs. scarlett + ND-p.Ile678Leu	-34,5	-42,1 to -27,0	Yes	****	< 0,0001
scarlett + NeuroD-EMPTY vs. scarlett + ND-p.Ile678Leu + ND-WT 1 µg/µl	-36,4	-44,8 to -28,1	Yes	****	< 0,0001
scarlett + NeuroD-EMPTY vs. scarlett + p.Ile678Leu-delta ATP	-2,11	-11,2 to 6,99	No	ns	> 0,9999
scarlett + NeuroD-EMPTY vs. scarlett + mKIF21B delta rCC	-21,9	-30,3 to -13,6	Yes	****	< 0,0001
Lower CP					
scarlett + NeuroD-EMPTY vs. scarlett + ND-p.Ile678Leu	-6,36	-13,9 to 1,19	No	ns	0,1353
scarlett + NeuroD-EMPTY vs. scarlett + ND-p.Ile678Leu + ND-WT 1 µg/µl	-6,69	-15,1 to 1,67	No	ns	0,1731
scarlett + NeuroD-EMPTY vs. scarlett + p.Ile678Leu-delta ATP	-1,35	-10,5 to 7,75	No	ns	> 0,9999
scarlett + NeuroD-EMPTY vs. scarlett + mKIF21B delta rCC	-7	-15,4 to 1,36	No	ns	0,1395
Upper CP					
scarlett + NeuroD-EMPTY vs. scarlett + ND-p.Ile678Leu	40,9	33,4 to 48,5	Yes	****	< 0,0001
scarlett + NeuroD-EMPTY vs. scarlett + ND-p.Ile678Leu + ND-WT 1 µg/µl	43,1	34,7 to 51,5	Yes	****	< 0,0001
scarlett + NeuroD-EMPTY vs. scarlett + p.Ile678Leu-delta ATP	3,46	-5,64 to 12,6	No	ns	> 0,9999
scarlett + NeuroD-EMPTY vs. scarlett + mKIF21B delta rCC	28,9	20,6 to 37,3	Yes	****	< 0,0001

g **Anova table. 2-way ordinary ANOVA**

Within each row, compare columns (simple effects within rows)

Number of families	20
Number of comparisons per family	4
Alpha	0,05

Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
0-5					
empty vector vs. WT 1 µg/µl	0,1036	-4,902 to 5,109	No	ns	> 0,9999
empty vector vs. p.Ile678Leu	-6,96	-11,97 to -1,955	Yes	**	0,0022
empty vector vs. p.Gln313Lys	0,8114	-4,595 to 6,218	No	ns	> 0,9999
empty vector vs. p.Ala1001Thr	-1,968	-8,098 to 4,163	No	ns	> 0,9999
5-10					
empty vector vs. WT 1 µg/µl	-0,1245	-5,130 to 4,881	No	ns	> 0,9999
empty vector vs. p.Ile678Leu	-8,84	-13,85 to -3,835	Yes	****	< 0,0001
empty vector vs. p.Gln313Lys	2,71	-2,697 to 8,116	No	ns	0,8337
empty vector vs. p.Ala1001Thr	2,612	-3,519 to 8,742	No	ns	> 0,9999
10-15					
empty vector vs. WT 1 µg/µl	-6,026	-11,03 to -1,020	Yes	*	0,0109
empty vector vs. p.Ile678Leu	-7,738	-12,74 to -2,733	Yes	***	0,0005
empty vector vs. p.Gln313Lys	-0,2086	-5,615 to 5,198	No	ns	> 0,9999
empty vector vs. p.Ala1001Thr	1,889	-4,241 to 8,020	No	ns	> 0,9999
15-20					
empty vector vs. WT 1 µg/µl	-1,943	-6,948 to 3,063	No	ns	> 0,9999
empty vector vs. p.Ile678Leu	0,5308	-4,475 to 5,536	No	ns	> 0,9999
empty vector vs. p.Gln313Lys	-0,3389	-5,745 to 5,068	No	ns	> 0,9999
empty vector vs. p.Ala1001Thr	-1,04	-7,170 to 5,091	No	ns	> 0,9999
20-25					
empty vector vs. WT 1 µg/µl	-0,6706	-5,676 to 4,335	No	ns	> 0,9999
empty vector vs. p.Ile678Leu	-1,641	-6,646 to 3,365	No	ns	> 0,9999
empty vector vs. p.Gln313Lys	-0,8548	-6,261 to 4,552	No	ns	> 0,9999
empty vector vs. p.Ala1001Thr	2,195	-3,935 to 8,326	No	ns	> 0,9999
25-30					
empty vector vs. WT 1 µg/µl	1,523	-3,482 to 6,529	No	ns	> 0,9999
empty vector vs. p.Ile678Leu	1,001	-4,004 to 6,007	No	ns	> 0,9999
empty vector vs. p.Gln313Lys	-2,511	-7,918 to 2,895	No	ns	0,9743
empty vector vs. p.Ala1001Thr	1,956	-4,175 to 8,086	No	ns	> 0,9999
30-40					
empty vector vs. WT 1 µg/µl	6,52	1,514 to 11,53	Yes	**	0,0048
empty vector vs. p.Ile678Leu	4,626	-0,3799 to 9,631	No	ns	0,0835
empty vector vs. p.Gln313Lys	0,007327	-5,399 to 5,414	No	ns	> 0,9999
empty vector vs. p.Ala1001Thr	4,636	-1,495 to 10,77	No	ns	0,2329
40-50					
empty vector vs. WT 1 µg/µl	0,3276	-4,678 to 5,333	No	ns	> 0,9999
empty vector vs. p.Ile678Leu	3,049	-1,957 to 8,054	No	ns	0,5066
empty vector vs. p.Gln313Lys	1,76	-3,647 to 7,166	No	ns	> 0,9999
empty vector vs. p.Ala1001Thr	-0,8534	-6,984 to 5,277	No	ns	> 0,9999
50-60					
empty vector vs. WT 1 µg/µl	-0,7526	-5,758 to 4,253	No	ns	> 0,9999
empty vector vs. p.Ile678Leu	-2,065	-7,070 to 2,941	No	ns	> 0,9999
empty vector vs. p.Gln313Lys	-1,216	-6,623 to 4,190	No	ns	> 0,9999
empty vector vs. p.Ala1001Thr	1,503	-4,627 to 7,633	No	ns	> 0,9999

	60-70					
	empty vector vs. WT 1 µg/µl	0,1863	-4,819 to 5,192	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Ile678Leu	1,223	-3,783 to 6,228	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Gln313Lys	-1,512	-6,919 to 3,894	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Ala1001Thr	-3,042	-9,172 to 3,088	No	ns	0,8518
	70-80					
	empty vector vs. WT 1 µg/µl	-3,545	-8,551 to 1,460	No	ns	0,3036
	empty vector vs. p.Ile678Leu	-0,8282	-5,834 to 4,177	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Gln313Lys	-0,964	-6,371 to 4,442	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Ala1001Thr	-1,203	-7,334 to 4,927	No	ns	> 0,9999
	80-100					
	empty vector vs. WT 1 µg/µl	5,906	0,9004 to 10,91	Yes	*	0,0131
	empty vector vs. p.Ile678Leu	6,007	1,001 to 11,01	Yes	*	0,0112
	empty vector vs. p.Gln313Lys	1,34	-4,067 to 6,746	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Ala1001Thr	0,5071	-5,623 to 6,637	No	ns	> 0,9999
	100-150					
	empty vector vs. WT 1 µg/µl	2,823	-2,182 to 7,829	No	ns	0,6282
	empty vector vs. p.Ile678Leu	3,754	-1,252 to 8,759	No	ns	0,2413
	empty vector vs. p.Gln313Lys	-3,181	-8,588 to 2,225	No	ns	0,5598
	empty vector vs. p.Ala1001Thr	-6,122	-12,25 to 0,007956	No	ns	0,0505
	150-200					
	empty vector vs. WT 1 µg/µl	-1,521	-6,526 to 3,485	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Ile678Leu	1,946	-3,060 to 6,951	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Gln313Lys	0,5196	-4,887 to 5,926	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Ala1001Thr	-1,001	-7,131 to 5,129	No	ns	> 0,9999
	200-250					
	empty vector vs. WT 1 µg/µl	0,09548	-4,910 to 5,101	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Ile678Leu	1,482	-3,523 to 6,488	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Gln313Lys	1,046	-4,360 to 6,453	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Ala1001Thr	0,4668	-5,664 to 6,597	No	ns	> 0,9999
	250-300					
	empty vector vs. WT 1 µg/µl	0,1587	-4,847 to 5,164	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Ile678Leu	1,011	-3,995 to 6,016	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Gln313Lys	1,105	-4,302 to 6,511	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Ala1001Thr	0,1415	-5,989 to 6,272	No	ns	> 0,9999
	300-350					
	empty vector vs. WT 1 µg/µl	-1,681	-6,686 to 3,325	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Ile678Leu	0,3068	-4,699 to 5,312	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Gln313Lys	-0,5436	-5,950 to 4,863	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Ala1001Thr	-1,79	-7,920 to 4,341	No	ns	> 0,9999
	350-400					
	empty vector vs. WT 1 µg/µl	1,006	-4,000 to 6,011	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Ile678Leu	0,9696	-4,036 to 5,975	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Gln313Lys	0,9337	-4,473 to 6,340	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Ala1001Thr	1,282	-4,848 to 7,413	No	ns	> 0,9999
	400-450					
	empty vector vs. WT 1 µg/µl	-0,949	-5,954 to 4,056	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Ile678Leu	0	-5,005 to 5,005	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Gln313Lys	-0,6803	-6,087 to 4,726	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Ala1001Thr	-1,02	-7,151 to 5,110	No	ns	> 0,9999
	>450					
	empty vector vs. WT 1 µg/µl	-1,438	-6,443 to 3,568	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Ile678Leu	2,169	-2,837 to 7,174	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Gln313Lys	1,779	-3,627 to 7,186	No	ns	> 0,9999
	empty vector vs. p.Ala1001Thr	0,8512	-5,279 to 6,982	No	ns	> 0,9999

Panel	**Supplementary Figure 3**					
b	**Anova table. 2-way ordinary ANOVA**					
	Number of families	6				
	Number of comparisons per family	6				
	Alpha	0,05				
	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
	DMSO					
	NeuroD-hKIF21B WT vs. ND-hKIF21B P.Gln313Lys	0,0000164	-137,4 to 137,4	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B WT vs. ND-hKIF21B p.Ile678Leu	0,00001841	-137,4 to 137,4	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B WT vs. ND-hKIF21B p.Ala1001Thr	0,00003042	-158,6 to 158,6	No	ns	> 0,9999
	ND-hKIF21B P.Gln313Lys vs. ND-hKIF21B p.Ile678Leu	0,000002003	-137,4 to 137,4	No	ns	> 0,9999
	ND-hKIF21B P.Gln313Lys vs. ND-hKIF21B p.Ala1001Thr	0,00001402	-158,6 to 158,6	No	ns	> 0,9999
	ND-hKIF21B p.Ile678Leu vs. ND-hKIF21B p.Ala1001Thr	0,00001202	-158,6 to 158,6	No	ns	> 0,9999
	1h					
	NeuroD-hKIF21B WT vs. ND-hKIF21B P.Gln313Lys	36,53	-100,9 to 173,9	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B WT vs. ND-hKIF21B p.Ile678Leu	-1,953	-139,3 to 135,4	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B WT vs. ND-hKIF21B p.Ala1001Thr	22,83	-135,8 to 181,5	No	ns	> 0,9999
	ND-hKIF21B P.Gln313Lys vs. ND-hKIF21B p.Ile678Leu	-38,48	-175,9 to 98,90	No	ns	> 0,9999
	ND-hKIF21B P.Gln313Lys vs. ND-hKIF21B p.Ala1001Thr	-13,7	-172,3 to 144,9	No	ns	> 0,9999
	ND-hKIF21B p.Ile678Leu vs. ND-hKIF21B p.Ala1001Thr	24,78	-133,9 to 183,4	No	ns	> 0,9999
	3h					
	NeuroD-hKIF21B WT vs. ND-hKIF21B P.Gln313Lys	-6,07	-143,5 to 131,3	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B WT vs. ND-hKIF21B p.Ile678Leu	35,62	-101,8 to 173,0	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B WT vs. ND-hKIF21B p.Ala1001Thr	-2,419	-161,1 to 156,2	No	ns	> 0,9999
	ND-hKIF21B P.Gln313Lys vs. ND-hKIF21B p.Ile678Leu	41,69	-95,70 to 179,1	No	ns	> 0,9999
	ND-hKIF21B P.Gln313Lys vs. ND-hKIF21B p.Ala1001Thr	3,651	-155,0 to 162,3	No	ns	> 0,9999
	ND-hKIF21B p.Ile678Leu vs. ND-hKIF21B p.Ala1001Thr	-38,04	-196,7 to 120,6	No	ns	> 0,9999
	6h					
	NeuroD-hKIF21B WT vs. ND-hKIF21B P.Gln313Lys	-1,809	-139,2 to 135,6	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B WT vs. ND-hKIF21B p.Ile678Leu	15,91	-142,7 to 174,6	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B WT vs. ND-hKIF21B p.Ala1001Thr	2,36	-156,3 to 161,0	No	ns	> 0,9999
	ND-hKIF21B P.Gln313Lys vs. ND-hKIF21B p.Ile678Leu	17,72	-140,9 to 176,4	No	ns	> 0,9999
	ND-hKIF21B P.Gln313Lys vs. ND-hKIF21B p.Ala1001Thr	4,169	-154,5 to 162,8	No	ns	> 0,9999
	ND-hKIF21B p.Ile678Leu vs. ND-hKIF21B p.Ala1001Thr	-13,55	-190,9 to 163,8	No	ns	> 0,9999
	8h					

	NeuroD-hKIF21B WT vs. ND-hKIF21B P.Gln313Lys	-24,16	-161,5 to 113,2	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B WT vs. ND-hKIF21B p.Ile678Leu	-6,233	-152,0 to 139,5	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B WT vs. ND-hKIF21B p.Ala1001Thr	4,369	-154,3 to 163,0	No	ns	> 0,9999
	ND-hKIF21B P.Gln313Lys vs. ND-hKIF21B p.Ile678Leu	17,93	-127,8 to 163,7	No	ns	> 0,9999
	ND-hKIF21B P.Gln313Lys vs. ND-hKIF21B p.Ala1001Thr	28,53	-130,1 to 187,2	No	ns	> 0,9999
	ND-hKIF21B p.Ile678Leu vs. ND-hKIF21B p.Ala1001Thr	10,6	-155,3 to 176,5	No	ns	> 0,9999
	10h					
	NeuroD-hKIF21B WT vs. ND-hKIF21B P.Gln313Lys	8,655	-168,7 to 186,0	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B WT vs. ND-hKIF21B p.Ile678Leu	-7,39	-184,8 to 170,0	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B WT vs. ND-hKIF21B p.Ala1001Thr	7,24	-170,1 to 184,6	No	ns	> 0,9999
	ND-hKIF21B P.Gln313Lys vs. ND-hKIF21B p.Ile678Leu	-16,05	-193,4 to 161,3	No	ns	> 0,9999
	ND-hKIF21B P.Gln313Lys vs. ND-hKIF21B p.Ala1001Thr	-1,415	-178,8 to 176,0	No	ns	> 0,9999
	ND-hKIF21B p.Ile678Leu vs. ND-hKIF21B p.Ala1001Thr	14,63	-162,7 to 192,0	No	ns	> 0,9999

e

Column B	KIF21B-shRNA#1
vs.	vs,
Column A	sh-scramble
Unpaired t test	
P value	0,0041
P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=4,50 df=6
Column A	sh-scramble
vs.	vs,
Column B	KIF21B-shRNA#2
Unpaired t test	
P value	0,014
P value summary	*
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=4,17 df=4

g

Anova table. 2-way ordinary ANOVA					
Number of families	3				
Number of comparisons per family	6				
Alpha	0,05				
Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
SVZ IZ					
sh-scramble vs. sh-RNA#1	-5,92	-15,4 to 3,53	No	ns	0,5655
sh-scramble vs. sh-RNA#2	-12,8	-22,0 to -3,60	Yes	**	0,0019
sh-scramble vs. RESCUE WT + sh-RNA#2	-4,94	-14,7 to 4,82	No	ns	> 0,9999
sh-RNA#1 vs. sh-RNA#2	-6,89	-15,8 to 1,98	No	ns	0,2333
sh-RNA#1 vs. RECUE WT + sh-RNA#2	0,974	-8,47 to 10,4	No	ns	> 0,9999
sh-RNA#2 vs. RECUE WT + sh-RNA#2	7,86	-1,34 to 17,1	No	ns	0,1403
LO CP					
sh-scramble vs. sh-RNA#1	-7,58	-17,0 to 1,86	No	ns	0,1971
sh-scramble vs. sh-RNA#2	-8,25	-17,5 to 0,950	No	ns	0,1051
sh-scramble vs. RESCUE WT + sh-RNA#2	3,04	-6,72 to 12,8	No	ns	> 0,9999
sh-RNA#1 vs. sh-RNA#2	-0,665	-9,54 to 8,21	No	ns	> 0,9999
sh-RNA#1 vs. RECUE WT + sh-RNA#2	10,6	1,18 to 20,1	Yes	*	0,019
sh-RNA#2 vs. RECUE WT + sh-RNA#2	11,3	2,09 to 20,5	Yes	**	0,0081
UP CP					
sh-scramble vs. sh-RNA#1	13,5	4,05 to 22,9	Yes	**	0,0013
sh-scramble vs. sh-RNA#2	21,1	11,9 to 30,3	Yes	****	< 0,0001
sh-scramble vs. RESCUE WT + sh-RNA#2	1,9	-7,86 to 11,7	No	ns	> 0,9999
sh-RNA#1 vs. sh-RNA#2	7,55	-1,32 to 16,4	No	ns	0,1432
sh-RNA#1 vs. RECUE WT + sh-RNA#2	-11,6	-21,0 to -2,15	Yes	**	0,0081
sh-RNA#2 vs. RECUE WT + sh-RNA#2	-19,2	-28,4 to -9,95	Yes	****	< 0,0001

i

Anova table. 2-way ordinary ANOVA					
Number of families	3				
Number of comparisons per family	10				
Alpha	0,05				
Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
WM					
NeuroD-empty vector vs. NeuroD-h-KIF21B-WT	3,65	-5,30 to 12,6	No	ns	> 0,9999
NeuroD-empty vector vs. NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys	2,26	-6,02 to 10,5	No	ns	> 0,9999
NeuroD-empty vector vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu	-32,7	-41,0 to -24,5	Yes	****	< 0,0001
NeuroD-empty vector vs. NeuroD-hKIF21B-p.Alp.Ala1001Thr	3,65	-5,30 to 12,6	No	ns	> 0,9999
NeuroD-h-KIF21B-WT vs. NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys	-1,39	-8,95 to 6,17	No	ns	> 0,9999
NeuroD-h-KIF21B-WT vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu	-36,4	-44,0 to -28,8	Yes	****	< 0,0001
NeuroD-h-KIF21B-WT vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr	0,000349	-8,29 to 8,29	No	ns	> 0,9999
NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu	-35	-41,8 to -28,2	Yes	****	< 0,0001
NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr	1,39	-6,17 to 8,95	No	ns	> 0,9999
NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr	36,4	28,8 to 44,0	Yes	****	< 0,0001
LO CP					
NeuroD-empty vector vs. NeuroD-h-KIF21B-WT	0,214	-8,74 to 9,16	No	ns	> 0,9999
NeuroD-empty vector vs. NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys	-0,5	-8,79 to 7,79	No	ns	> 0,9999
NeuroD-empty vector vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu	-10,5	-18,8 to -2,23	Yes	**	0,0048
NeuroD-empty vector vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr	-0,976	-9,93 to 7,97	No	ns	> 0,9999
NeuroD-h-KIF21B-WT vs. NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys	-0,714	-8,28 to 6,85	No	ns	> 0,9999
NeuroD-h-KIF21B-WT vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu	-10,7	-18,3 to -3,17	Yes	**	0,0012
NeuroD-h-KIF21B-WT vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr	-1,19	-9,48 to 7,10	No	ns	> 0,9999
NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu	-10	-16,8 to -3,26	Yes	***	0,0006
NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr	-0,476	-8,04 to 7,09	No	ns	> 0,9999
NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr	9,54	1,98 to 17,1	Yes	**	0,0052
UP CP					
NeuroD-empty vector vs. NeuroD-h-KIF21B-WT	-3,87	-12,8 to 5,08	No	ns	> 0,9999
NeuroD-empty vector vs. NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys	-1,76	-10,1 to 6,52	No	ns	> 0,9999
NeuroD-empty vector vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu	43,3	35,0 to 51,6	Yes	****	< 0,0001
NeuroD-empty vector vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr	-2,68	-11,6 to 6,27	No	ns	> 0,9999
NeuroD-h-KIF21B-WT vs. NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys	2,1	-5,46 to 9,67	No	ns	> 0,9999
NeuroD-h-KIF21B-WT vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu	47,1	39,6 to 54,7	Yes	****	< 0,0001
NeuroD-h-KIF21B-WT vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr	1,19	-7,10 to 9,48	No	ns	> 0,9999

	NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu	45	38,3 to 51,8	Yes	****	< 0,0001
	NeuroD-hKIF21B-p.Gln313Lys vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr	-0,914	-8,48 to 6,65	No	ns	> 0,9999
	NeuroD-hKIF21B-p.Ile678Leu vs. NeuroD-hKIF21B-p.Ala1001Thr	-45,9	-53,5 to -38,4	Yes	****	< 0,0001

Panel	Supplementary Figure 4					
a	**Anova table. One-way ordinary ANOVA**					
	Number of families	1				
	Number of comparisons per family	6				
	Alpha	0,05				
	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
	1dpf vs. 2dpf	0,0733	-0,702 to 0,849	No	ns	> 0,9999
	1dpf vs. 4dpf	-0,613	-4,84 to 3,61	No	ns	> 0,9999
	1dpf vs. 5dpf	-5,47	-12,4 to 1,43	No	ns	0,079
	2dpf vs. 4dpf	-0,687	-4,37 to 3,00	No	ns	> 0,9999
	2dpf vs. 5dpf	-5,54	-13,0 to 1,94	No	ns	0,0902
	4dpf vs. 5dpf	-4,85	-16,0 to 6,27	No	ns	0,2494
d	**Student Unpaired two sample t-test**					
	control vs. p.Ile678Leu vector					
	P value	0.1401				
	P value summary	ns				
	Significantly different? (P < 0.05)	No				
	t, df	t = 1.4897, df = 82				
	P value for F test (to compare two variances)	0.1552				
	Significantly different? (P < 0.05)	No				
g	**Tbr2+ cells in IZ**					
	Column B	P.Gln313Lys				
	vs.	vs,				
	Column A	empty				
	Student Unpaired t test					
	P value	0,3619				
	P value summary	ns				
	Significantly different? (P < 0.05)	No				
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed				
	t, df	t=1,003 df=5				
	KI67+ cells in IZ					
	Column B	P.Gln313Lys				
	vs.	vs,				
	Column A	empty				
	Student Unpaired t test					
	P value	0,5562				
	P value summary	ns				
	Significantly different? (P < 0.05)	No				
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed				
	t, df	t=0,6302 df=5				
	KI67+Tbr2+/Tbr2+ cells in IZ					
	Column B	P.Gln313Lys				
	vs.	vs,				
	Column A	empty				
	Student Unpaired t test					
	P value	0,7989				
	P value summary	ns				
	Significantly different? (P < 0.05)	No				
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed				
	t, df	t=0,2686 df=5				
	Tbr2+ cells in SVZ					
	Column B	P.Gln313Lys				
	vs.	vs,				
	Column A	empty				
	Student Unpaired t test					
	P value	0,6789				
	P value summary	ns				
	Significantly different? (P < 0.05)	No				
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed				
	t, df	t=0,4456 df=4				
	KI67+ cells in SVZ					
	Column B	P.Gln313Lys				
	vs.	vs,				
	Column A	empty				
	Student Unpaired t test					
	P value	0,5455				
	P value summary	ns				
	Significantly different? (P < 0.05)	No				
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed				
	t, df	t=0,6596 df=4				
	KI67+Tbr2+/Tbr2+ cells in SVZ					
	Column B	P.Gln313Lys				
	vs.	vs,				
	Column A	empty				
	Student Unpaired t test					
	P value	0,6237				
	P value summary	ns				
	Significantly different? (P < 0.05)	No				
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed				
	t, df	t=0,5308 df=4				
j	**Pax6+ cells in SVZ**					
	Column B	P.Gln313Lys				
	vs.	vs,				
	Column A	empty				
	Student Unpaired t test					
	P value	0,6895				

	P value summary	ns
	Significantly different? (P < 0.05)	No
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
	t, df	t=0,4236 df=5
	KI67+ cells in SVZ	
	Column B	P.Gln313Lys
	vs.	vs,
	Column A	empty
	Student Unpaired t test	
	P value	0,6983
	P value summary	ns
	Significantly different? (P < 0.05)	No
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
	t, df	t=0,4108 df=5
	KI67+Pax6+/Pax6+ cells in SVZ	
	Column B	P.Gln313Lys
	vs.	vs,
	Column A	empty
	Student Unpaired t test	
	P value	0,6731
	P value summary	ns
	Significantly different? (P < 0.05)	No
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
	t, df	t=0,4478 df=5

Panel	Supplementary Figure 5					
c	**Anova table. One-way ordinary ANOVA**					
	Number of families	1				
	Number of comparisons per family	2				
	Alpha	0,05				
	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
	p.Ile678Leu vs. empty vector	-3,225	-32,37 to 25,92	No	ns	> 0,9999
	p.Ile678Leu vs. WT	-0,6918	-35,30 to 33,92	No	ns	> 0,9999
d	**Anova table. One-way ordinary ANOVA**					
	Number of families	1				
	Number of comparisons per family	2				
	Alpha	0,05				
	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
	p.Ile678Leu vs. empty vector	-54,24	-88,34 to -20,13	Yes	**	0,0031
	p.Ile678Leu vs. WT	-60,01	-100,2 to -19,82	Yes	**	0,0049
h	**Anova table. 2-way ordinary ANOVA**					
	Number of families	1				
	Number of comparisons per family	101				
	Alpha	0,05				
	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
	p.Ile678Leu vs. empty vector					
	Row 1	15,5	-397 to 428	No	ns	> 0,9999
	Row 2	-88,6	-501 to 324	No	ns	> 0,9999
	Row 3	-97,3	-510 to 315	No	ns	> 0,9999
	Row 4	-115	-528 to 297	No	ns	> 0,9999
	Row 5	-87,1	-500 to 326	No	ns	> 0,9999
	Row 6	-60,7	-473 to 352	No	ns	> 0,9999
	Row 7	-41	-454 to 372	No	ns	> 0,9999
	Row 8	4,92	-408 to 418	No	ns	> 0,9999
	Row 9	15,5	-397 to 428	No	ns	> 0,9999
	Row 10	9,42	-403 to 422	No	ns	> 0,9999
	Row 11	9,58	-403 to 422	No	ns	> 0,9999
	Row 12	51,5	-361 to 464	No	ns	> 0,9999
	Row 13	75,6	-337 to 488	No	ns	> 0,9999
	Row 14	81,4	-331 to 494	No	ns	> 0,9999
	Row 15	136	-277 to 549	No	ns	> 0,9999
	Row 16	146	-267 to 558	No	ns	> 0,9999
	Row 17	139	-273 to 552	No	ns	> 0,9999
	Row 18	153	-260 to 565	No	ns	> 0,9999
	Row 19	136	-277 to 548	No	ns	> 0,9999
	Row 20	122	-291 to 534	No	ns	> 0,9999
	Row 21	99,2	-314 to 512	No	ns	> 0,9999
	Row 22	70,1	-343 to 483	No	ns	> 0,9999
	Row 23	34	-379 to 447	No	ns	> 0,9999
	Row 24	9,75	-403 to 422	No	ns	> 0,9999
	Row 25	-5,42	-418 to 407	No	ns	> 0,9999
	Row 26	-6,58	-419 to 406	No	ns	> 0,9999
	Row 27	-26,2	-439 to 387	No	ns	> 0,9999
	Row 28	-44,9	-458 to 368	No	ns	> 0,9999
	Row 29	-67,1	-480 to 346	No	ns	> 0,9999
	Row 30	-57,4	-470 to 355	No	ns	> 0,9999
	Row 31	-79,8	-492 to 333	No	ns	> 0,9999
	Row 32	-89,8	-503 to 323	No	ns	> 0,9999
	Row 33	-78,2	-491 to 335	No	ns	> 0,9999
	Row 34	-84,2	-497 to 329	No	ns	> 0,9999
	Row 35	-94,5	-507 to 318	No	ns	> 0,9999
	Row 36	-96,3	-509 to 316	No	ns	> 0,9999
	Row 37	-99,9	-513 to 313	No	ns	> 0,9999
	Row 38	-97,5	-510 to 315	No	ns	> 0,9999
	Row 39	-97,9	-511 to 315	No	ns	> 0,9999
	Row 40	-81,6	-494 to 331	No	ns	> 0,9999
	Row 41	-78,7	-491 to 334	No	ns	> 0,9999
	Row 42	-74,8	-487 to 338	No	ns	> 0,9999
	Row 43	-56,4	-469 to 356	No	ns	> 0,9999
	Row 44	-35,6	-448 to 377	No	ns	> 0,9999
	Row 45	-38,9	-452 to 374	No	ns	> 0,9999
	Row 46	-26,9	-440 to 386	No	ns	> 0,9999
	Row 47	-7,75	-420 to 405	No	ns	> 0,9999
	Row 48	-26,5	-439 to 386	No	ns	> 0,9999
	Row 49	-8,5	-421 to 404	No	ns	> 0,9999

	Row 50	-1,67	-414 to 411	No	ns	> 0,9999
	Row 51	14,3	-398 to 427	No	ns	> 0,9999
	Row 52	25,3	-387 to 438	No	ns	> 0,9999
	Row 53	30,3	-382 to 443	No	ns	> 0,9999
	Row 54	41,3	-371 to 454	No	ns	> 0,9999
	Row 55	26,8	-386 to 440	No	ns	> 0,9999
	Row 56	26,2	-387 to 439	No	ns	> 0,9999
	Row 57	30	-383 to 443	No	ns	> 0,9999
	Row 58	22,5	-390 to 435	No	ns	> 0,9999
	Row 59	13,4	-399 to 426	No	ns	> 0,9999
	Row 60	9,83	-403 to 423	No	ns	> 0,9999
	Row 61	16,7	-396 to 429	No	ns	> 0,9999
	Row 62	3,58	-409 to 416	No	ns	> 0,9999
	Row 63	4,42	-408 to 417	No	ns	> 0,9999
	Row 64	16	-397 to 429	No	ns	> 0,9999
	Row 65	7,42	-405 to 420	No	ns	> 0,9999
	Row 66	-0,0833	-413 to 413	No	ns	> 0,9999
	Row 67	-3,75	-416 to 409	No	ns	> 0,9999
	Row 68	2,5	-410 to 415	No	ns	> 0,9999
	Row 69	1,25	-411 to 414	No	ns	> 0,9999
	Row 70	-6,42	-419 to 406	No	ns	> 0,9999
	Row 71	3,5	-409 to 416	No	ns	> 0,9999
	Row 72	-2,25	-415 to 410	No	ns	> 0,9999
	Row 73	-1,5	-414 to 411	No	ns	> 0,9999
	Row 74	-3,92	-417 to 409	No	ns	> 0,9999
	Row 75	0,667	-412 to 413	No	ns	> 0,9999
	Row 76	7,58	-405 to 420	No	ns	> 0,9999
	Row 77	13,1	-400 to 426	No	ns	> 0,9999
	Row 78	13,8	-399 to 426	No	ns	> 0,9999
	Row 79	9	-404 to 422	No	ns	> 0,9999
	Row 80	2,42	-410 to 415	No	ns	> 0,9999
	Row 81	0,25	-412 to 413	No	ns	> 0,9999
	Row 82	4	-409 to 417	No	ns	> 0,9999
	Row 83	8,67	-404 to 421	No	ns	> 0,9999
	Row 84	12,3	-400 to 425	No	ns	> 0,9999
	Row 85	12	-401 to 425	No	ns	> 0,9999
	Row 86	14,8	-398 to 427	No	ns	> 0,9999
	Row 87	21,3	-391 to 434	No	ns	> 0,9999
	Row 88	23,9	-389 to 437	No	ns	> 0,9999
	Row 89	29,2	-384 to 442	No	ns	> 0,9999
	Row 90	17,7	-395 to 430	No	ns	> 0,9999
	Row 91	15,9	-397 to 429	No	ns	> 0,9999
	Row 92	19,6	-393 to 432	No	ns	> 0,9999
	Row 93	17,8	-395 to 430	No	ns	> 0,9999
	Row 94	18,4	-394 to 431	No	ns	> 0,9999
	Row 95	19,3	-393 to 432	No	ns	> 0,9999
	Row 96	13,2	-400 to 426	No	ns	> 0,9999
	Row 97	43,3	-369 to 456	No	ns	> 0,9999
	Row 98	54,8	-358 to 468	No	ns	> 0,9999
	Row 99	9,08	-404 to 422	No	ns	> 0,9999
	Row 100	6	-407 to 419	No	ns	> 0,9999
	Row 101	-7,67	-420 to 405	No	ns	> 0,9999

Panel	**Supplementary Figure 6**					
b	**Unpaired t-test**					
	Column A	HA p.Ile678Leu				
	vs.	vs,				
	Column B	HA empty				
	Unpaired t test					
	P value	0,0033				
	P value summary	**				
	Significantly different? (P < 0.05)	Yes				
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed				
	t, df	t=3,00 df=115				
c	**Anova table. One-way ordinary ANOVA**					
	Number of families	1				
	Number of comparisons per family	4				
	Alpha	0,05				
	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
	HA empty vs. HA WT1	3,405	-22,67 to 29,48	No	ns	> 0,9999
	HA empty vs. HA P.Gln313Lys	9,784	-20,01 to 39,57	No	ns	> 0,9999
	HA empty vs. HA p.Ile678Leu	40,57	15,48 to 65,66	Yes	***	0,0002
	HA empty vs. HA-p.Ala1001Thr	14,04	-17,43 to 45,51	No	ns	> 0,9999
	Number of families	1				
	Number of comparisons per family	4				
	Alpha	0,05				
	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
	HA p.Ile678Leu vs. HA empty	-40,57	-65,66 to -15,48	Yes	***	0,0002
	HA p.Ile678Leu vs. HA WT1	-37,17	-60,90 to -13,43	Yes	***	0,0004
	HA p.Ile678Leu vs. HA P.Gln313Lys	-30,79	-58,56 to -3,016	Yes	*	0,0225
	HA p.Ile678Leu vs. HA-p.Ala1001Thr	-26,53	-56,10 to 3,032	No	ns	0,0998
d	**Anova table. 2-way ordinary ANOVA**					
	Please refer to Figure 6 panel g.					

Article 2

The kinesin Kif21b is a major effector of mouse neuronal migration during corticogenesis.

Laure Asselin[1,2,3,4], Peggy Tilly[1,2,3,4] and Juliette D. Godin[1,2,3,4].

1. Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France.
2. Centre National de la Recherche Scientifique, UMR7104, Illkirch, France.
3. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM, U1258, Illkirch, France.
4. Université de Strasbourg, Strasbourg, France

Introduction:

Neurons of the mammalian cerebral cortex belong to two major populations: glutamatergic projection neurons and GABAergic interneurons[1,2]. The migration of these newly born neurons is a precisely regulated process that is critical for the correct development of the brain. Neurons arise from the ventral (interneurons) and dorsal (projection neurons) proliferative neuro-epithelium lining the ventricles, named the ventricular zone (VZ). From there, they adopt two main paths to disperse throughout the cortex, namely radial and tangential migration. During radial migration, projection neurons follow a trajectory that is perpendicular to the ventricular surface, following several distinct phases[3]. First, bipolar neurons migrate through the sub-ventricular zone (SVZ) independently of the radial glia scaffold. Then, they stop their migration and convert to a multipolar shape in the intermediate zone (IZ), before converting to a bipolar shape. Thus, bipolar neurons attach to radial glia and move to the cortical plate by glia-guided locomotion. Finally, they undergo a final somal translocation to settle at appropriate position in the cortical plate. In contrast, tangentially migrating interneurons move in trajectories that are parallel to the ventricular surface to reach the cortical plate[4]. Contrary to radially migrating neurons that use radial glial fibers as substrate, tangentially migrating interneurons do not seem to require a support to migrate.

Kinesins are molecular motor proteins that play a fundamental role for normal neuronal development by controlling intracellular cargoes transport and microtubule (MT) cytoskeleton organization in both axons and dendrites[5,6]. Kinesin misregulation often leads to severe human neurodevelopmental disorders including microcephaly[7–12], megalencephaly[13] lissencephaly[14,15], polymicrogyria[7,16], pachygyria[7,17], ciliopathies[18,19], intellectual disabilities[13,18,20–22] and autism[23]. Altogether, these data suggest a key role of the kinesin superfamily in brain development.

Kif21b, which is exclusively expressed in spleen and central nervous tissues[24], is particularly enriched in neurons were it localizes into dendrites, axons and growth cones[25–28](Asselin et al., In revision). Moreover, Kif21b controls both MTs dynamics and intracellular transport *in vitro*[25,26,29] and regulates dendritic complexity and dendritic spines density in primary neurons[25,26,30,31]. *Kif21b* knock-out mice display cognitive flexibility impairment[25,30,32] and altered synaptic transmission[25,31]. In addition, *Kif21b* has been found, among several other WD-40 repeat containing proteins, to be essential for brain morphogenesis in young adult mice. As such, *Kif21b* knock-out mice display severe brain malformation including microcephaly, hydrocephaly and dysgenesis of the corpus callosum (CC)[33]. We recently reported three *de novo* and one inherited variants in *KIF21B* in unrelated individuals with neurodevelopmental disorder associated with brain malformations including corpus callosum agenesis (ACC) and microcephaly (Asselin et al., In revision). We demonstrated that the expression of *KIF21B* variants specifically recapitulates patients' neurodevelopmental abnormalities and established that missense *KIF21B* variants impede neuronal migration and connectivity through attenuation of kinesin autoinhibition. Altogether, these findings suggest a major role of Kif21b during cerebral cortex development.

Here, we studied the role of Kif21b in the two modes of neuronal migration (radial and tangential migration). Using *in utero* electroporation (IUE) of Kif21b inducible shRNAs, we showed an impaired distribution of Kif21b-silenced cells in the cortical plate, confirming Kif21b involvement in radial migration of projection neurons. Time lapse recording of Kif21b-silenced projection neurons revealed defects of both locomotion as well as impairment of multipolar to bipolar transition in absence of Kif21b. Interestingly, we found that Kif21b proteins that loss motor activity failed to rescue the migration phenotype, suggesting that Kif21b regulates migration of projection neuron through its motor domain. In addition of its function in regulating radial migration of projection neurons, we also demonstrated a role of Kif21b in tangential migration of interneurons. *Ex-vivo* electroporation of MGE (medial ganglionic eminences) explants with inducible *Kif21b* shRNA revealed a reduced migration velocity with impaired nuclear translocation and branching dynamics of migrating interneurons. Since our functional analyzes suggest that Kif21b might interact with both MTs and actin filaments in the developing cortex, we propose that Kif21b could modulate MTs and/or actin dynamics within the neuron during neuronal migration.

Results:

Kif21b is enriched in growth cone of cortical neurons where it colocalizes with actin filaments.

Since endogenous Kif21b has been previously shown to be strongly expressed in hippocampal neuronal cultures[27], we first confirmed Kif21b expression pattern in mouse cortical neurons. As expected, we found that Kif21b is expressed in both dendrites and axons, and enriched in growth cone in cortical primary neuronal culture (**Fig. 1a**). We then performed growth cone extraction from WT postnatal mouse cortices, which enable to purify growth cones (GC) from the other cytoplasm components (non-growth cone fraction, NGC) such as nucleus, endoplasmic reticulum or Golgi appartus[34]. As expected, Kif21b is enriched in the GC fraction of cortical neurons, compared to the NGC fraction (**Fig. 1b**). Growth cone are highly dynamic structures which contain distinct cytoskeletal arrangements of both actin filaments and MTs. Briefly, while the most central part of the growth cone comprises stable MTs, the most peripheral domain is enriched for actin filaments (F-actin)[35]. In order to dig deeper into the localization of Kif21b within the growth cone, we performed super-resolution imaging on cortical neuronal cultures. Surprisingly, we found that although, Kif21b seems to be absent from the MT-containing domain, it is enriched at the end-tips of growth cones, were it colocalizes with F-actin (**Fig. 1c**), suggesting that Kif21b might interact with the actin cytoskeleton. To clarify these observations, we performed MT and actin preparations from WT E18.5 cortices (**Fig. 1d,e**). These experiments enable to purify cytoskeleton components (MT or F-actin) through several high-speed centrifugation steps. As such, polymerized MT or F-actin are enriched in the pellet, whereas depolymerized MTs or globular actin (G-actin) remain in the supernatant. We found that Kif21b is exclusively present in the pellet fraction that contains polymerized MTs (**Fig. 1d**), confirming that Kif21b binds to MTs as previously shown[24]. Interestingly, our actin preparations revealed that Kif21b is found in the pellet fraction that contains F-actin (**Fig. 1e**). These results support the idea that Kif21b might not only interact with MT cytoskeleton, but also with actin filaments in the developing mouse cortex.

***Kif21b* depletion in post-mitotic neurons impairs radial migration.**

Given that our previous expression pattern analyses revealed an exclusive expression of Kif21b in both immature and mature neurons from early to late corticogenesis (Asselin et al., In revision), we silenced *Kif21b* specifically in post-mitotic projection neurons by *in utero* electroporation (IUE) of WT mice with a construct that expresses *Kif21b* shRNA in a CRE-dependent manner[36] together with NeuroD:Cre-GFP plasmid at E14.5 and observed the distribution of Kif21b-silenced cells in the cortical plate at E18.5. Efficacy of the two shRNAs (#1 and #2) was confirmed by RT-qPCR (-61.4% for sh-*Kif21b* #1, -45.1% for sh-*Kif21b* #2) and western blot (-

93.4% for sh-*Kif21b* #1, -61.3% for sh-*Kif21b* #2) (**Supplementary Fig. 1a,b**). While most of the GFP+ post-mitotic neurons expressing sh-scramble reached the cortical plate, neurons silenced for Kif21b accumulated in the intermediate zone (IZ), with a reduction of 23.5% and 32.2% of cells distributed in the upper cortical plate for sh-*Kif21b* #1 and sh-*Kif21b* #2, respectively (Bonferroni adjusted P = 0.0001) (**Fig. 2a,b**). However, silenced neurons for Kif21b showed a correct positioning at post-natal day (P) 2 (**Supplementary Fig. 1c**), indicating a delay in migration rather than a permanent arrest upon KIF21b depletion. Complementation experiments by IUE of *Kif21b* shRNA #2 together with wild-type (WT) NeuroD-Kif21b construct (WT-Kif21b) showed that radial migration phenotype is fully rescued (**Fig. 3c,d**). Altogether, these results strongly support that Kif21b has a specific effect on radial migration. As we previously showed that neurons overexpressing large amount of WT hKIF21B failed to reach the upper cortical plate (Asselin et al., *In revision*), we performed co-electroporation experiments of the inducible sh-scramble together with 1 unit of WT-Kif21b. As expected we did not observed any neuronal positioning defects (**Supplementary Fig. 2a,b**).

To confirm the involvement of Kif21b in radial migration we investigated migration phenotype in *Kif21b* conditional knock-out (cKO) embryos by IUE of NeuroD:Cre-GFP plasmid at E14.5. We observed a neuronal positioning impairment of Kif21b-depleted cells four days after IUE, with less cells reaching the upper cortical plate (decreased of 16%, Bonferroni adjusted P = 0.0001) (**Fig. 2c,d**). As Kif21a, the other member of kinesin-4 family, shares a high sequence similarity with Kif21b[24], we tested whether the two paralogues have redundant function in neuronal migration. To this aim, we performed rescue experiments by expressing full-length WT-Kif21a in Kif21b-silenced cells (**Supplementary Fig. 1d,e**) and did not observed any rescue of the migration phenotype, suggesting that loss of Kif21b function in migrating neurons cannot be compensated by Kif21a. In addition, we did not observed any neuronal mispositioning when we co-electroporated the inducible sh-scramble together with 1 unit of WT-Kif21a (**Supplementary Fig. 2a,b**). Altogether, our results indicate that Kif21b is required for post-mitotic projection neurons migration.

KIF21B regulates migration of projection neuron through its motor domain.

As other kinesins, Kif21b is composed of 3 functional domains[5]: (1) an amino-terminal motor domain (MD) that binds to MTs and enable to move cargos along[24,29]; (2) a coiled-coil domain that is thought to be involve in the kinesin dimerization[24]; and (3) a carboxy-terminal WD-40 domain containing seven repeated Trp-Asp (W-D) dipeptides (**Fig. 3a**).

To determine which functions of Kif21b are important for the radial migration of neurons, we performed rescue experiments by co-expressing inducible sh-*Kif21b* #2, together with various NeuroD-Kif21b constructs (**Fig. 3a**). Transfection in N2A neuroblastoma cell line showed that all the Kif21b constructs are expressed (**Fig.**

3b). Interestingly, Kif21b protein that loss motor activity (Kif21bΔMD) failed to completely rescue of the migration phenotype (**Fig. 3c,d**). Of note, the Kif21bΔMD seems to have a slight effect on radial migration when co-electroporated together with inducible sh-scramble (**Supplementary Fig. 2a,b**). Altogether, the partial rescue of the migration phenotype with Kif21bΔMD suggest that the motor domain is important for the migration.

Since Kif21b motor domain is required for intracellular transport of cargos, we then assess whether the motor function of Kif21b was relevant for migration, by overexpressing Kif21b constructs that either cannot bind (Kif21bΔATP) or hydrolyze ATP[25] (Kif21b-T96N) (**Fig. 3a**), in Kif21b-silenced neurons. Surprisingly, both constructs failed to rescue the migration phenotype at E18.5, suggesting that mobility of Kif21b is not required for radial migration (**Fig. 3c,d**). Accordingly, the carboxy-terminal WD-40 domain of Kif21b seems to be also dispensable for migration regulatory activities, as radial migration phenotype is fully rescued by overexpression of Kif21bΔWD-40 construct (**Fig. 3c,d**). Since this WD-40 domain has been proposed to bind cargos in Kif21b[24], our results strongly suggest that cargo transport activity is not implicated in radial migration of projection neurons. However, we cannot exclude that Kif21b binds to cargos or to other unknown scaffold proteins thanks to its coiled-coil domain, as it has been shown for other kinesins[37,38]. As expected, we did not observed any migration impairment when we co-electroporated the constructs (Kif21bΔATP, Kif21b-T96N or Kif21bΔWD-40) together with inducible sh-scramble (**Supplementary Fig. 2a,b**).

Collectively, our data strongly support that Kif21b motor domain is needed for radial migration. However, mobility activity of Kif21b does not seem to be required.

KIF21B regulates radial migration through the tight control of both locomotion and neural shape.

To determine which steps of radial migration is affected upon *Kif21b* knock-down, we studied the dynamics of projection neuron migration by time lapse recording of WT brain organotypic slices, electroporated with inducible *Kif21b* shRNA or sh-scramble together with NeuroD:Cre-GFP plasmid. Although *Kif21b* depletion did not affect the initial multipolar to bipolar transition required to start locomotion (**Fig. 4a**), we observed a strikingly increased number of immobile bipolar neurons in the IZ compared to sh-scramble control condition (**Fig. 4b**). Moreover, bipolar neurons that are still able to migrate through the cortical plate present defects of locomotion with a decrease of migration velocity (**Fig. 4c,d**) due to an increase of both number (**Fig. 4e**) and duration of pauses (**Fig. 4f**). Indeed, our morphological analyzes revealed that bipolar migrating neurons fail to persist in bipolar shape and convert to a multipolar shape more often, compared to sh-scramble control neurons (**Fig. 4g,i**). In addition, we observed that migration velocity rate (eg. the velocity of neurons without pauses) is also affected in Kif21b-silenced neurons (**Fig. 4h,i**).

During locomotion, bipolar neurons extend a leading process and form a cytoplasmic dilation (also known as a swelling) at the proximal region of the leading process. The formation of this structure is followed by nuclear translocation (nucleokinesis) toward the cytoplasmic swelling[39,40]. This two-step sequential morphological change (swelling formation and nuclear movement) is essential for proper neuronal migration. We thus measure the mean number of swelling and nuclear translocation (nucleokinesis) per neuron, for 10 hours (hr) recording. We observed that the frequency of swelling formation was significantly decreased in Kif21b-depleted projection neurons compared to sh-scramble control (**Fig. 4j**), suggesting that those neurons failed to form a swelling. Furthermore, the mean number of nucleokinesis of Kif21b-depleted neurons was also reduced (**Fig. 4k**) and this likely contributed to the net decrease of migration velocity rate that we observed in projection neurons lacking Kif21b (**Fig. 4h,i**).

Altogether, these data show that Kif21b disruption affects the locomotion phase of bipolar neurons, leading to an overall delay of radial migration compared to sh-scramble control condition (**Fig. 3l**).

Kif21b depleted interneurons present nucleokinesis and branching defects during tangential migration.

The correct formation of a fully functional cortex requires the timed migration and insertion of interneurons in the developing cortical layers. As Kif21b is undoubtedly regulating radial migration of projection neurons, we asked whether Kif21b has also a key function during tangential migration of cortical interneurons. Our previous results showed that both *Kif21b* transcripts and protein were detected in the ventral mouse developing telencephalon (Asselin et al., In revision). The expression of Kif21b in the mouse developing ganglionic eminences was confirmed by RT-qPCR and western blot (**Supplementary Fig. 3a,b**).

At the cellular level, tangential migration encompasses repetitive cycles of nucleokinesis and dynamic branching of the leading process[39]. To quantify the morphological changes of cortical interneurons during migration, we cultured medial ganglionic explants (MGE) from E13.5 Dlx:Cre-GFP embryos electroporated *ex-vivo* with Cre dependent cherry expressing vector (pCAG-loxPSTOPloxP-Cherry) together with sh-scramble or sh-RNA-*Kif21b* #2 on a monolayer of WT cortical cells (**Fig. 5a,b**). This strategy allows knockdown of Kif21b specifically in migrating interneurons and their visualization using the cherry plasmid. After 24 hr of culture, RFP+ interneurons that had migrated out of MGE explants are recorded for 4 hr. This model recapitulates most aspects of cortical interneuron migration *in vivo* and is appropriate to study the effects of Kif21b knock down, independently from defects in projection neurons[39,41].

Time lapse recordings of electroporated explants culture revealed that, although interneurons were able to migrate out of the explant, Kif21b-silenced interneurons moved significantly slower than the sh-scramble

electroporated neurons (**Fig. 5c**). However, Kif21b depletion did not affect the persistence of movement meaning that directionality of this displacement was not altered (**Fig. 5d**). Interneurons use a saltatory mode of migration consisting of nuclear translocation (nucleokinesis) and pauses[39]. We thus analyzed in more detail the kinetics of these cells. Although neither the frequency of nucleokinesis nor the amplitude were affected upon *Kif21b* depletion (**Fig. 5e,f**), we observed a shorter duration of the nucleokinesis compared to control condition (**Fig. 5a,b,g**), further confirming a role of Kif21b in nucleokinesis (**Fig. 4k**). In addition to nucleokinesis defects, Kif21b knock-down interneurons showed abnormal branching dynamics. Branches emerge from the division of growth cones located at the end tip of existing processes and Kif21b knock-down interneurons showed a reduced frequency of growth cone splitting (**Fig. 5h**), however, the maximal area of the growth cone (**Fig. 5i**), as well as the maximal length of the leading process (**Fig. 5j**) were not affected. Overall, our data indicate that in addition to controlling nucleokinesis kinetics, Kif21b controls branching dynamics of interneurons during tangential migration by regulating growth cone splitting.

Conclusion:

Here, we investigated the roles of the kinesin KIF21B in neural migration. Interestingly, using *in utero* and *ex vivo* electroporation of shRNAs, we demonstrated that depletion of *Kif21b* impaired both radial migration of projection neurons and tangential migration of interneurons. Real-time recordings revealed that both projection neurons and interneurons moved significantly slower upon *Kif21b* knockdown. Interestingly, both types of neurons exhibited defect of nucleokinesis and abnormal morphology dynamics. Indeed, projection neuron depleted for KIF21B showed defects in multipolar to bipolar transition and underwent less nucleokinesis during the locomotion phase (**Fig. 4**). Similarly, interneurons exhibited a reduced duration of the nucleokinesis and less growth cone splitting (**Fig. 5**). Collectively, our results indicate that Kif21b regulate the neuronal migration of cortical neurons, likely through the regulation of nucleokinesis and morphology dynamics.

In a search for molecular mechanism, we further performed complementation experiments and showed that although Kif21b motor domain is needed for radial migration, mobility activity of Kif21b does not seem to be required (**Fig. 3c,d**), suggesting that Kif21b controls migration through another function. As Kif21b interacts with both MTs and actin filaments in the developing cortex (**Fig.1**), we speculate that Kif1b could regulate migration by controlling both MTs and/or actin dynamics that could be quite innovating for a kinesin. Supporting this idea, 1) Kif21b has recently been shown to be implicated in MT dynamics, by favoring MT growth and catastrophes[25,26]; 2) Kif21b depletion in migrating neurons altered both actin-dependent mechanisms[39,42] (nucleokinesis, growth cone dynamics) and MTs-dependent mechanisms[42] (nucleokinesis, branching) (**Fig. 4,**

5); and 3) Kif21b colocalizes with actin in the growth cone (**Fig.1**). Further experiments will be required to define how and to which extent Kif21b regulates MT and/or actin dynamics during neuronal migration.

Material and Methods:

Cloning and plasmid constructs.

Wild-type mouse *Kif21b* Coding DNA Sequence (CDS) was isolated from E18.5 cDNA mouse cortices by PCR and a new isoform has been amplified. This isoform is 4920 bp long and has an insertion (c.4905_4906ins C; NM_001252100.1) that leads to the introduction of a premature stop codon in exon 35. This isoform has been subcloned by restriction-ligation into the NeuroD-IRES-GFP plasmid. The following amino acids corresponding to different domains were deleted by site-directed mutagenesis to generate the *Kif21b* constructs: Kif21bΔMD (Δ9-371, motor domain), Kif21bΔATP (Δ87-94, ATP binding site), Kif21bΔWD-40 (Δ1308-1639, WD-40 domain). The c.288 C>T substitution that abolishes Kif21b mobility[25] were created from WT CDS by Sequence and Ligation Independent Cloning (SLIC) to generate the Kif21b-T96N construct.

Wild-type mouse *Kif21a* CDS (NM_001109040.2) was isolated from E18.5 cDNA mouse cortices by PCR and subcloned by restriction-ligation into the NeuroD-IRES-GFP plasmid.

shRNAs against the 3'-UTR (sh-*Kif21b*) of mouse *Kif21b* were generated by annealing of sense and antisense oligos, the resulting duplex were subcloned in pCALSL-mir30 backbone vector digested with XhoI and EcoRI. The following oligos were used: sh-*Kif21b* #1:

sense:5'TCGAGaaggtatattgctgttgacagtgagcgCCACGATGACTTCAAGTTCAAtagtgaagccacagatgtaTTGAAC TTGAAGTCATCGTGGtgcctactgcctcgG 3'; antisense: 5'AATTCcgaggcagtaggcaCCACGATGACTTCAAGTTCAAtacatctgtggcttcactaTTGAACTTGAAGTCATCGTG GcgctcactgtcaacagcaatataccttC 3'; sh-*Kif21b* #2: sense: 5'TCGAGaaggtatattgctgttgacagtgagcgGCCTTTAACAACCAGAGTATAtagtgaagccacagatgtaTATACTCTGGT TGTTAAAGGCtgcctactgcctcgG 3'; antisense: 5'AATTCcgaggcagtaggcaGCCTTTAACAACCAGAGTATAtacatctgtggcttcactaTATACTCTGGTTGTTAAAGG CcgctcactgtcaacagcaatataccttC 3***;*** *Scrambled shRNA:* Sense: 5'TCGAGaaggtatattgctgttgacagtgagcgGCGCGATAGCGCTAATAATTTtagtgaagccacagatgtaAAATTATTAGC GCTATCGCGCtgcctactgcctcgG 3'; Antisense: 5'AATTCcgaggcagtaggcaGCGCGATAGCGCTAATAATTTtacatctgtggcttcactaAAATTATTAGCGCTATCGCG CcgctcactgtcaacagcaatataccttC 3'

A Cre/loxP conditional cherry expressing plasmid (pCAG-loxPSTOPloxP-Cherry)[42] was used for real time imaging of migrating interneurons.

Mice.

Mice were bred at the IGBMC animal facility under controlled light/dark cycles and were provided with food and water ad libitum. Timed-pregnant wild-type (WT) NMRI (Janvier-labs) females were used for *in utero* electroporation at embryonic day 14.5 (E14.5). Timed-pregnant Dlx5,6 Cre-GFP[43] females were used for *ex-vivo* electroporation at E13.5. *Kif21b* conditional KO mice were generated using the International Mouse Phenotyping Consortium targeting mutation strategy[44] and obtained from UC Davis/ KOMP repository (Kif21b$^{tm1a(KOMP)Wtsi}$). Conditional heterozygous *Kif21b$^{WT/fl}$* males and females were crossed and timed-pregnant females were used for *in utero* electroporation at 14.5. Genotyping was done as follows: Genomic DNA was extracted from tail biopsies using PCR reagent (Viagen) supplemented with Proteinase K (1 mg/mL), heated at 55°C for 5 h. Proteinase K was inactivated for 45 min at 85°C, and cell debris was removed by centrifugation. Samples were processed for PCR using the following primers: Kif21b forward: 5´-CGTCACAAAGCCCTGGTTG-3´, Kif21b reverse: 5'-GAAGGGACCAAACCTGGGC-3'. The presence of the wild type and conditional knockout alleles was indicated by 346 and 513 bp products, respectively, which were detected on a 2% agarose gel.

RNA extraction, cDNA synthesis and RT–qPCR.

Total RNA was extracted from the ganglionic eminences of WT NMRI mouse embryos at different time points of development, with TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific). We used Kif21b ex2-3 to target mouse *Kif21b* cDNA and actin as housekeeping genes normalizer. ShRNA-*Kif21b* knock-down efficacy was also assessed by RT-qPCR. Total RNA was prepared from HEK293K cells overexpressing sh-scrambled or ShRNA-*Kif21b* #2 together with pEGFP-C1-3'UTR KIF21B or from HEK 293K cells overexpressing sh-scrambled or ShRNA-*Kif21b* #1 together with pEGFP-C1-WT-Kif21b. We used GFP primers to target the 3'UTR sequence of *Kif21b* cDNA fused to GFP and KIF21B ex2-3 primers to target *Kif21b* cDNA. We used GAPDH or Hprt1 primers as housekeeping genes normalizer. cDNA samples were synthetized with SuperScript IV Reverse Transcriptase (Invitrogen) and submitted to DNAseI treatment (TurboDNAse, ThermoFisher). RT–qPCR was performed in a LightCycler PCR instrument (Roche) using SYBR Green Master Mix (Roche). RT-qPCR was also performed to assess the degradation of the mutant mRNA by nonsense-mediated decay (NMD).

Gene	Forward sequence	Reverse sequence
Actin	TATAAAACCCGGCGGCGCA	TCATCCATGGCGAACTGGTG
KIF21B ex2-3	AAGGCTGCTTTGAGGGCTAT	AAAGCCGGTGCCCATAGTA
GFP	TACGGCAAGCTGACCCTGAAGT	GAAGTCGTGCTGCTTCATGTGG
GAPDH	TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG	TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT
Hprt1	AGGCGAACCTCTCGGCTTTC	TCATCATCACTAATCACGACGCC

***In utero* electroporation.**

In utero electroporation (IUE) was performed as described previously[81,82]. Timed-pregnant mice were anesthetized with isoflurane (2 l per min of oxygen, 4% isoflurane in the induction phase and 2% isoflurane during surgery operation; Tem Sega). The uterine horns were exposed, and a lateral ventricle of each embryo was injected using pulled glass capillaries (Harvard apparatus, 1.0OD*0.58ID*100mmL) with Fast Green (1 µg/µl; Sigma) combined with different amounts of DNA constructs using a micro injector (Eppendorf Femto Jet). For WT NMRI embryos electroporation, we injected 1 µg/µl of NeuroD:Cre-GFP vector and 1 µg/µl NeuroD-Ires GFP vector (empty, WT or mutated for Kif21b or WT-Kif21a construct) together with 3 µg/µl of either Cre inducible pCALSL-miR30-shRNA-*Kif21b* or pCALSL-miR30-sh-scramble sequence. In cKO *Kif21b* embryos, we injected 3 µg/µl of NeuroD:Cre-GFP vector together with 0,5 µg/µl of NeuroD-Ires GFP empty vector. Plasmids were further electroporated into the neuronal progenitors adjacent to the ventricle by discharging five electric pulses (40V) for 50 ms at 950 ms intervals using electrodes (diameter 3 mm; Sonidel CUY650P3) and ECM-830 BTX square wave electroporator (VWR international). After electroporation, embryos were placed back in the abdominal cavity and the abdomen was sutured using surgical needle and thread. Pregnant mice were sacrificed by cervical dislocation, and embryos or pups were collected at E18,5 and P2 respectively.

Mouse brain collection and immunolabeling.

E18.5 or P2 animals were sacrificed by head sectioning and brains were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA, Electron Microscopy Sciences) in Phosphate buffered saline (PBS, HyClone) 2h at room temperature. After fixation, brains were rinsed and equilibrated in 20% sucrose in PBS overnight at 4°C, embedded in Tissue-Tek O.C.T. (Sakura), frozen on dry ice and coronal sections were cut at the cryostat (18 µm thickness, Leica CM3050S) and processed for immunolabeling. Sections were maintained at -80°C.

Cryosections were permeabilized and blocked with 5% Normal Donkey Serum (NDS, Dominic Dutsher), 0.1% Triton-X-100 in PBS. Slides were incubated with anti-GFP primary antibody (Abcam ab6673 : 1/500) diluted in blocking solution overnight at 4°C then rinsed and incubate with Donkey-goat-488 secondary antibody diluted in PBS-0.1% Triton for one hour at room temperature. Cell nuclei were identified using DAPI (1mg/ml Sigma). All images were taken using an SP5 inverted confocal microscope (TCS SP5, Leica), connected to a LAS-X imaging software (Leica).

Primary neuronal culture and immunolabeling.

Cortices from E14.5 NMRI mouse embryos were dissected in cold PBS supplemented with BSA (3 mg/mL), MgSO4 (1 mM, Sigma), and D-glucose (30 mM, Sigma). Cortices were dissociated in Neurobasal media containing papain (20U/mL, Worthington) and DNase I (100 µg/mL, Sigma) for 20 min at 37°C, washed 5 min with Neurobasal media containing Ovomucoïde (15 mg/mL, Worthington), and manually triturated in OptiMeM supplemented with D-Glucose (20mM). Cells were then plated at 2×10^5 cells per 24-well plate coated with poly-D-lysine (1 mg/ml, Sigma) overnight at 4°C and cultured for two to five days in Neurobasal medium supplemented with B27 (1x), L-glutamine (2 mM), and penicillin (5 units/ml)-streptomycin (50 mg/ml). Cells were fixed at DIV6 or DIV8 for 15 min at room temperature in 4% PFA, 4% sucrose in PBS, and incubated for 1 hour in 0.1% Triton X-100, 5% NDS in PBS. Primary antibodies (Kif21b: 1:500 from Sigma (HPA027274); Map2: 1:1000 from Millipore (MAB364)) were incubated overnight at 4°C in blocking solution. After 3 washes in PBS, secondary antibodies (Donkey-rabbit-555 (A-31572) and Donkey-mouse-488 (A-21202) from Invitrogen) or anti-phalloïdin-647 antibody (ab176759) from Abcam were incubated for 1 hour at room temperature in blocking solution. DNA was stained using DAPI (1/1000, Sigma).

***Ex-vivo* electroporation of medial ganglionic eminence (MGE) explants and time lapse imaging of migrating interneurons.**

Ex-vivo electroporation of MGE and time-lapse imaging has been done as previously described[41]. The heads of E13.5 Dlx5,6 Cre-GFP[43] embryos were harvested and the cortex removed in order to expose the ganglionic eminences. Plasmids to overexpress Cre inducible pCALSL-miR30-shRNA-*Kif21b* or pCALSL-miR30-sh-scramble were used at a concentration of 3 µg/µl and were directly injected in the MGEs. These plasmids were co-electroporated with a Cre/loxP conditional cherry expressing plasmid used at a concentration of 1 µg/µl. Electroporation conditions: 50V, 5 pulses of 50ms duration spaced by 1s interval. Electroporated MGEs were then cultured on cortical cell feeder seeded on glassbottom petridish (MatTek, Ashland, USA). Co-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 Leica SP8 scanning confocal microscope with a 25X objective. Images of living cherry-expressing migrating interneurons were acquired every 5 minutes during 4 hours. Sequences were analyzed using ImageJ and the MTrackJ plugin.

Real-time imaging of cortical projection neuron migration.

NMRI E14.5 mouse brain were electroporated with 1 µg/µl NeuroD:Cre-GFP and 1 µg/µl NeuroD-GFP vectors together with 3 µg/µl of either Cre inducible shRNA-*Kif21b* or sh-scramble as described. E16.5 brains were embedded in 3% low-melt agarose (BioRad) diluted in HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, ThermoFisher Scientific) and sliced (300 µm) with a vibratome (Leica VT1000S, Leica Microsystems). Brain slices were cultured 16 to 24 hr 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 2% B27, 1% N2, and 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Life Technologies). 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 Leica SP8 scanning confocal microscope. Images were taken with a 25X objective and 25 successive 'z' optical plans spanning 50 µm every 30 min during 10 h. Sequences were analysed using Image J and the MTrackJ plugin.

Cell culture and transfections.

Mouse neuroblastoma N2A cells were cultured in DMEM (1g/l glucose) (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO) supplemented with 5% Fetal Calf Serum (FCS) and Gentamycin 40µg/ml in a humidified atmosphere containing 5% CO2 at 37°C. Human embryonic kidney (HEK) 293T cells were cultured in DMEM (1g/l glucose) (GIBCO) supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS), penicillin 100 UI/ml, streptomycin 100 µg/ml in a humidified atmosphere containing 5% CO2 at 37°C. Both cell lines were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. N2A cells were transfected using the different NeuroD-Kif21b-IRES-GFP constructs. HEK293K cells were transfected using sh-scrambled or ShRNA-*Kif21b* #2 together with pEGFP-C1-3'UTR KIF21B or sh-scrambled or ShRNA-*Kif21b* #1 together with pEGFP-C1-WT-Kif21b. Expression of transfected genes was analyzed 48 hr after transfection by RT-qPCR or immunoblotting.

Protein extraction and western blot.

Proteins from mouse GE (E14.5 to P2) or transfected cells (N2A or HEK 293T) were extracted as follows: cells were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8.0,1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) supplemented with EDTA-free protease inhibitors (cOmplete™, Roche) for 30 min, then cells debris were removed by high speed centrifugation at 4°C for 25 min. Protein concentration was measured by spectrophotometry using Bio-Rad Bradford protein assay reagent. Samples were denatured at 95°C for 10 min in Laemmli buffer (Bio-Rad) with 2% β-mercaptoethanol and then resolved by SDS–PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked in 5% milk in PBS buffer with 0.1%

Tween (PBS-T) and incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies in blocking solution: Kif21b (Sigma HPA027274, Rabbit, 1:2000), GFP (Abcam ab6673, Goat, 1:5000), DCX (Santa Cruz, sc-8067), α-tubulin (Sigma 024M4767V, Mouse 1/5000), GM130 (Protein Tech. 113081AP, Rabbit, 1:2000) and Jip-1 (Santa Cruz sc-25267, Mouse, 1:2000). Membranes were washed 3 times in PBS-T and incubated at room temperature for 1 hr with the following secondary antibodies HRP-coupled: Goat-Rabbit (Invitrogen, G-21234), Goat-mouse (Invitrogen, G-21040) or Donkey-Goat (Santa Cruz, sc2020) at 1:10,000 dilution or Actin (Sigma, A3854) at 1:50,000 in PBS-T, followed by 3 times PBS-T washes. Visualization was performed by quantitative chemiluminescence using SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Sigma). Signal intensity was quantified using ImageQuant LAS 600 (GE Healthcare). All immunoblot experiments consisted of at least three independent replicates.

Growth cone extraction from mouse brain.

Isolation of growth cone was performed on WT NMRI mouse cortices at post-natal day (P) 2 as previously described[34]. Five P2 mouse brains were homogenized in 5 mL homogenization buffer (5 mM Tris-HCl, 0.32 M sucrose, 1 mM $MgCl_2$) supplemented with EDTA-free protease inhibitors (cOmplete™, Roche), then centrifuged at 1,660 x g for 15 min at 4 °C. Supernatant were loaded on top of a discontinuous 0.75/1.0/2.33 M sucrose density gradient and centrifuge at 242,000 x g for 60 min at 4°C (Beckman SWTi41 swing rotor). The growth cone depleted fraction were collected between 0.75 M and 1.0 M sucrose. The growth cone enriched fraction were collected at the interface between the load and 0.75 M sucrose, re-suspend in the homogenization buffer and centrifuged at 100,000 *x g* for 40 min at 4°C (Beckman SWTi41 swing rotor). The pellet containing the growth cone were re-suspended in 50 µl of the homogenization buffer. The same volume of each fraction was analyzed by western blot. Non-growth cone membranes, which also contain Golgi membranes, were revealed by the enrichment of Golgi matrix protein (GM130 primary antibody), while the growth cone fraction was revealed by the enrichment of Jip1 protein.

Microtubule (MT) preparation.

Microdissected cortices (3 to 4 cortices per 500 µl) were lysed in cold PEM buffer (100 mM PIPES, pH6.7, 1 mM EGTA, 1 mM $MgCl_2$) supplemented with EDTA-free protease inhibitors (cOmplete™, Roche), sheared with 25G needle, incubated on ice for 30 minutes to allow MTs depolymerization and centrifuged at 10,000 g for 30 minutes at 4°C. MTs in the supernatant (S) were polymerized at 37°C for 45 minutes by addition of GTP (1 mM final, Sigma, St Louis, USA) and taxol (20 µM final). MTs were pelleted by centrifugation at 100,000 g for 45 minutes. After centrifugation, 1 vol of 2% SDS buffer was added to the S, and the pellet (P) was

resuspended in 1% SDS buffer, heated 5 minutes at 100°C, and sonicated before loading. The same volume of each fraction was analyzed by western blot.

F-actin sedimentation assay.

F-actin sedimentation assay were done as previously described[42]. Microdissected cortices (3 to 4 cortices per 500 µl) were lysed in the following buffer (50 mM PIPES, pH 6.9, 50 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM EGTA, 5% glycerol, 0.1% NP40, 0.1% Triton X-100, 0.1% Tween 20, 0.1% β- mercaptoethanol) supplemented with EDTA-free protease inhibitors (cOmplete™, Roche) and incubated during 10 minutes at 37°C and centrifuged (2,000 g, 5 minutes) to remove nuclei and then subjected to a high-speed centrifugation step (100,000 g, 1 hour, 37°C) to obtain a clear supernatant (G-actin) and a pellet (F-actin). Pellet were dissolved (water containing 10 µM cytochalasin D) in the same volume as the collected supernatant overnight at 4°C and equal amounts of each fraction were subjected for western blot analysis.

Image analyses and statistics.

Images were acquired in 1024x1024 mode using confocal microscope (TCS SP5; Leica) at 20x magnification and a z stack of 1,55 µm and analyzed using ImageJ software. Super-resolutive images were acquired using Leica TCS SP8 STED 3X and analyzed using ImageJ software. For migration analyses, cortical wall areas (upper cortical plate, lower cortical plate, intermediate zone, subventricular zone/ventricular zone) were identified according to cell density (nuclei staining with DAPI). The total number of GFP-positive cells in the embryonic brain sections was quantified by counting positive cells within a box of fixed size and the percentage of positive cells in each cortical area was calculated.

All statistics were calculated using GraphPad Prism 6 (GraphPad) and are represented as mean +/- S.E.M. All statistical tests used and n numbers have been mentioned in figure legends along with the respective data and statistical details are reported in **Supplementary Table 1**. After histological examination, only brains with comparable electroporated regions and efficiencies were conserved for quantification. Graphs were generated using GraphPad and images were assembled with Adobe Photoshop 13.0.1 (Adobe Systems).

Figure Legends:

Figure 1: Kif21b interacts with both actin and MT cytoskeletons in the developing cortex and colocalizes with actin filaments in growth cones. (**a,c**) Primary cultured cortical neurons at DIV6 (**a**) or DIV8 (**c**), immunolabelled for Kif21b (red) and Map2 (green) (**a**) or phalloidin for F-actin (green) (**c**) show that Kif21b is enriched in growth cone (**a**, inset) where it colocalizes with actin filaments (**c**). (**b**) Western blot of extracts from growth cone (GC, enriched for vesicle marker Jip1) and non-growth cone fraction (NGC, enriched for Golgi marker GM130) isolated from P2 wild type mouse cortices, showing Kif21b enrichment in the GC fraction. (**d,e**) Western blot of extracts from microtubule (MT) (**d**) and actin (**e**) preparation isolated from E18.5 wild type mouse cortices, showing that Kif21b interacts with MT (**d**) and also with actin filaments (F-actin). (**b,d,e**) n=3 independent experiments. Scale bars: (**a** and inset) 20µm; (**c**) 1 µm. DIV, days *in vitro*.

Figure 2: Kif21b depletion specifically alters radial migration of projection neurons. (**a**) Coronal sections of E18.5 mouse brains electroporated at E14.5 with NeuroD:Cre-GFP together with either Cre inducible shRNA-*Kif21b* #1 or #2 or sh-scramble sequence. (**c**) Coronal sections of E18.5 WT of double floxed (fl/fl) Kif21b conditional knock-out (cKO) mouse brains electroporated at E14.5 with NeuroD:Cre-GFP. (**a,c**) GFP-positive electroporated cells are depicted in green. Nuclei are stained with DAPI. Scale bars, 50 µm. (**b,d**) Histograms (means ± s.e.m.) showing the distribution of GFP-positive neurons in different regions (Up CP, Lo CP or SVZ /IZ) in all conditions as indicated. Embryos analyzed per condition: (**a**) n=7 (sh-scramble), n=8 (sh-*RNA*-Kif21b #1) and n=9 (sh-RNA-*Kif21b* #2); (**d**) n=4 (wild-type) and n=5 (cKO/cKO). Significance was calculated by two-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test. ns, non-significant; *P < 0.05; **P < 0.005; ***P < 0.001, ****P < 0.0001. Up CP, Upper cortical plate; Lo CP, Lower cortical plate; IZ, intermediate zone; SVZ, subventricular zone.

Figure 3: Kif21b motor domain is essential for migration of projection neurons. (**a**) Schematic representation of the mouse Kif21b protein indicating the different domains, and the recombinants constructs that have been used in this study. (**b**) N2A cells transfected with the indicated NeuroD-IRES-GFP constructs showing that both wild-type (WT) and mutant Kif21b protein are expressed. Actin was used as a loading control. (**c**) Coronal sections of E18.5 mouse brains electroporated at E14.5 with NeuroD:Cre-GFP together with either Cre inducible shRNA-*Kif21b* #2 or sh-scramble sequence. GFP-positive electroporated cells are depicted in green. Nuclei are stained with DAPI. Scale bars, 50 µm. (**d**) Histograms (means ± s.e.m.) showing the distribution of GFP-positive neurons in different regions (Up CP, Lo CP or SVZ /IZ) in all conditions as

indicated. Embryos analyzed per condition: n=3 (sh-scramble + Empty vector), n=11 (sh-RNA-Kif21b + Empty vector) and n≥5 (sh-Kif21b + indicated constructs). Significance was calculated by two-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test. ns, non-significant; *P < 0.05; **P < 0.005; ***P < 0.001, ****P < 0.0001. Up CP, Upper cortical plate; Lo CP, Lower cortical plate; IZ, intermediate zone; SVZ, subventricular zone.

Figure 4: Kif21b controls the locomotion of migrating bipolar projection neurons. Real-time imaging of E16.5 brain slices after 1 day in culture, electroporated with NeuroD:Cre-GFP and either Cre inducible shRNA-*Kif21b* or sh-scramble at E14.5. (**a,g**) Percentage of multipolar to bipolar cell morphology conversion (**a**) or bipolar to multipolar cell morphology (**g**), during 10 hr recording (N≥6 embryos per each condition in three independent experiments). Histograms (means ± s.e.m.) showing the quantification of the number of non-migrating bipolar cells (**b**), migration velocity (**c**) and migration velocity rate (**h**), average pause number (**e**) or total pause duration (in minutes) (**f**), frequency of swelling (**j**) and number of nucleokinesis (**k**) per 10 hr recording (n≥77 neurons analyzed from N≥6 embryos per each condition in three independent experiments). (**d**) Locomotory paths (colored lines) of NeuroD-Cre-GFP electroporated neurons recorded during time lapse imaging for 10 hr. (**i**) Time lapse recording of WT brain organotypic slices, electroporated with inducible *Kif21b* shRNA or sh-scramble together with NeuroD:Cre-GFP plasmid. (**l**) Model for Kif21b-dependant functions during radial migration. Scale bars, 50µm (**d**) and 20µm (**i**). Significance was calculated by unpaired two-tailed Student t-test, ns, non-significant; *P < 0.05; **P < 0.005; ***P < 0.001.

Figure 5: Kif21b depletion delays interneuron migration and alters branching dynamics. (**a,b**) Time-lapse sequence showing the migration of MGE-derived interneurons from Dlx5,6 Cre-GFP E13.5 embryos, electroporated with a Cre-inducible cherry expressing plasmid together with Cre-inducible shRNA-*Kif21b* or sh-scramble. The green dot show the nucleus. The light blue square show the nucleokinesis. Time corresponds to minutes. (**d-g**) Histograms (means ± s.e.m.) showing the quantification of different migration parameters such as average speed (**c**), persistence (**d**), frequency (**e**), amplitude (**f**) and duration (**g**) of nuclear translocations of interneurons. (**h-j**) Histograms (means ± s.e.m.) showing the quantification of the frequency of growth cone splitting (**h**), the maximal area of the growth cone (**i**) and the maximal length of the leading process (**j**). n≥7 neurons analyzed from N≥3 embryos per each condition in two independent experiments. Scale bars, 20µm (**b,c**). Significance was calculated by unpaired two-tailed Student t-test, ns, non-significant; *P < 0.05; **P < 0.005; ***P < 0.001.

Supplementary Figure Legends:

Supplementary Figure 1, related to Figure 2: Kif21b depletion specifically alters radial migration of projection neurons. (**a,b**) RT-qPCR (**a**) or western blot (**b**) of HEK293T cells transfected with the indicated constructs showing *Kif21b* knock-down efficiency. Data (means ± s.e.m) from at least 3 independents experiments. (**c,d**) Coronal sections of P2 (**c**) or E18.5 (**d**) mouse brains electroporated at E14.5 with NeuroD:Cre-GFP together with either Cre inducible shRNA-*Kif21b* #2 or sh-scramble sequence. Rescue experiments were done by co-expressing NeuroD:Cre-GFP, inducible shRNA-*Kif21b* #2 together with WT-Kif21a at 1 µg/µl (**d**). GFP-positive electroporated cells are depicted in green. Nuclei are stained with DAPI. Scale bars, 50 µm. (**e**) Histograms (means ± s.e.m.) showing the distribution of GFP-positive neurons in different regions (Up CP, Upper cortical plate; Lo CP, Lower cortical plate; IZ, intermediate zone; SVZ, subventricular zone) in all conditions as indicated. Embryos analyzed per condition: n=3 (sh-scramble + Empty vector), n=11 (sh-RNA-Kif21b + Empty vector) and n=3 (sh-Kif21b + WT-Kif21a). Significance was calculated by two-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test. ns, non-significant; *P < 0.05; **P < 0.005; ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

Supplementary Figure 2, related to Figure 3: Overexpression of Kif21b-truncated constructs do not alter radial migration. (**a**) Coronal sections of P2 (**c**) or E18.5 (**d**) mouse brains electroporated at E14.5 with NeuroD:Cre-GFP together with sh-scramble and the different NeuroD-Kif21b vectors at 1 µg/µl. GFP-positive electroporated cells are depicted in green. Nuclei are stained with DAPI. Scale bars, 50 µm. (**b**) Histograms (means ± s.e.m.) showing the distribution of GFP-positive neurons in different regions (Up CP, Upper cortical plate; Lo CP, Lower cortical plate; IZ, intermediate zone; SVZ, subventricular zone) in all conditions as indicated. Embryos analyzed per condition: n≥3 for all conditions. Significance was calculated by two-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test. ns, non-significant; *P < 0.05; **P < 0.005; ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

Supplementary Figure 3, related to Figure 5: Kif21b is expressed in ganglionic eminences during mouse brain development. (**a**) RT-qPCR analyses showing expression of *Kif21b* transcripts in mouse ganglionic eminences (GE) at different embryonic stages (from E12.5 to E18.5) (n=4 brains per stage). (**b**) Western blot analyses of mouse GE extracts showing similar expression of Kif21b protein from E14.5 to P2 (n=3 brains per stage). Data are represented as means ± s.e.m. Significance was calculated by one-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test, ns, non-significant.

Supplementary information

Supplementary Table 1: Statistics

References

1. Laguesse, S., Peyre, E. & Nguyen, L. Progenitor genealogy in the developing cerebral cortex. *Cell Tissue Res.* **359**, 17–32 (2015).
2. Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Menezes, J. R. L. & Macklis, J. D. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 427–437 (2007).
3. Ohtaka-Maruyama, C. & Okado, H. Molecular Pathways Underlying Projection Neuron Production and Migration during Cerebral Cortical Development. *Front. Neurosci.* **9**, (2015).
4. Peyre, E., Silva, C. G. & Nguyen, L. Crosstalk between intracellular and extracellular signals regulating interneuron production, migration and integration into the cortex. *Front Cell Neurosci* **9**, 129 (2015).
5. Hirokawa, N., Niwa, S. & Tanaka, Y. Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron* **68**, 610–638 (2010).
6. Hirokawa, N. & Tanaka, Y. Kinesin superfamily proteins (KIFs): Various functions and their relevance for important phenomena in life and diseases. *Exp. Cell Res.* **334**, 16–25 (2015).
7. Poirier, K. *et al.* Mutations in TUBG1, DYNC1H1, KIF5C and KIF2A cause malformations of cortical development and microcephaly. *Nat. Genet.* **45**, 639–647 (2013).
8. Makrythanasis, P. *et al.* Biallelic variants in KIF14 cause intellectual disability with microcephaly. *Eur. J. Hum. Genet.* **26**, 330–339 (2018).
9. Moawia, A. *et al.* Mutations of KIF14 cause primary microcephaly by impairing cytokinesis. *Ann. Neurol.* **82**, 562–577 (2017).
10. Reilly, M. L. *et al.* Loss of function mutations in KIF14 cause severe microcephaly and kidney development defects in humans and zebrafish. *Hum. Mol. Genet.* (2018). doi:10.1093/hmg/ddy381
11. 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).
12. Robitaille, J. M. *et al.* Phenotypic overlap between familial exudative vitreoretinopathy and microcephaly, lymphedema, and chorioretinal dysplasia caused by KIF11 mutations. *JAMA Ophthalmol* **132**, 1393–1399 (2014).
13. Konjikusic, M. J. *et al.* Mutations in Kinesin family member 6 reveal specific role in ependymal cell ciliogenesis and human neurological development. *PLoS Genet.* **14**, e1007817 (2018).
14. Cavallin, M. *et al.* Recurrent KIF2A mutations are responsible for classic lissencephaly. *Neurogenetics* **18**, 73–79 (2017).
15. Tian, G. *et al.* A patient with lissencephaly, developmental delay, and infantile spasms, due to de novo heterozygous mutation of KIF2A. *Mol Genet Genomic Med* **4**, 599–603 (2016).
16. Michels, S. *et al.* Mutations of KIF5C cause a neurodevelopmental disorder of infantile-onset epilepsy, absent language, and distinctive malformations of cortical development. *Am. J. Med. Genet. A* **173**, 3127–3131 (2017).
17. Cavallin, M. *et al.* Recurrent KIF5C mutation leading to frontal pachygyria without microcephaly. *Neurogenetics* **17**, 79–82 (2016).

18. Putoux, A. *et al.* KIF7 mutations cause fetal hydrolethalus and acrocallosal syndromes. *Nat. Genet.* **43**, 601–606 (2011).

19. Filges, I. *et al.* Exome sequencing identifies mutations in KIF14 as a novel cause of an autosomal recessive lethal fetal ciliopathy phenotype. *Clin. Genet.* **86**, 220–228 (2014).

20. Willemsen, M. H. *et al.* Involvement of the kinesin family members KIF4A and KIF5C in intellectual disability and synaptic function. *Journal of Medical Genetics* **51**, 487–494 (2014).

21. Alsahli, S. *et al.* KIF16B is a candidate gene for a novel autosomal-recessive intellectual disability syndrome. *Am. J. Med. Genet. A* **176**, 1602–1609 (2018).

22. Ibisler, A. *et al.* Novel KIF7 Mutation in a Tunisian Boy with Acrocallosal Syndrome: Case Report and Review of the Literature. *Mol Syndromol* **6**, 173–180 (2015).

23. Tomaselli, P. J. *et al.* A de novo dominant mutation in KIF1A associated with axonal neuropathy, spasticity and autism spectrum disorder. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **22**, 460–463 (2017).

24. Marszalek, J. R., Weiner, J. A., Farlow, S. J., Chun, J. & Goldstein, L. S. Novel dendritic kinesin sorting identified by different process targeting of two related kinesins: KIF21A and KIF21B. *J. Cell Biol.* **145**, 469–479 (1999).

25. Muhia, M. *et al.* The Kinesin KIF21B Regulates Microtubule Dynamics and Is Essential for Neuronal Morphology, Synapse Function, and Learning and Memory. *Cell Rep* **15**, 968–977 (2016).

26. Ghiretti, A. E. *et al.* Activity-Dependent Regulation of Distinct Transport and Cytoskeletal Remodeling Functions of the Dendritic Kinesin KIF21B. *Neuron* **92**, 857–872 (2016).

27. Labonté, D. *et al.* TRIM3 regulates the motility of the kinesin motor protein KIF21B. *PLoS ONE* **8**, e75603 (2013).

28. Lipka, J., Kapitein, L. C., Jaworski, J. & Hoogenraad, C. C. Microtubule-binding protein doublecortin-like kinase 1 (DCLK1) guides kinesin-3-mediated cargo transport to dendrites. *The EMBO Journal* **35**, 302–318 (2016).

29. van Riel, W. E. *et al.* Kinesin-4 KIF21B is a potent microtubule pausing factor. *Elife* **6**, (2017).

30. Gromova, K. V. *et al.* Neurobeachin and the Kinesin KIF21B Are Critical for Endocytic Recycling of NMDA Receptors and Regulate Social Behavior. *Cell Rep* **23**, 2705–2717 (2018).

31. Swarnkar, S., Avchalumov, Y., Raveendra, B. L., Grinman, E. & Puthanveettil, S. V. Kinesin Family of Proteins Kif11 and Kif21B Act as Inhibitory Constraints of Excitatory Synaptic Transmission Through Distinct Mechanisms. *Sci Rep* **8**, 17419 (2018).

32. Morikawa, M., Tanaka, Y., Cho, H.-S., Yoshihara, M. & Hirokawa, N. The Molecular Motor KIF21B Mediates Synaptic Plasticity and Fear Extinction by Terminating Rac1 Activation. *Cell Rep* **23**, 3864–3877 (2018).

33. Kannan, M. *et al.* WD40-repeat 47, a microtubule-associated protein, is essential for brain development and autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, E9308–E9317 (2017).

34. Leshchyns'ka, I. & Sytnyk, V. Isolation of Growth Cones from Mouse Brain. *BIO-PROTOCOL* **3**, (2013).

35. Dent, E. W., Gupton, S. L. & Gertler, F. B. The Growth Cone Cytoskeleton in Axon Outgrowth and Guidance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, (2011).

36. Matsuda, T. & Cepko, C. L. Controlled expression of transgenes introduced by in vivo electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 1027–1032 (2007).

37. Chu, H. M. A. *et al.* Kar3 interaction with Cik1 alters motor structure and function. *EMBO J.* **24**, 3214–3223 (2005).

38. Barrett, J. G., Manning, B. D. & Snyder, M. The Kar3p kinesin-related protein forms a novel heterodimeric structure with its associated protein Cik1p. *Mol. Biol. Cell* **11**, 2373–2385 (2000).

39. Bellion, A., Baudoin, J.-P., Alvarez, C., Bornens, M. & Métin, C. Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear. *J. Neurosci.* **25**, 5691–5699 (2005).

40. Nishimura, Y. V., Nabeshima, Y. & Kawauchi, T. Morphological and Molecular Basis of Cytoplasmic Dilation and Swelling in Cortical Migrating Neurons. *Brain Sci* **7**, (2017).

41. Tielens, S., Godin, J. D. & Nguyen, L. Real-time Recordings of Migrating Cortical Neurons from GFP and Cre Recombinase Expressing Mice. *Curr Protoc Neurosci* **74**, 3.29.1-23 (2016).

42. Godin, J. D. *et al.* p27(Kip1) is a microtubule-associated protein that promotes microtubule polymerization during neuron migration. *Dev. Cell* **23**, 729–744 (2012).

43. Stenman, J., Toresson, H. & Campbell, K. Identification of two distinct progenitor populations in the lateral ganglionic eminence: implications for striatal and olfactory bulb neurogenesis. *J. Neurosci.* **23**, 167–174 (2003).

44. Skarnes, W. C. *et al.* A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature* **474**, 337–342 (2011).

Figure 1

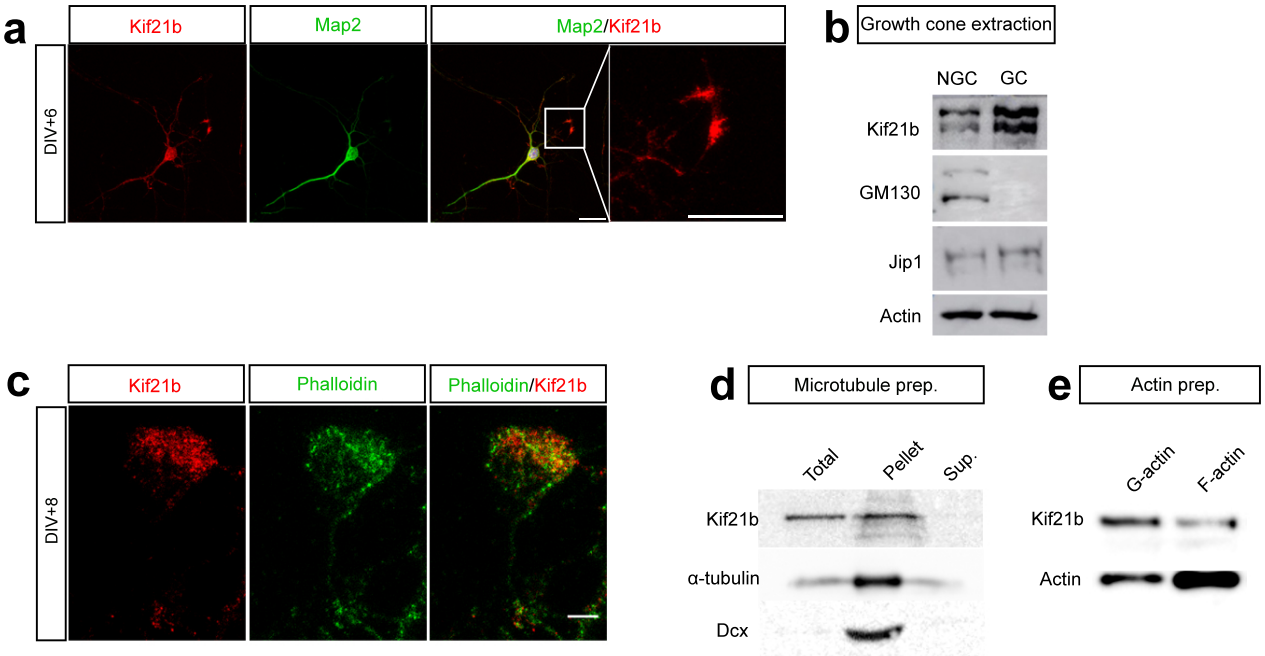

a
Kif21b
Map2
Map2/Kif21b
DIV+6
b
Growth cone extraction
NGC
GC
Kif21b
GM130
Jip1
Actin
c
Kif21b
Phalloidin
Phalloidin/Kif21b
DIV+8
d
Microtubule prep.
Total
Pellet
Sup.
Kif21b
α-tubulin
Dcx
e
Actin prep.
G-actin
F-actin
Kif21b
Actin

Figure 2

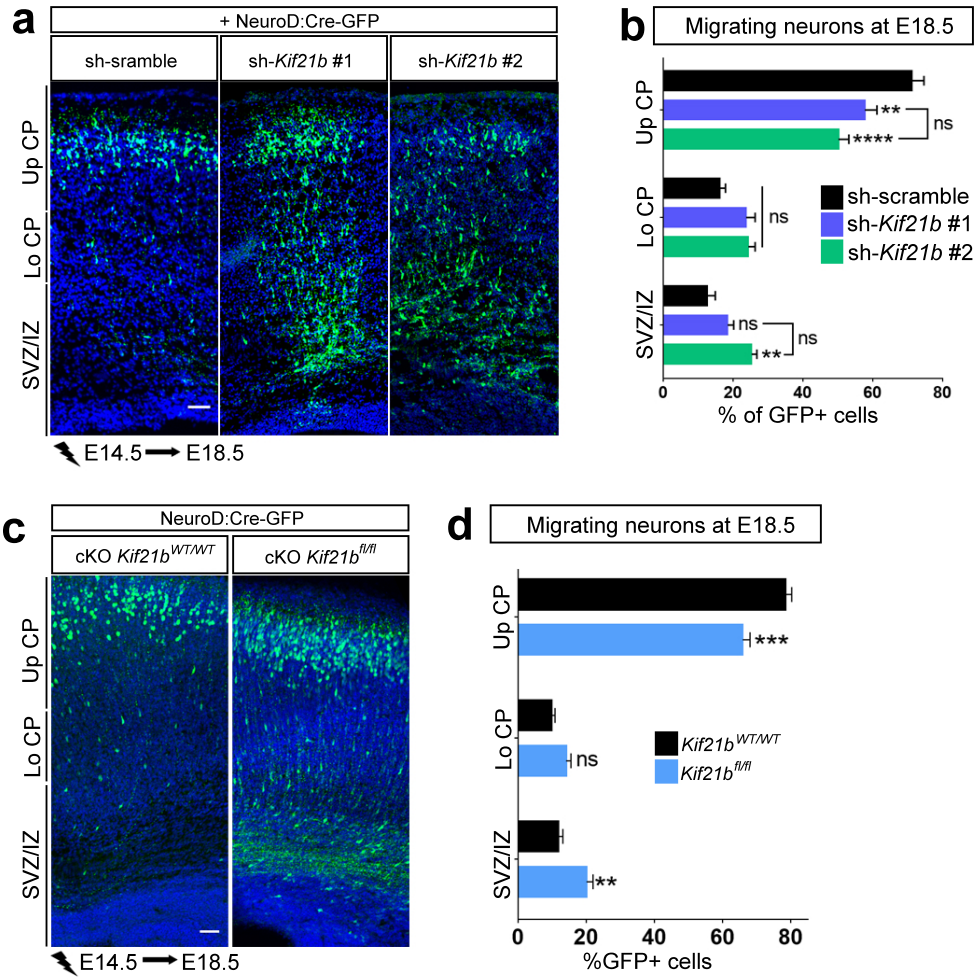

a
+ NeuroD:Cre-GFP
sh-sramble
sh-Kif21b #1
sh-Kif21b #2
Up CP
Lo CP
SVZ/IZ
E14.5 → E18.5
b
Migrating neurons at E18.5
Up CP
Lo CP
SVZ/IZ
**
****
ns
ns
ns
ns
sh-scramble
sh-Kif21b #1
sh-Kif21b #2
0
20
40
60
80
% of GFP+ cells
c
NeuroD:Cre-GFP
cKO Kif21b WT/WT
cKO Kif21b fl/fl
Up CP
Lo CP
SVZ/IZ
E14.5 → E18.5
d
Migrating neurons at E18.5
Up CP
Lo CP
SVZ/IZ
***
ns
**
Kif21b WT/WT
Kif21b fl/fl
0
20
40
60
80
%GFP+ cells

Figure 3

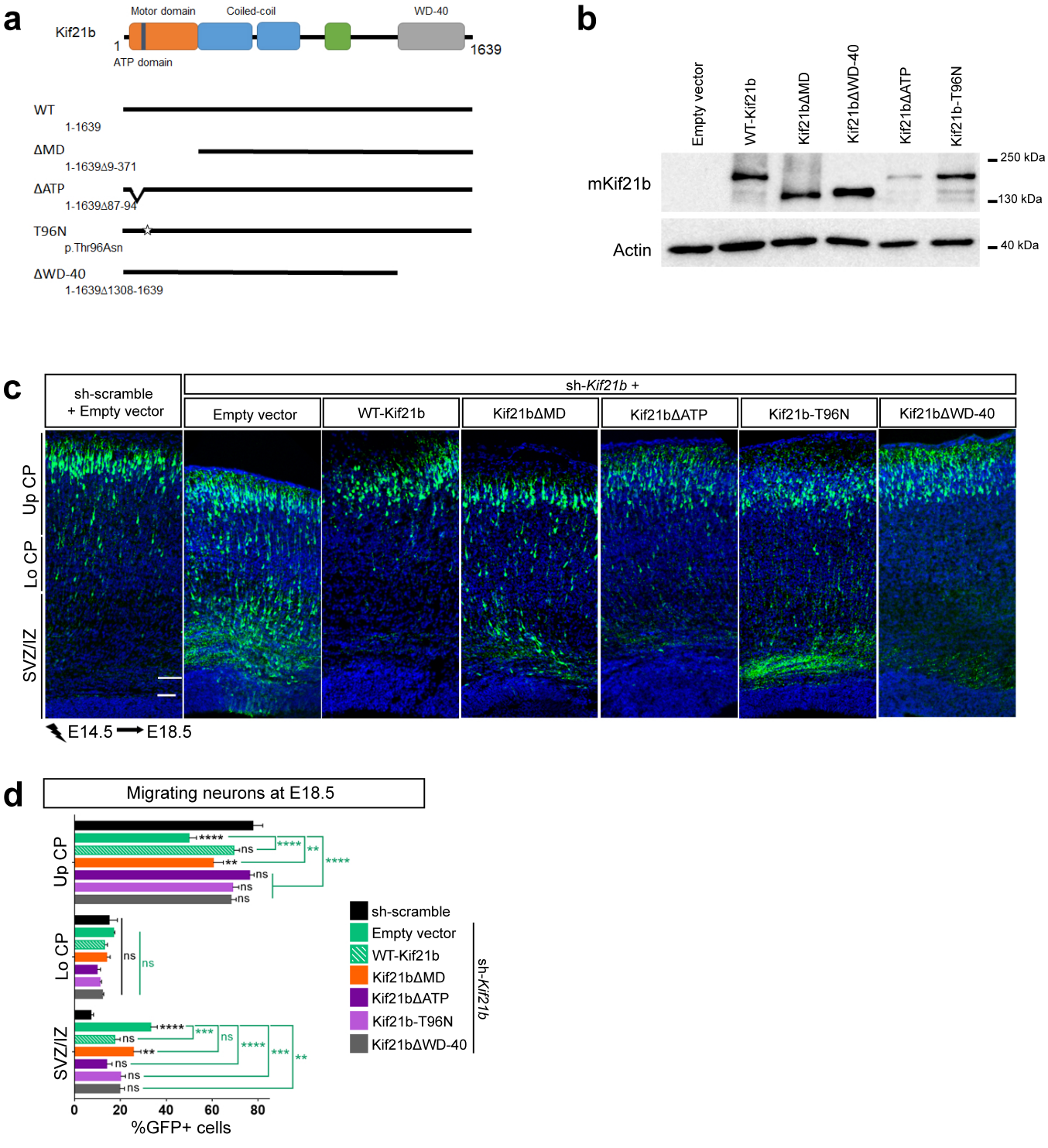

a
Kif21b
Motor domain
Coiled-coil
WD-40
1
1639
ATP domain
WT
1-1639
ΔMD
1-1639Δ9-371
ΔATP
1-1639Δ87-94
T96N
p.Thr96Asn
ΔWD-40
1-1639Δ1308-1639
b
Empty vector
WT-Kif21b
Kif21bΔMD
Kif21bΔWD-40
Kif21bΔATP
Kif21b-T96N
mKif21b
Actin
250 kDa
130 kDa
40 kDa
c
sh-scramble + Empty vector
sh-Kif21b +
Empty vector
WT-Kif21b
Kif21bΔMD
Kif21bΔATP
Kif21b-T96N
Kif21bΔWD-40
Up CP
Lo CP
SVZ/IZ
E14.5
E18.5
d
Migrating neurons at E18.5
Up CP
Lo CP
SVZ/IZ
sh-scramble
Empty vector
WT-Kif21b
Kif21bΔMD
Kif21bΔATP
Kif21b-T96N
Kif21bΔWD-40
sh-Kif21b
0
20
40
60
80
%GFP+ cells

Figure 4

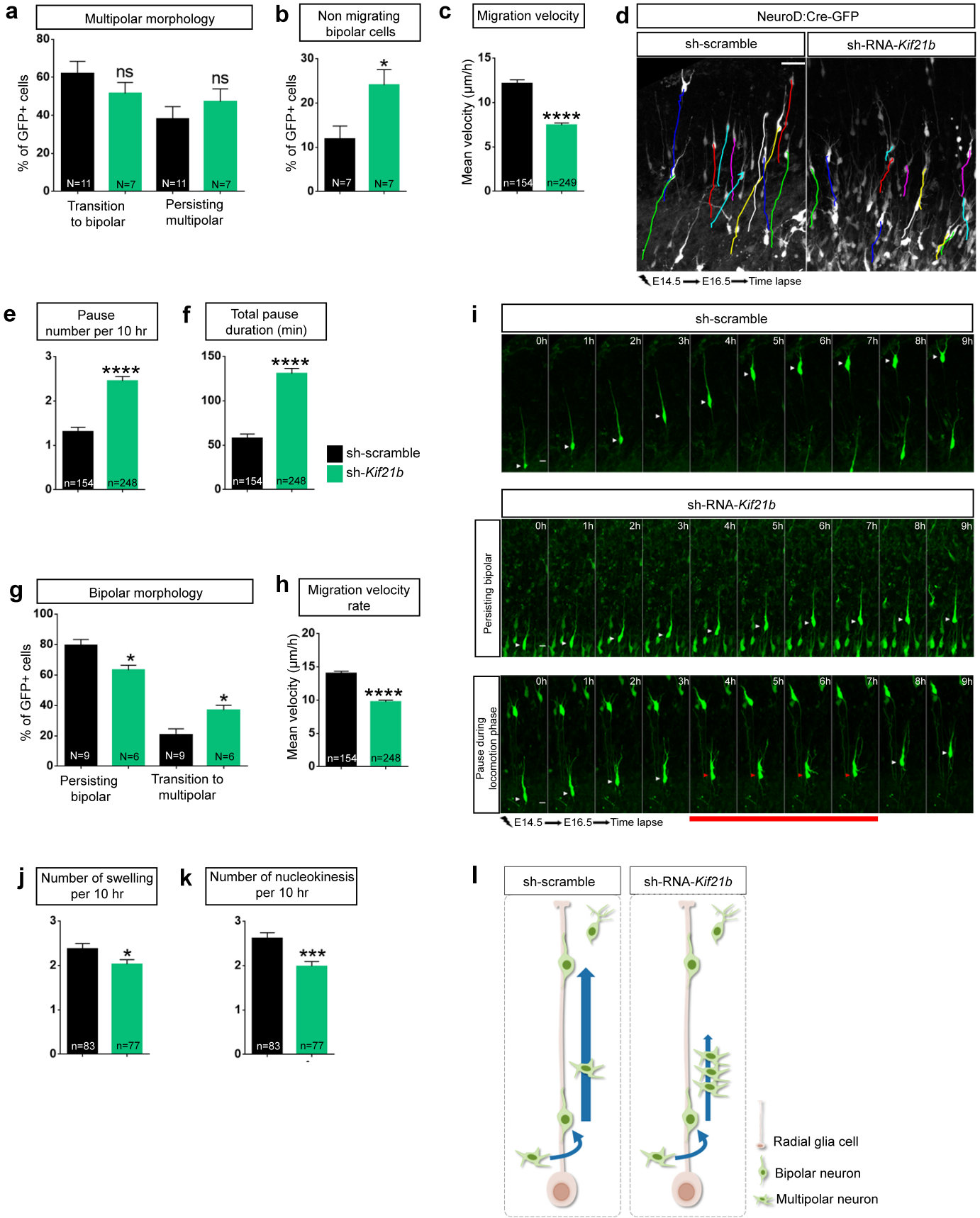
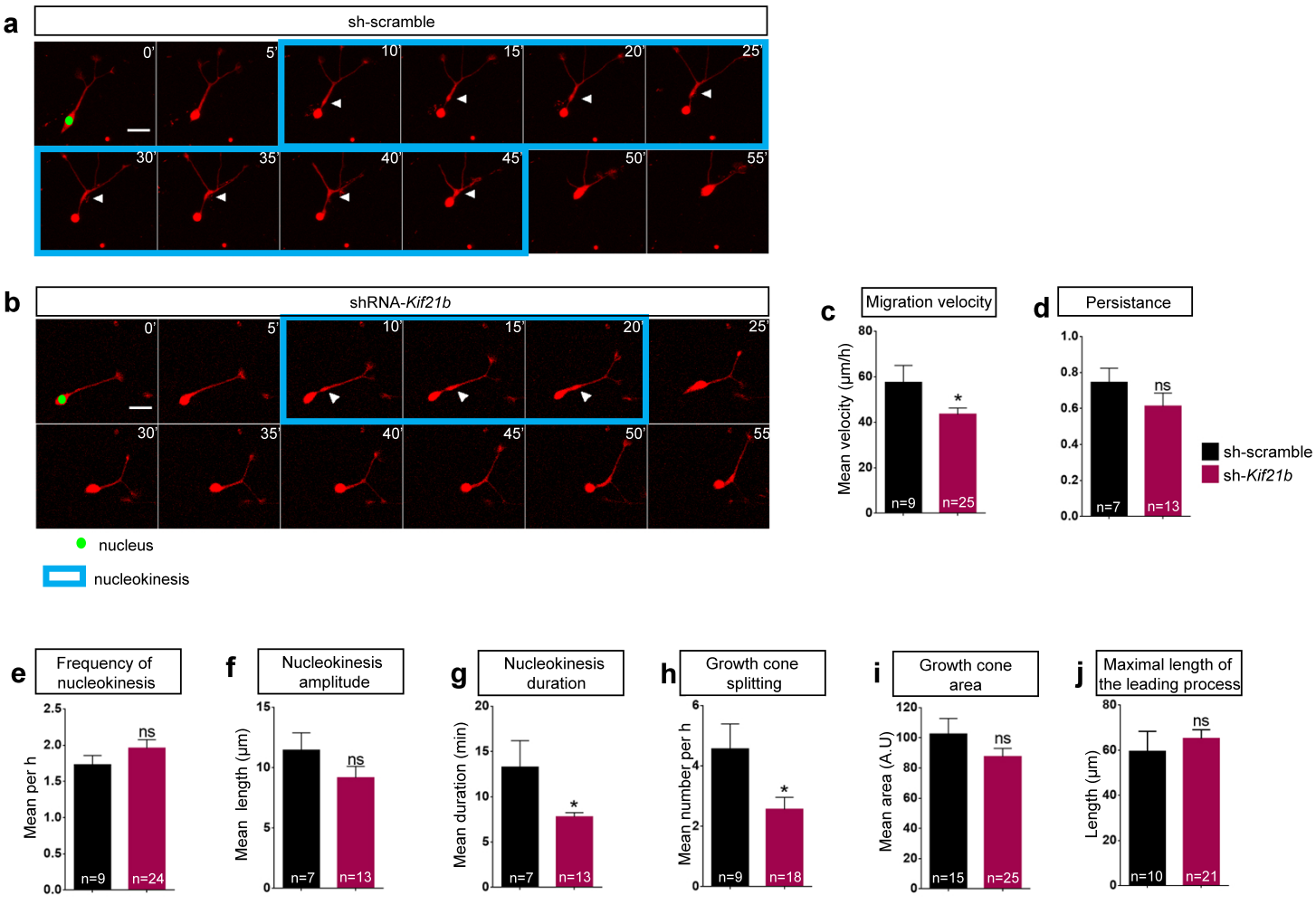
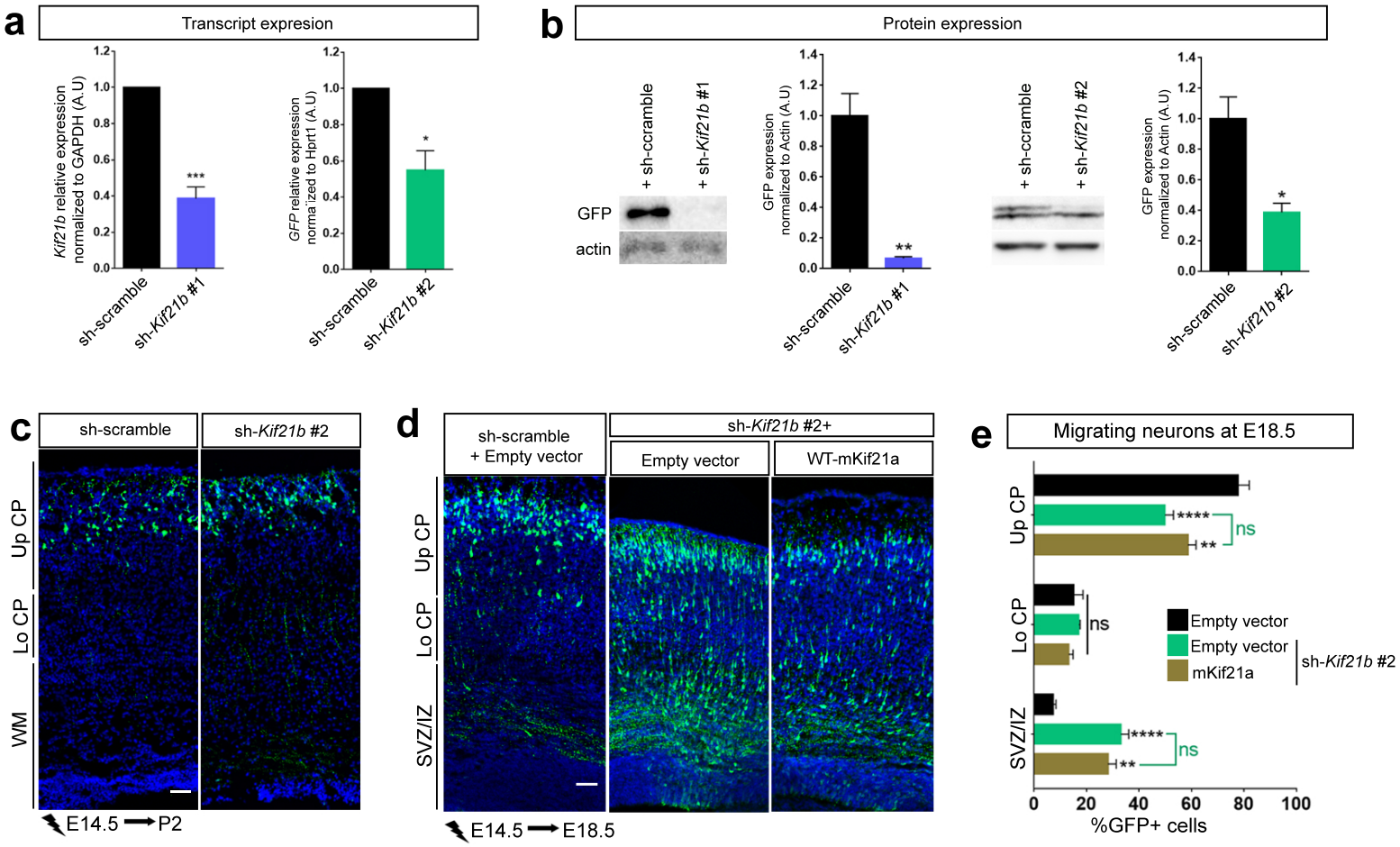

a
Multipolar morphology
% of GFP+ cells
ns
ns
N=11
N=7
N=11
N=7
Transition to bipolar
Persisting multipolar
b
Non migrating bipolar cells
% of GFP+ cells
*
N=7
N=7
c
Migration velocity
Mean velocity (µm/h)
****
n=154
n=249
d
NeuroD:Cre-GFP
sh-scramble
sh-RNA-Kif21b
E14.5 E16.5 Time lapse
e
Pause number per 10 hr
****
n=154
n=248
f
Total pause duration (min)
****
n=154
n=248
sh-scramble
sh-Kif21b
i
sh-scramble
0h 1h 2h 3h 4h 5h 6h 7h 8h 9h
sh-RNA-Kif21b
Persisting bipolar
Pause during locomotion phase
E14.5 E16.5 Time lapse
g
Bipolar morphology
% of GFP+ cells
*
*
N=9
N=6
N=9
N=6
Persisting bipolar
Transition to multipolar
h
Migration velocity rate
Mean velocity (µm/h)
****
n=154
n=248
j
Number of swelling per 10 hr
*
n=83
n=77
k
Number of nucleokinesis per 10 hr
***
n=83
n=77
l
sh-scramble
sh-RNA-Kif21b
Radial glia cell
Bipolar neuron
Multipolar neuron

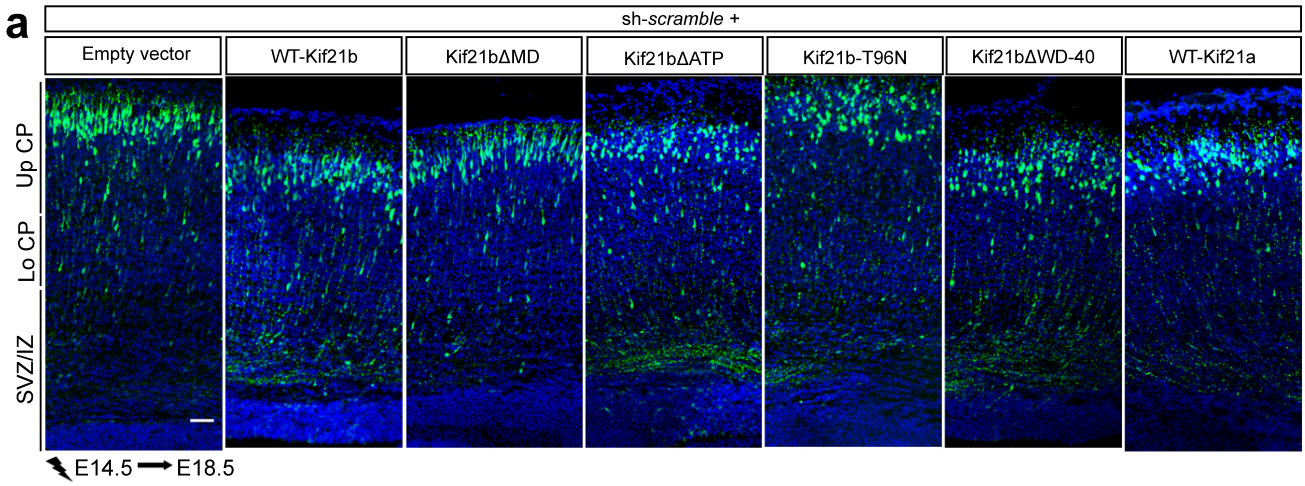
Figure 5

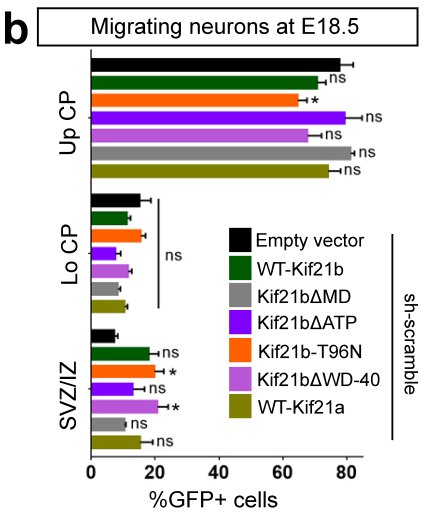

a
sh-scramble
0'
5'
10'
15'
20'
25'
30'
35'
40'
45'
50'
55'
b
shRNA-Kif21b
0'
5'
10'
15'
20'
25'
30'
35'
40'
45'
50'
55
nucleus
nucleokinesis
c
Migration velocity
Mean velocity (µm/h)
80
60
40
20
0
*
n=9
n=25
d
Persistance
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
ns
n=7
n=13
sh-scramble
sh-Kif21b
e
Frequency of nucleokinesis
Mean per h
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
ns
n=9
n=24
f
Nucleokinesis amplitude
Mean length (µm)
15
10
5
0
ns
n=7
n=13
g
Nucleokinesis duration
Mean duration (min)
20
15
10
5
0
*
n=7
n=13
h
Growth cone splitting
Mean number per h
6
4
2
0
*
n=9
n=18
i
Growth cone area
Mean area (A.U)
120
100
80
60
40
20
0
ns
n=15
n=25
j
Maximal length of the leading process
Length (µm)
80
60
40
20
0
ns
n=10
n=21

Supplementary Figure 1

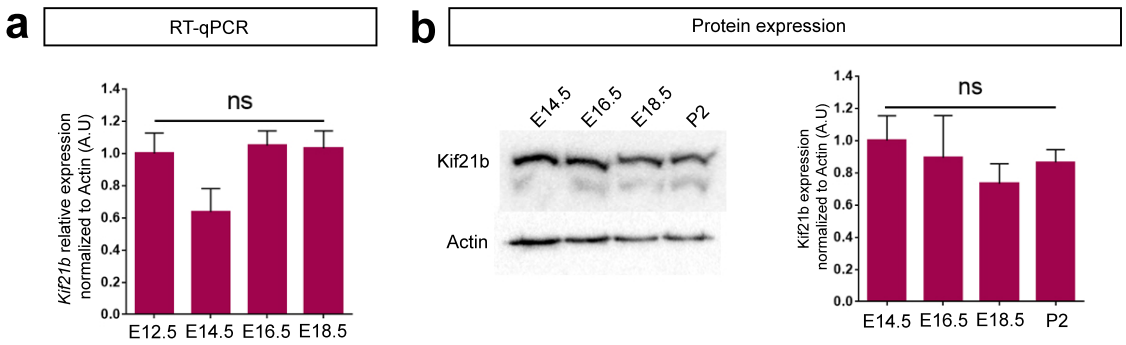


Supplementary Figure 2





Supplementary Figure 3



Statistic Table - Figures

Article 2 The Kif21b kinesin is a major effector of mouse neuronal migration during corticogenesis

panel **Figure 2**

b **Anova Table - 2 way Anova**

Number of families	3				
Number of comparisons per family	3				
Alpha	0,05				
Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
SVZ/IZ					
sh-scramble vs. sh-Kif21b #1	-5,92	-14,9 to 3,05	No	ns	0,3283
sh-scramble vs. sh-Kif21b #2	-12,8	-21,5 to -4,08	Yes	**	0,0018
sh-Kif21b #1 vs. sh-Kif21b #2	-6,89	-15,3 to 1,53	No	ns	0,1451
lower CP					
sh-scramble vs. sh-Kif21b #1	-7,58	-16,5 to 1,38	No	ns	0,1243
sh-scramble vs. sh-Kif21b #2	-8,25	-17,0 to 0,475	No	ns	0,0698
sh-Kif21b #1 vs. sh-Kif21b #2	-0,665	-9,08 to 7,75	No	ns	> 0,9999
Upper CP					
sh-scramble vs. sh-Kif21b #1	13,5	4,54 to 22,5	Yes	**	0,0013
sh-scramble vs. sh-Kif21b #2	21,1	12,3 to 29,8	Yes	****	< 0,0001
sh-Kif21b #1 vs. sh-Kif21b #2	7,55	-0,861 to 16,0	No	ns	0,0927

d **Anova Table - 2 way Anova**

Number of families	1				
Number of comparisons per family	3				
Alpha	0,05				
Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Kif21b WT/WT vs. Kif21b fl/fl					
svz iz	-8,206	-14,58 to -1,828	Yes	**	0,0092
lo cp	-4,282	-10,66 to 2,096	No	ns	0,2861
up cp	12,49	6,110 to 18,87	Yes	***	0,0001

panel **Figure 3**

d **Anova Table - 2 way Anova**

Number of families	3				
Number of comparisons per family	8				
Alpha	0,05				
Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
SVZ/IZ					
sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-Kif21b + NeuroD empty	-25,9	-39,7 to -12,1	Yes	****	< 0,0001
sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-Kif21b + NeuroD-Kif21b-WT	-10,3	-24,9 to 4,32	No	ns	0,3968
sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-Kif21b + NeuroD Kif21b Δ MD	-18,4	-32,2 to -4,60	Yes	**	0,0026
sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-Kif21b + NeuroD Kif21b-ΔWD-40	-12,5	-27,1 to 2,14	No	ns	0,149
sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-Kif21b + NeuroD Kif21b-ΔATP	-6,76	-22,2 to 8,71	No	ns	> 0,9999
sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-Kif21b + NeuroD-Kif21b T96N	-12,9	-26,4 to 0,580	No	ns	0,0698
sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-Kif21b + NeuroD KIF21a WT	-21	-36,4 to -5,48	Yes	**	0,0021
lower CP					
sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-Kif21b + NeuroD empty	-1,95	-15,8 to 11,8	No	ns	> 0,9999
sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-Kif21b + NeuroD-Kif21b-WT	1,97	-12,7 to 16,6	No	ns	> 0,9999
sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-Kif21b + NeuroD Kif21b Δ MD	1,09	-12,7 to 14,9	No	ns	> 0,9999
sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-Kif21b + NeuroD Kif21b-ΔWD-40	2,91	-11,7 to 17,5	No	ns	> 0,9999
sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-Kif21b + NeuroD Kif21b-ΔATP	5,2	-10,3 to 20,7	No	ns	> 0,9999
sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-Kif21b + NeuroD-Kif21b T96N	4,07	-9,41 to 17,6	No	ns	> 0,9999
sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-Kif21b + NeuroD KIF21a WT	1,88	-13,6 to 17,3	No	ns	> 0,9999
Upper CP					
sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-Kif21b + NeuroD empty	27,8	14,0 to 41,6	Yes	****	< 0,0001
sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-Kif21b + NeuroD-Kif21b-WT	8,33	-6,29 to 23,0	No	ns	0,857
sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-Kif21b + NeuroD Kif21b Δ MD	17,3	3,51 to 31,1	Yes	**	0,0056
sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-Kif21b + NeuroD Kif21b-ΔWD-40	9,56	-5,06 to 24,2	No	ns	0,5361
sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-Kif21b + NeuroD Kif21b-ΔATP	1,56	-13,9 to 17,0	No	ns	> 0,9999
sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-Kif21b + NeuroD-Kif21b T96N	8,83	-4,65 to 22,3	No	ns	0,5343
sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-Kif21b + NeuroD KIF21a WT	19,1	3,61 to 34,6	Yes	**	0,0068
SVZ/IZ					

sh-Kif21b + NeuroD empty vs. sh-Kif21b + NeuroD-Kif21b-WT	15,6	5,35 to 25,8	Yes	***		0,0004
sh-Kif21b + NeuroD empty vs. sh-Kif21b + NeuroD Kif21b Δ MD	7,49	-1,54 to 16,5	No	ns		0,1761
sh-Kif21b + NeuroD empty vs. sh-Kif21b + Kif21b-ΔWD-40	13,4	3,17 to 23,7	Yes	**		0,0033
sh-Kif21b + NeuroD empty vs. sh-Kif21b + Kif21b-ΔATP	19,1	7,70 to 30,6	Yes	****	< 0,0001	
sh-Kif21b + NeuroD empty vs. sh-Kif21b + NeuroD-Kif21b T96N	13	4,46 to 21,5	Yes	***		0,0004
sh-Kif21b + NeuroD empty vs. sh-scramble + NeuroD-empty	25,9	12,1 to 39,7	Yes	****	< 0,0001	
sh-Kif21b + NeuroD empty vs. sh-Kif21b Kif21b + NeuroD KIF21a WT	4,94	-6,49 to 16,4	No	ns	> 0,9999	
lower CP						
sh-Kif21b + NeuroD empty vs. sh-Kif21b + NeuroD-Kif21b-WT	3,92	-6,32 to 14,2	No	ns	> 0,9999	
sh-Kif21b + NeuroD empty vs. sh-Kif21b + NeuroD Kif21b Δ MD	3,04	-5,99 to 12,1	No	ns	> 0,9999	
sh-Kif21b + NeuroD empty vs. sh-Kif21b + Kif21b-ΔWD-40	4,87	-5,38 to 15,1	No	ns	> 0,9999	
sh-Kif21b + NeuroD empty vs. sh-Kif21b + Kif21b-ΔATP	7,15	-4,27 to 18,6	No	ns		0,6297
sh-Kif21b + NeuroD empty vs. sh-Kif21b + NeuroD-Kif21b T96N	6,03	-2,51 to 14,6	No	ns		0,3928
sh-Kif21b + NeuroD empty vs. sh-scramble + NeuroD-empty	1,95	-11,8 to 15,8	No	ns	> 0,9999	
sh-Kif21b + NeuroD empty vs. sh-Kif21b Kif21b + NeuroD KIF21a WT	3,83	-7,60 to 15,3	No	ns	> 0,9999	
Upper CP						
sh-Kif21b + NeuroD empty vs. sh-Kif21b + NeuroD-Kif21b-WT	-19,5	-29,8 to -9,27	Yes	****	< 0,0001	
sh-Kif21b + NeuroD empty vs. sh-Kif21b + NeuroD Kif21b Δ MD	-10,5	-19,6 to -1,50	Yes	*		0,0125
sh-Kif21b + NeuroD empty vs. sh-Kif21b + Kif21b-ΔWD-40	-18,3	-28,5 to -8,04	Yes	****	< 0,0001	
sh-Kif21b + NeuroD empty vs. sh-Kif21b + Kif21b-ΔATP	-26,3	-37,7 to -14,9	Yes	****	< 0,0001	
sh-Kif21b + NeuroD empty vs. sh-Kif21b + NeuroD-Kif21b T96N	-19	-27,6 to -10,5	Yes	****	< 0,0001	
sh-Kif21b + NeuroD empty vs. sh-scramble + NeuroD-empty	-27,8	-41,6 to -14,0	Yes	****	< 0,0001	
sh-Kif21b + NeuroD empty vs. sh-Kif21b Kif21b + NeuroD KIF21a WT	-8,77	-20,2 to 2,66	No	ns		0,2667

panel	**Figure 4**		
a	**Multipolar morphology - Transition MP to BP**		
	Column B	sh-Kif21b	
	vs.	vs,	
	Column A	sh-scramble	
	Unpaired t test		
	P value		0,2798
	P value summary	ns	
	Significantly different? (P < 0.05)	No	
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	
	t, df	t=1,128 df=13	
	Multipolar morphology - persisting MP		
	Column B	sh-Kif21b	
	vs.	vs,	
	Column A	sh-scramble	
	Unpaired t test		
	P value		0,3585
	P value summary	ns	
	Significantly different? (P < 0.05)	No	
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	
	t, df	t=0,9519 df=13	
b	**immobilized BP cells**		
	Column B	sh-scramble	
	vs.	vs,	
	Column A	sh-Kif21b	
	Unpaired t test		
	P value		0,0199
	P value summary	*	
	Significantly different? (P < 0.05)	Yes	
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	
	t, df	t=2,684 df=12	
c	**Migration velocity (µm/h)**		
	Column B	sh-scramble	
	vs.	vs,	
	Column A	sh-Kif21b	
	Unpaired t test		
	P value	< 0,0001	
	P value summary	****	
	Significantly different? (P < 0.05)	Yes	
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	
	t, df	t=10,69 df=401	

e **Mean pause number per 10h**

Column B	sh-Kif21b
vs.	vs,
Column A	sh-scramble
Unpaired t test	
P value	< 0,0001
P value summary	****
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=7,674 df=400

f **Total pause duration (min)**

Column B	sh-Kif21b
vs.	vs,
Column A	sh-scramble
Unpaired t test	
P value	< 0,0001
P value summary	****
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=8,695 df=400

g **Bipolar morphology - persisting BP**

Column B	sh-Kif21b
vs.	vs,
Column A	sh-scramble
Unpaired t test	
P value	0,0102
P value summary	*
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2,913 df=16

Bipolar morphology - Transition BP to MP

Column B	sh-Kif21b
vs.	vs,
Column A	sh-scramble
Unpaired t test	
P value	0,0102
P value summary	*
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2,91 df=16

h **Migration velocity rate (µm/h)**

Column B	sh-Kif21b
vs.	vs,
Column A	sh-scramble
Unpaired t test	
P value	< 0,0001
P value summary	****
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=9,796 df=400

j **Swelling number per 10h**

Column B	sh-Kif21b
vs.	vs,
Column A	sh-scramble
Unpaired t test	
P value	0,0312
P value summary	*
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2,173 df=158

k **Nucleokinesis number per 10h**

	Column B	sh-Kif21b	
	vs.	vs,	
	Column A	sh-scramble	
	Unpaired t test		
	P value		0,0002
	P value summary	***	
	Significantly different? (P < 0.05)	Yes	
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	
	t, df	t=3,772 df=158	
panel	**Figure 5**		
c	**migration velocity µm/h**		
	Column B	sh-Kif21b	
	vs.	vs,	
	Column A	sh-scramble	
	Unpaired t test		
	P value		0,0393
	P value summary	*	
	Significantly different? (P < 0.05)	Yes	
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	
	t, df	t=2,149 df=32	
d	**persistance**		
	Column B	sh-Kif21b	
	vs.	vs,	
	Column A	sh-scramble	
	Unpaired t test		
	P value		0,2726
	P value summary	ns	
	Significantly different? (P < 0.05)	No	
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	
	t, df	t=1,132 df=18	
	Non migrating BP cells		
e	**Number of nucleokinesis**		
	Column B	sh-Kif21b	
	vs.	vs,	
	Column A	sh-scramble	
	Unpaired t test		
	P value		0,2875
	P value summary	ns	
	Significantly different? (P < 0.05)	No	
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	
	t, df	t=1,082 df=31	
f	**Amplitude of nucleokinesis**		
	Column B	sh-Kif21b	
	vs.	vs,	
	Column A	sh-scramble	
	Unpaired t test		
	P value		0,191
	P value summary	ns	
	Significantly different? (P < 0.05)	No	
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	
	t, df	t=1,359 df=18	
g	**Nucleokinesis duration**		
	Column B	sh-Kif21b	
	vs.	vs,	
	Column A	sh-scramble	
	Unpaired t test		
	P value		0,0243
	P value summary	*	
	Significantly different? (P < 0.05)	Yes	
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed	
	t, df	t=2,458 df=18	

h **Number of growth cone splitting**

Column A	sh-scramble	
vs.	vs,	
Column B	sh-Kif21b	
Unpaired t test		
P value		0,0221
P value summary	*	
Significantly different? (P < 0.05)	Yes	
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	
t, df	t=2,441 df=25	

i **Maximal growth cone area**

Column A	sh-scramble	
vs.	vs,	
Column B	sh-Kif21b	
Unpaired t test		
P value		0,2314
P value summary	ns	
Significantly different? (P < 0.05)	No	
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	
t, df	t=1,222 df=29	

j **maximal lenght of the leading process**

Column A	sh-scramble	
vs.	vs,	
Column B	sh-Kif21b	
Unpaired t test		
P value		0,5011
P value summary	ns	
Significantly different? (P < 0.05)	No	
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	
t, df	t=0,6814 df=29	

Statistic Table - Supplementary Figures

Article 2 The Kif21b kinesin is a major effector of mouse neuronal migration during corticogenesis

panel	Supplementary Figure 1					
a	Column B	KIF21B-shRNA#1				
	vs.	vs,				
	Column A	sh-scramble				
	Unpaired t test					
	P value	0,0041				
	P value summary	**				
	Significantly different? (P < 0.05)	Yes				
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed				
	t, df	t=4,50 df=6				
	Column A	sh-scramble				
	vs.	vs,				
	Column B	KIF21B-shRNA#2				
	Unpaired t test					
	P value	0,014				
	P value summary	*				
	Significantly different? (P < 0.05)	Yes				
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed				
	t, df	t=4,17 df=4				
b	Column A	sh-scramble + mKIF21B				
	vs.	vs,				
	Column B	sh-Kif21b#1 + mKif21b				
	Unpaired t test					
	P value	0,003				
	P value summary	**				
	Significantly different? (P < 0.05)	Yes				
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed				
	t, df	t=6,419 df=4				
	Column A	sh-scramble + mKIF21B				
	vs.	vs,				
	Column B	sh-Kif21b#2 + mKif21b				
	Unpaired t test					
	P value	0,0164				
	P value summary	*				
	Significantly different? (P < 0.05)	Yes				
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed				
	t, df	t=3,977 df=4				
e	**Please refer to Figure 3, panel d**					

panel	Supplementary Figure 2				
b	Number of families	3			
	Number of comparisons per family	7			
	Alpha	0,05			
	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff, Significant?	Summary	Adjusted P Value
	SVZ/IZ				
	sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-scramble + NeuroD-Kif21b-WT	-10,9	-22,3 to 0,556 No	ns	0,0712
	sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-scramble + NeuroD Kif21b-ΔWD-40	-3,21	-16,7 to 10,3 No	ns	> 0,9999
	sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-scramble + NeuroD Kif21b-ΔATP	-5,83	-19,4 to 7,71 No	ns	> 0,9999
	sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-scramble + NeuroD Kif21b Δ MD	-12,6	-24,7 to -0,473 Yes	*	0,0373
	sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-scramble + NeuroD-Kif21b T96N	-13,5	-25,7 to -1,44 Yes	*	0,0201
	sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-scramble + NeuroD KIF21a WT	-8,09	-21,6 to 5,45 No	ns	0,6534
	lower CP				
	sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-scramble + NeuroD-Kif21b-WT	3,83	-7,61 to 15,3 No	ns	> 0,9999
	sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-scramble + NeuroD Kif21b-ΔWD-40	6,74	-6,79 to 20,3 No	ns	> 0,9999
	sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-scramble + NeuroD Kif21b-ΔATP	7,56	-5,97 to 21,1 No	ns	0,8001
	sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-scramble + NeuroD Kif21b Δ MD	-0,445	-12,6 to 11,7 No	ns	> 0,9999
	sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-scramble + NeuroD-Kif21b T96N	3,55	-8,55 to 15,7 No	ns	> 0,9999
	sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-scramble + NeuroD KIF21a WT	4,59	-8,95 to 18,1 No	ns	> 0,9999
	Upper CP				
	sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-scramble + NeuroD-Kif21b-WT	7,05	-4,39 to 18,5 No	ns	0,5903
	sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-scramble + NeuroD Kif21b-ΔWD-40	-3,54	-17,1 to 10,0 No	ns	> 0,9999
	sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-scramble + NeuroD Kif21b-ΔATP	-1,74	-15,3 to 11,8 No	ns	> 0,9999
	sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-scramble + NeuroD Kif21b Δ MD	13	0,918 to 25,1 Yes	*	0,0282
	sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-scramble + NeuroD-Kif21b T96N	9,99	-2,12 to 22,1 No	ns	0,1688
	sh-scramble + NeuroD-empty vs. sh-scramble + NeuroD KIF21a WT	3,5	-10,0 to 17,0 No	ns	> 0,9999

panel	Supplementary Figure 3
a	**One-way anova table**

	Number of families	1		
	Number of comparisons per family	6		
	Alpha	0,05		
	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff, Significant?	Summary
	E12 vs. E14	0,3628	-0,2038 to 0,9: No	ns
	E12 vs. E16	-0,049	-0,6156 to 0,5 No	ns
	E12 vs. E18	-0,0325	-0,5991 to 0,5: No	ns
	E14 vs. E16	-0,4118	-0,9363 to 0,1 No	ns
	E14 vs. E18	-0,3953	-0,9198 to 0,1: No	ns
	E16 vs. E18	0,0165	-0,5080 to 0,5· No	ns
b	**One-way anova table**			
	Number of families	1		
	Number of comparisons per family	6		
	Alpha	0,05		
	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff, Significant?	Summary
	E14 vs. E16	0,1068	-0,6440 to 0,8! No	ns
	E14 vs. E18	0,2684	-0,4824 to 1,0 No	ns
	E14 vs. P2	0,1361	-0,6148 to 0,8! No	ns
	E16 vs. E18	0,1616	-0,5892 to 0,9 No	ns
	E16 vs. P2	0,02924	-0,7216 to 0,7! No	ns
	E18 vs. P2	-0,1324	-0,8832 to 0,6 No	ns

Résultats préliminaires

Characterisation of the *Kif21b* knock-out mice

Laure Asselin[1,2,3,4], Peggy Tilly[1,2,3,4], Chrystelle Po[5], Marie-Christine Fisher[1,2,3,4], Binnaz Yalcin[1,2,3,4] and Juliette D. Godin[1,2,3,4].

1. Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France.
2. Centre National de la Recherche Scientifique, UMR7104, Illkirch, France.
3. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM, U1258, Illkirch, France.
4. Université de Strasbourg, Strasbourg, France.
5. ICube, Université de Strasbourg, CNRS, FMTS, Strasbourg, France.

Rational

Previous work revealed that *Kif21b* homozygous (*Kif21b*$^{-/-}$) knock-out (KO) young adult mice display severe brain malformations at postnatal day 120 (P120)[1]. Those brain malformations include a microcephaly (overall reduced brain size), a reduced cortical thickness, an hydrocephaly (ventricle enlargement) and a dysgenesis of the corpus callosum (CC)[1]. In order to decipher the onset of these neurodevelopmental abnormalities, we examine the brain anatomy of *Kif21b*$^{-/-}$ at earlier developmental stages, E18.5 and P7. We also included heterozygous (*Kif21b*$^{+/-}$) mice in our pipeline since brain morphology has never been characterize for this genotype. To minimize environmental and genetic variation, mice were analysed according to their gender, on the same genetic background C57 black 6N (C57BL/6N) as previously reported[1].

We present here the first results obtained at P7 for both genotypes. We show that *Kif21b*$^{-/-}$ KO display smaller commissures and a slight decrease of several brain areas but no microcephaly. Surprisingly, *Kif21b*$^{+/-}$ KO display a global enlargement of the brain (macrocephaly) and an increased size of almost all brain regions. Although we did not detect any significant differences between male and female for both genotypes, brain defects were slightly more severe and broader in female compared to males.

To investigate in more details the CC defects reported in *Kif21b*$^{-/-}$ KO mice[1], we initiated magnetic resonance imaging (MRI) experiments of P120 female mice for both genotypes. MRI revealed a severe disorganization of the white matter (WM) within this structure that seems to be associated with an axonal demyelination, in *Kif21b*$^{-/-}$ KO mice.

Results

Kif21b$^{-/-}$ KO mice do not show a clear microcephaly at P7 but smaller axonal commissures, hippocampus and colliculi.

We examined brains of both males and females using an adaptation a newly developed pipeline for the histo-phenotyping of parasagittal section of mouse brains[2]. We quantified 166 brain parameters across 22 distinct brain structures (**Supplementary Table 1** and **Supplementary Figure 1**) which consisted of a systematic quantification of the same sagittal brain region at Lateral +0.64 mm (raw data provided in **Supplementary Table 2** for males and **Supplementary Table 3** for females). Our approach is down to cell level resolution (see an example in **Supplementary Figure 2**) and blind to the genotype.

We identified an overall tendency for assessed brain parameters to be reduced in sizes when compared to matched WT, in both male and female *Kif21b*$^{-/-}$ mice (**Figure 1A**). The total brain area was slightly smaller in male and female *Kif21b*$^{-/-}$ mice (by 6.4% and 8.4%, respectively), however these changes were not statistically significant. Nevertheless, three brain structures (the commissures, the hippocampus and the colliculi) reached the significance threshold of less than 0.05 and affected both male and female *Kif21b*$^{-/-}$ mice (**Figure 1A**) (two-tailed Student t-test). For example, the size of the anterior commissure was reduced by 23% (P=0.016) in *Kif21b*$^{-/-}$ males and the height of the corpus callosum by 30.3% (P=0.004) in *Kif21b*$^{-/-}$ females. The length of the dentate gyrus was smaller both in male and female *Kif21b*$^{-/-}$ mice (-21.5%, P=0.00072; -15.4%, P=0.031; respectively). Finally, the area of the inferior colliculus was decreased in size by -22.5% (P=0.016) in *Kif21b*$^{-/-}$ males and the area of the superior colliculus by -13.4% (P=0.011) in *Kif21b*$^{-/-}$ females.

To investigate the impact of *Kif21b* gene dosage on brain anatomy, we also assessed *Kif21b*$^{+/-}$ KO mice at P7, both in males and in females, using the same approach than the one used for homozygous mice. Unexpectedly, we detected severe brain defects throughout the whole brain, equally affecting male and female *Kif21*$^{+/-}$ mice (**Figure 1B**). Almost all assessed brain regions were significantly larger when compared to matched WT. For males, the average increase in size was +22.3% and for females +24.3%. For example, the area of the cortex was enlarged by 22.3% (P=0.006) in *Kif21*$^{+/-}$ male mice and by 24.9% (P=0.003) in *Kif21*$^{+/-}$ female mice. Consistently, the area of the CC was larger by 27.6% (P=0.001) in male and by 19.5% (P=0.019) in female *Kif21*$^{+/-}$ mice, and the size of the hippocampus by 34.9% (P=0.004) in male and by 32% (P=0.0002) in female *Kif21*$^{+/-}$ mice.

Taken together, these results suggest that *Kif21b* regulates brain morphology in a highly dosage dependent manner, both in male and female mice.

MRI reveal a severe white matter disorganisation of the corpus callosum, associated with axonal demyelination in *Kif21b*$^{-/-}$ KO mice at P120.

Given the CC defects observed in P120 *Kif21b*$^{-/-}$ mice[1], we turned to the investigation of fiber tracts morphology, using magnetic resonance imaging (MRI) in living animals. Live MRI is a non-invasive imaging tool with excellent penetration depth that avoids the confounding problem of artifacts from tissue shrinkage or distortion from tissue fixation and embedding[3].

We used diffusion tensor imaging (DTI) to detect white matter (WM) changes. DTI enable to discriminate between grey matter (GM), mostly composed of neuronal cell bodies and WM, mostly composed of myelinated axonal tracts. Fractional anisotropy (FA), which reflects the axonal integrity, have been widely used to detect a variety of WM injuries such as fiber density impairment or myelination defects[4]. Typical FA maps of all genotypes are shown in **Figure 2A**. Bright structures correspond to fiber bundles of WM and dark structures correspond to GM and ventricles. FA value within the CC is significantly decreased by 16.4% in *Kif21b*$^{-/-}$ compared to WT (**Figure 2B**), indicating an overall WM disorganization of this structure (**Figure 2A,** green arrowhead **and C**, white arrowheads). We also observed WM defects within the median preoptic nucleus (MnPO) that lies in the midline along the rostral edge of the third ventricle (**Figure 2A,** red arrowhead). Dorsal fornix integrity also seemed to be impaired in *Kif21b*$^{-/-}$ mice (**Figure 2C,** orange arrowhead). As WM is largely composed of myelinated axons, we then assessed WM integrity within the CC, using DTI-based axial (Dax) and radial (Drad) diffusivity procedures, which measure water diffusion parallel and perpendicular to axonal bundles, indicating axonal and myelin status, respectively[5–7]. Drad (that illustrates myelin status in axons) is increased by 13.5% in *Kif21b*$^{-/-}$ (**Figure 2D**) and Dax (that illustrates axon integrity) is decreased by 5% (**Figure 2E**). Thus, WM abnormalities observed in CC of Kif21b$^{-/-}$, are most likely due to demyelination of axons rather than axonal damages.

Although we did not observe any significant change in FA values in *Kif21b*$^{+/-}$ mice compared to WT (**Figure 2B**), we did observed a slight reduction of CC tract fibers (**Figure 2C**) and a slight axonal demyelination (**Figure 2D**). Altogether, MRI experiments revealed that CC does not seem to be impaired *Kif21b*$^{+/-}$ mice.

Intriguingly, while *Kif21b*$^{-/-}$ males mice display a microcephaly and hydrocephaly at P120[1], we did not observed any brain or ventricle volume defects for both *Kif21b*$^{-/-}$ and *Kif21b*$^{+/-}$ female mice by MRI (**Figure 2F**).

These results could be explained by the fact that MRI-based imaging are less sensitive than neuroanatomical histology analyses.

Conclusion:

Although *Kif21b*$^{-/-}$ KO males display microcephaly at P120[1], our neuroanatomical analyses revealed only a slight reduction of the total brain area in *Kif21b*$^{-/-}$ KO in both males and females at P7 (**Figure 1A**), suggesting that microcephaly does not occur before birth but rather during post-natal development. Thus, we also detected a slight reduction of the CC and of the hippocampus area, but did not observed any differences between males and females, although phenotypes seemed to be more severe and broader in females. Altogether, our results indicate that neurodevelopmental malformations previously observed at P120 are likely occurring postnatally. To investigate in more details the fibers tracts morphology defects in *Kif21b*$^{-/-}$ KO, we performed *in vivo* MRI on P120 female mice (**Figure 2**), and confirmed the CC abnormalities. Interestingly, DTI-based WM integrity further revealed a demyelination of the WM fibres (increased Drad) that are thought to be responsible for the overall CC defects. Thus, our study is the first one to show that Kif21b could possibly perturbs axonal myelination in the central nervous system (CNS). Supporting this idea, Kif21b has been demonstrated to be a locus for both multiple sclerosis[8] and Alzheimer disease[9], two neurological disorders associated with myelin damage in the CNS[10,11]. We would be very interesting to first confirm our results by doing immunohistochemistry (IHC) to specifically label myelinated axons and oligodendrocytes (glial cells that myelinate axons) on cortical slices. In order to know whether the axonal demyelination is due to neuronal impairment or oligodendrocytes loss, we could performed MRI on conditional *Kif21b* KO mice in which *Kif21b* has been specifically inactivated, either in post-mitotic-neurons (by crossing those conditional KO with Nex-Cre[12] mice) or either in oligodendrocytes precursors cells (by crossing those mice with Olig2-Cre[13] mice).

In addition to *Kif21b*$^{-/-}$, we also assessed the brain anatomy of *Kif21b*$^{+/-}$ KO mice at P7 (histology) and P120 (MRI). Surprisingly, histological analyses revealed that *Kif21b*$^{+/-}$ mice display a macrocephaly and an increased size of almost all brain regions at P7. Furthermore, our MRI analyses revealed a slight reduction of CC tract fibres and a slight axonal demyelination. However, since MRI-based imaging is not suitable to detect slight defects, we did not detect any brain or ventricle volume defects for both *Kif21b*$^{-/-}$ and *Kif21b*$^{+/-}$ female mice at P120.

Altogether, all those results need to be confirmed by histological analyses at P120. This will help raising clear conclusion regarding brain morphology in *Kif21b*$^{+/-}$ mice. We will also assess the brain morphology at E18.5 to decipher whether brain abnormalities (such as macrocephaly) observed at P7 are present earlier during development.

Material and methods

Kif21b KO mouse model

Kif21b KO mice were generated using the International Mouse Phenotyping Consortium targeting mutation strategy[80] and obtained from= UC Davis/ KOMP repository (Kif21b$^{tm1a(KOMP)Wtsi}$). Genotyping was done as follows: Genomic DNA was extracted from tail biopsies using PCR reagent (Viagen) supplemented with Proteinase K (1 mg/mL), heated at 55°C for 5 h. Proteinase K was inactivated for 45 min at 85°C, and cell debris was removed by centrifugation. Samples were processed for PCR using the following primers: Kif21b forward: 5´-GGGGTACTTTCCATTGACCCAG-3´, Kif21b reverse: 5'-GAAGGGACCAAACCTGGGC-3' for Kif21b targeted exon amplification and Mq forward 5'-GCTATGACTGGGCACAACAGACAATC-3' and Mq reverse 5'-CAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTG-3' for Neomycin gene amplification. The presence of the wild type and knockout alleles was indicated by 346 and 261 bp products, respectively, which were detected on a 2% agarose gel.

Neuroanatomical studies at P7

Neuroanatomical studies[2] were carried out using a cohort of 34 *Kif21b* wild-type (WT), heterozygous (*Kif21b*$^{+/-}$) and homozygous (*Kif21b*$^{-/-}$) KO mice at precisely 7 days postnatally. Mouse brain samples were fixed in 4% buffered formalin for exactly 48 hours. 166 brain parameters, made of area and length measurements as well as cell level features, were taken blind to the genotype across one sagittal section (**Supplementary Figure 1**). Data were analysed using a two-tailed Student t-test assuming equal variance to determine whether a brain region is associated with neuroanatomical defect or not.

MRI experiments

MRI experiments were carried on P60 *Kif21b* WT, *Kif21b*$^{+/-}$ or *Kif21b*$^{-/-}$ KO female mice (n=5 per genotype for FA, Drad and Dax measurements; n=4 per genotype for brain and ventricles' volume). Anaesthesia was induced with 4% isoflurane then maintained to stabilize the breath frequency around 80-90 bpm. Animals were then mounted in an animal cradle using a toothbar and earbars for stable positioning of the head. During all MRI experiments, respiration was monitored using a pressure pad under the thorax and the animal cradle was warmed. MRI exams were performed on 7/30 Biospec system (Bruker Biospin, Ettlingen, Germany). Signal transmission was achieved with a quadrature volume resonator (inner 86 mm), and a standard mice brain quadrature surface coil (~19 x 19 mm²) was used for signal reception. MRI experiments were executed with ParaVision 6.0.1 software. DTI was acquired using diffusion tensor spin-echo echo-planar sequence (DTI-SE-EPI) with the following parameters: four shots, TR/TE= 3000/25 ms, 2 average, 20 consecutive slices with

resolution = 100 x 100 x 500 μm³, 30 directions, 6 b-values, Δ/δ = 12/6 ms. Scan time was approx. 1 h. T2-weighted axial anatomical dataset was acquired using RARE sequence employed using TR/TE = 5000/26.5 ms, 6 average, 39 consecutive slices with resolution = 78 x 78 x 300 μm³, RARE-factor = 8, acquisition time = 16 min.

MRI Image processing and analysis

After inter scan drift correction, we used FSL (FMRIB Software Library, Oxford, UK) to reconstruct DTI data, to calculate fractional anisotropy (FA), diffusion axial (Dax) and diffusion radial (Drad) maps. After brain extraction, individuals mean DWI were co-registered to a reference using ANTs (http://stnava.github.io/ANTs/) and the transformation matrix was applied to the corresponding maps. A set of regions of interest corresponding to corpus callosum was designed manually and applied on all maps to extract values using ImageJ (NHI, USA). Tractography of the white matter was performed on whole brain using DSI Studio (http://dsi-studio.labsolver.org/) with following parameters: FA threshold = 0.25, Angular threshold = 60, tracking algorithm: Stremline (Euler). All data were analysed using one-way ANOVA, Newman-Keuls' multiple comparisons test.

Figure legends

Figure 1: The inactivation of one copy of *Kif21b* gives rise to more severe neuroanatomical phenotypes than two copies at P7. (**A**) Left: Histogram comparing male and female *Kif21b*$^{-/-}$ KO mice to matched WT and showing variation (decreased-minus scale or increased-positive scale) in areas and lengths expressed as percentage of WT together with a colour map indicating the significance level. Right: A schematic representation of the section of interest at Lateral +0.64mm is shown. Coloured regions indicated the presence of at least one significant parameter within the brain region. White colouring indicates a p-value higher than 0.05 and grey shows not enough data to calculate a p-value. (**B**) Histogram comparing male and female *Kif21b*$^{+/-}$ to matched WT and showing variation (decreased-minus scale or increased-positive scale) in areas and lengths expressed as percentage of WT together with a colour map indicating the significance level. Same colour map applies. (**A, B**) Data were analysed using a two-tailed Student t-test. Number of animals analyzed: males (n=6 WT; n=6 *Kif21b*$^{-/-}$; n=6 *Kif21*$^{+/-}$), females (n=6 WT; n=4 *Kif21b*$^{-/-}$; n=6 *Kif21*$^{+/-}$). (**C**) Representative nissl-stained sagittal brain sections from P7 *Kif21b*$^{+/-}$ male mouse, showing an increased size of the cortex (black), a thick corpus callosum (yellow) and an enlarged hippocampus (white), compared to a match WT section (top panel). (**D**) List of parameters measured at Lateral -0.64 mm.

Figure 2: *Kif21b*$^{-/-}$ KO mice present WM disorganisation and axonal demyelination of the corpus callosum at P160. (**A**) Representative coronal brain sections of *Kif21b* WT, *Kif21b*$^{+/-}$ and *Kif21b*$^{-/-}$ KO mice, showing a disorganization of the white matter (WM) fibres in the corpus callosum (CC, green arrowhead) and in the median preoptic nucleus (MnPO, red arrowhead). (**B**) Fractional anisotropy (FA) measures (mean ± S.E.M.), indicating a significant WM disorganization of the CC in *Kif21b*$^{-/-}$ KO mice. (**C**) Representative tractographies of the CC of *Kif21b* WT, *Kif21b*$^{+/-}$ and *Kif21b*$^{-/-}$ KO mice, showing severe callosal projection defects (white arrowhead) in *Kif21b*$^{-/-}$ KO mice. Commissural fornix fibres (orange arrowhead) are also impaired in *Kif21b*$^{-/-}$ KO mice. Upper panel: coronal section; lower panel: view from above. (**D, E**) DTI-based radial (Drad) (**D**) and axial (Dax) (**E**) diffusivity measures (mean ± S.E.M.), showing that although callosal axon integrity is not perturbed for both *Kif21b*$^{+/-}$ and *Kif21b*$^{-/-}$ KO mice (**E**), axons are severely demyelinated in *Kif21b*$^{-/-}$ KO mice (**D**). (**F**) Total brain volume (left) and the total ventricles volume (right) measurements (mean ± S.E.M.). (**B, D, E, F**) Dots represent individual data points for each condition. A total of $n \geq 4$ mice for all genotypes were analysed using one-way ANOVA, Newman-Keuls' multiple comparisons test: ns, non-significant; * $P<0.05$.

Supplementary information:

Supplementary Figure 1 P7 mouse brain atlas of assessed parameters at Lateral 640 μm (right hemisphere). A full description of the acronyms used in this Figure is provided in **Supplementary Table 1**.

Supplementary Figure 2 Resolution of the neuroanatomical studies. A zoomed image of a WT animal is shown across a sagittal section.

Supplementary Table 1 Description of the 166 variables for P7 brain sagittal analysis at Lateral 640 μm (right hemisphere). Column A gives the acronym of the brain parameter, column B its description, and column C the unit of the measurement.

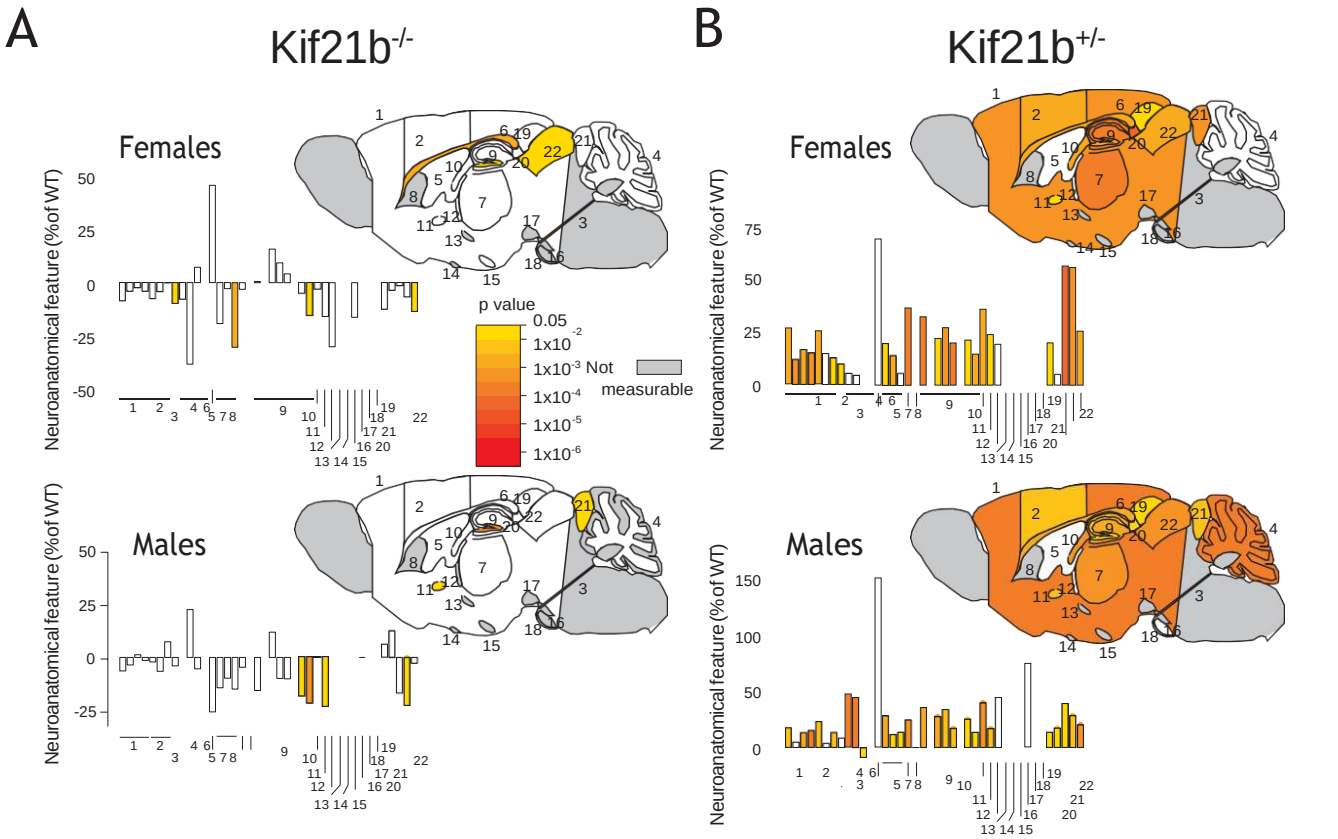
Supplementary Table 2 Full raw experimental data for male *Kif21b* mice at P7.

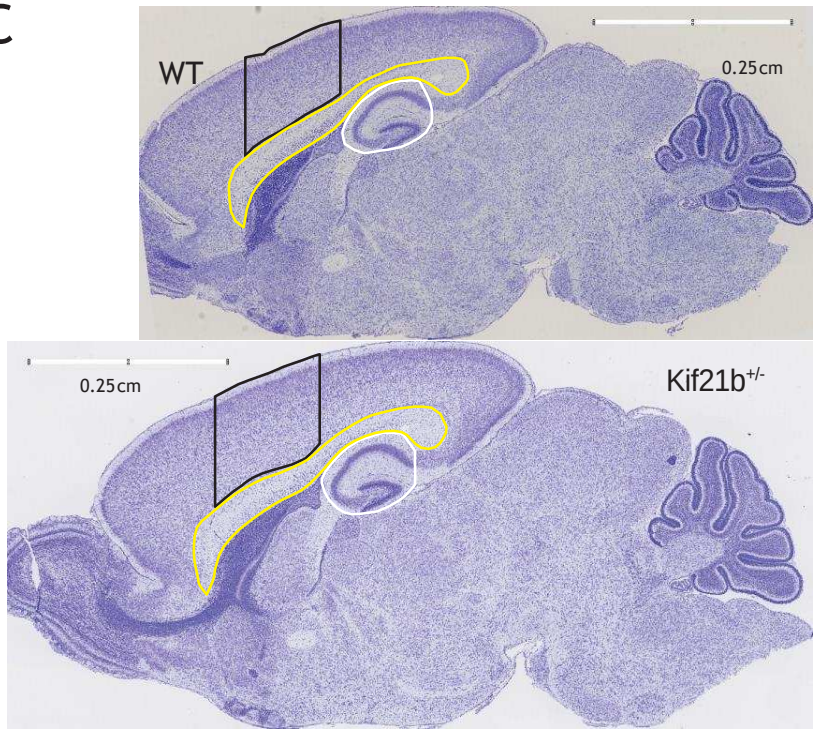
Supplementary Table 3 Full raw experimental data for female *Kif21b* mice at P7.

References

1. Kannan, M. *et al.* WD40-repeat 47, a microtubule-associated protein, is essential for brain development and autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, E9308–E9317 (2017).
2. Collins, S. C. *et al.* A Method for Parasagittal Sectioning for Neuroanatomical Quantification of Brain Structures in the Adult Mouse. *Curr Protoc Mouse Biol* **8**, e48 (2018).
3. Wu, Y. L. & Lo, C. W. Diverse Application of Magnetic Resonance Imaging for Mouse Phenotyping. *Birth Defects Res* **109**, 758–770 (2017).
4. Horsfield, M. A. & Jones, D. K. Applications of diffusion-weighted and diffusion tensor MRI to white matter diseases - a review. *NMR Biomed* **15**, 570–577 (2002).
5. Song, S.-K. *et al.* Dysmyelination revealed through MRI as increased radial (but unchanged axial) diffusion of water. *Neuroimage* **17**, 1429–1436 (2002).
6. Song, S.-K. *et al.* Demyelination increases radial diffusivity in corpus callosum of mouse brain. *Neuroimage* **26**, 132–140 (2005).
7. Kumar, R., Macey, P. M., Woo, M. A. & Harper, R. M. Rostral brain axonal injury in congenital central hypoventilation syndrome. *J. Neurosci. Res.* **88**, 2146–2154 (2010).
8. Goris, A., Boonen, S., D'hooghe, M.-B. & Dubois, B. Replication of KIF21B as a susceptibility locus for multiple sclerosis. *J. Med. Genet.* **47**, 775–776 (2010).
9. Kreft, K. L. *et al.* Abundant kif21b is associated with accelerated progression in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol Commun* **2**, 144 (2014).
10. Dulamea, A. O. Role of Oligodendrocyte Dysfunction in Demyelination, Remyelination and Neurodegeneration in Multiple Sclerosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **958**, 91–127 (2017).
11. Nasrabady, S. E., Rizvi, B., Goldman, J. E. & Brickman, A. M. White matter changes in Alzheimer's disease: a focus on myelin and oligodendrocytes. *Acta Neuropathol Commun* **6**, (2018).
12. Goebbels, S. *et al.* Genetic targeting of principal neurons in neocortex and hippocampus of NEX-Cre mice. *Genesis* **44**, 611–621 (2006).
13. Zawadzka, M. *et al.* CNS-resident glial progenitor/stem cells produce Schwann cells as well as oligodendrocytes during repair of CNS demyelination. *Cell Stem Cell* **6**, 578–590 (2010).

Figure 1



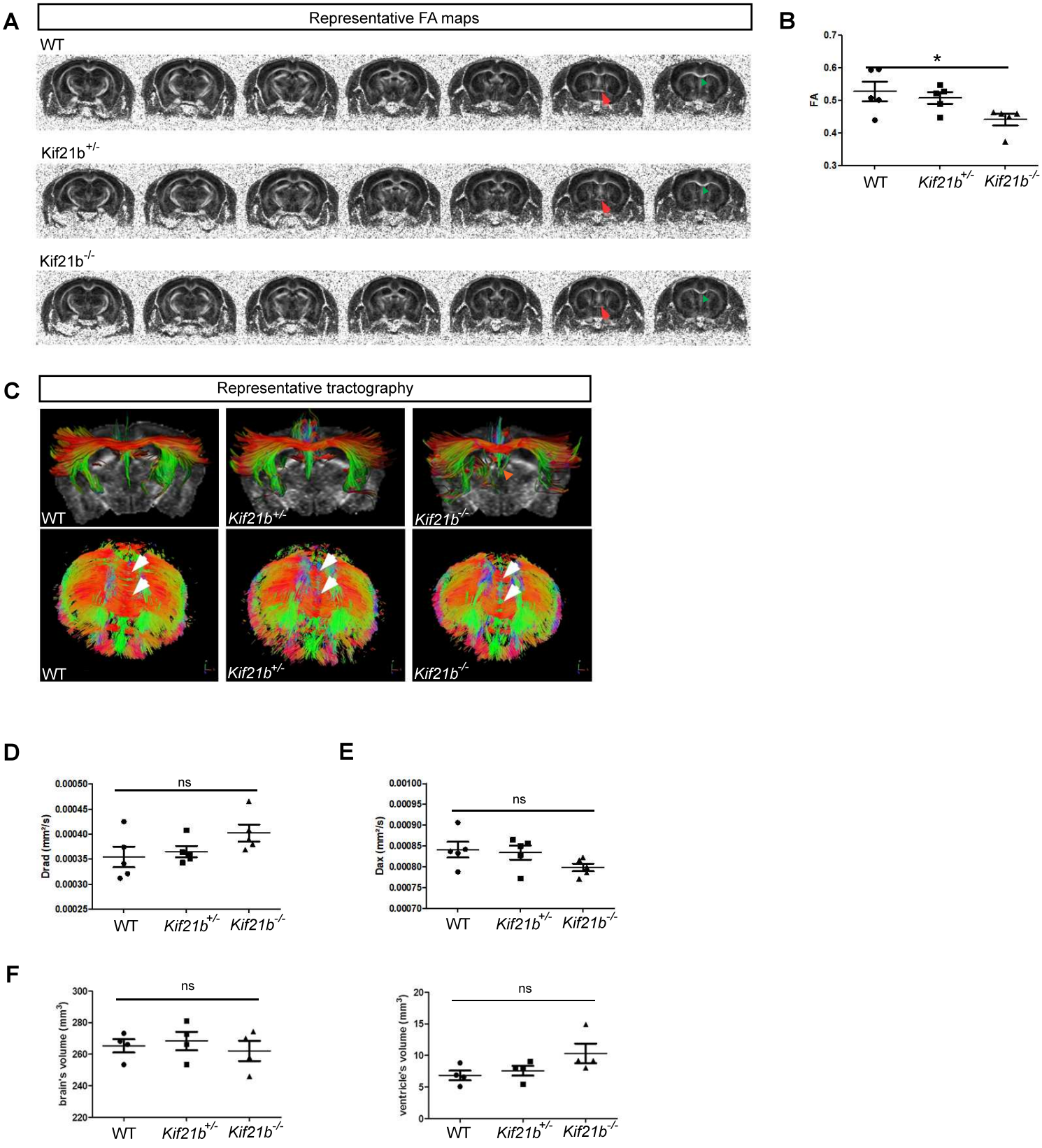


Sagittal 0.64 mm P7

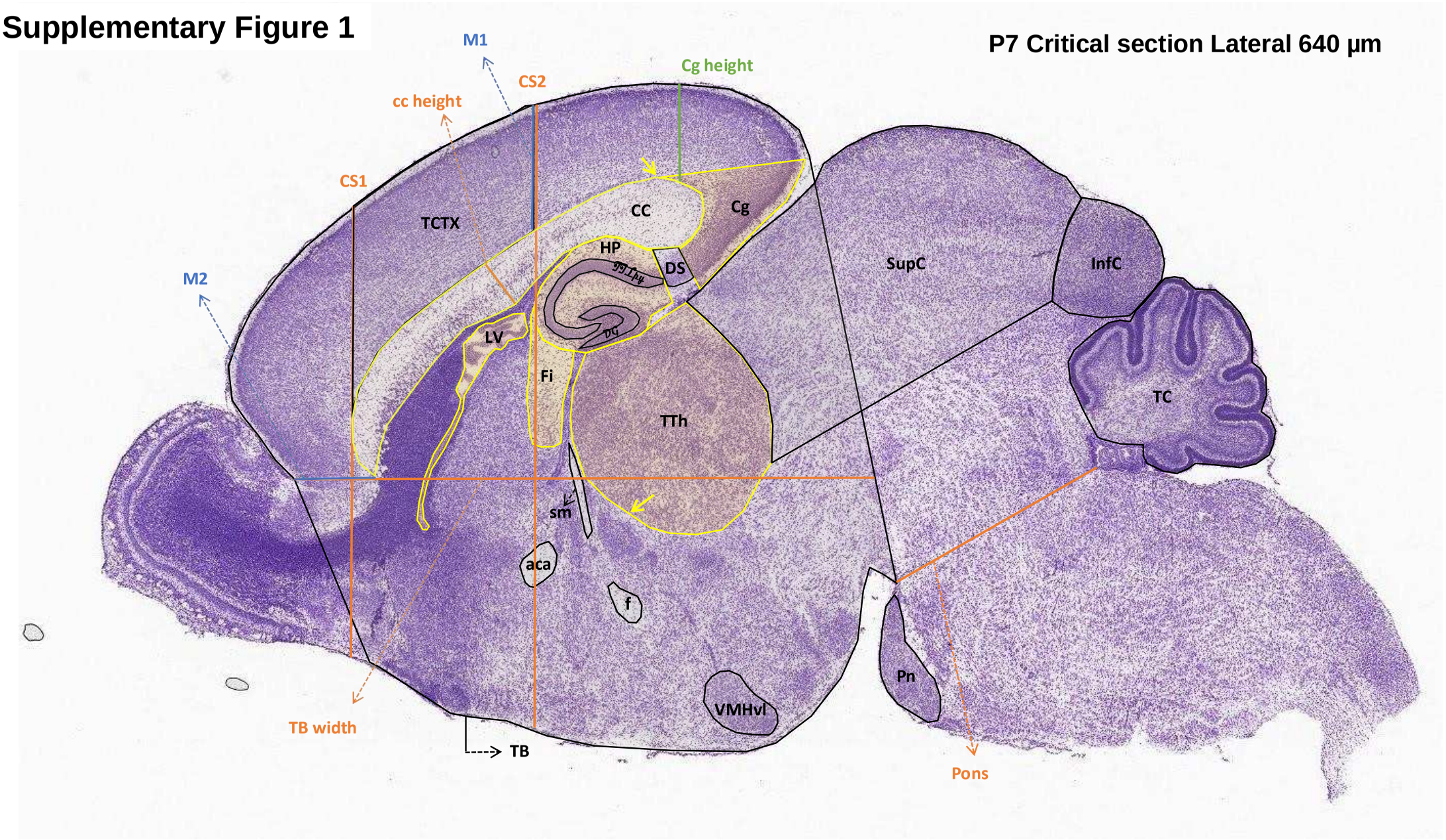
D

1 total brain area
1 brain width
1 brain height 1
1 brain height 2
2 temporal cortex - area
2 secondary motor cortex
2 primary motor cortex
3 pons height
4 cerebellum area
4 internal granule layer - area
4 number of folia
4 medial cerebellar nucleus - area
5 lateral ventricle
6 corpus callosum - area
6 corpus callosum - length
6 corpus callosum - height
7 thalamus - area
8 caudate putamen - area
9 hippocampus - area
9 radiatum layer of the hippocampus - length
9 oriens layer of the hippocampus - length
9 pyramidal layers - area
9 pyramidal layers - length
9 lacunosum moleculare layer - length
9 granule cell layer of dentate gyrus - area
9 granule cell layer of dentate gyrus - length
10 fimbria of the hippocampus - area
11 anterior commissure - area
12 stria medullaris - area
13 fornix - area
14 optic chiasm - area
15 ventromedial hypothalamus nucleus
16 pontine nuclei - area
17 substantia nigra - area
18 transverse fibers of the pons - area
19 cingulate cortex, area 29a - area
19 cingulate cortex, area 29a - height
20 dorsal subiculum - area
21 inferior colliculus - area
22 superior colliculus - area

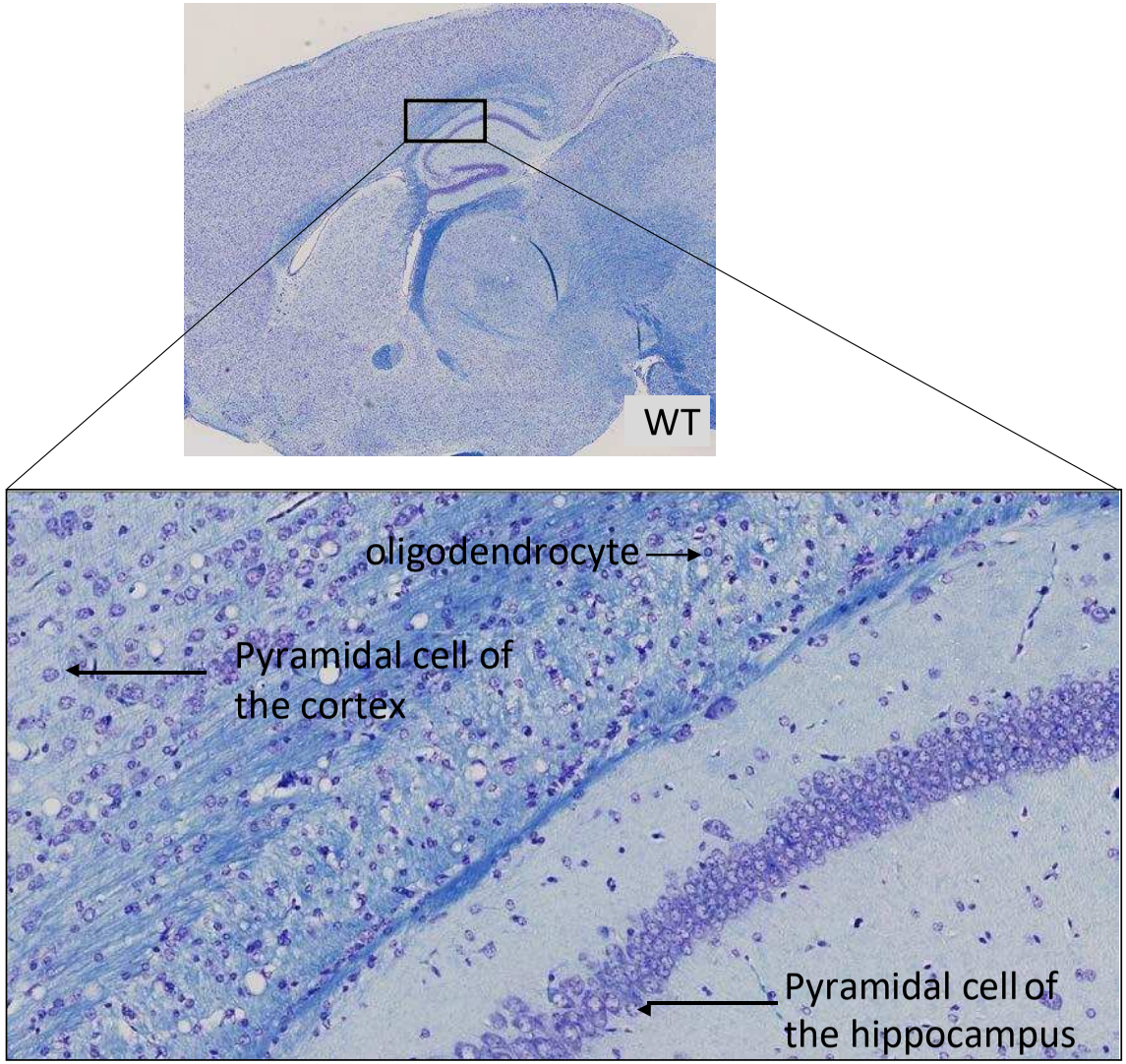
Figure 2


A
Representative FA maps
WT
Kif21b+/-
Kif21b-/-
B
FA
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
*
WT
Kif21b+/-
Kif21b-/-
C
Representative tractography
WT
Kif21b+/-
Kif21b-/-
WT
Kif21b+/-
Kif21b-/-
D
Drad (mm²/s)
0.00050
0.00045
0.00040
0.00035
0.00030
0.00025
ns
WT
Kif21b+/-
Kif21b-/-
E
Dax (mm²/s)
0.00100
0.00095
0.00090
0.00085
0.00080
0.00075
0.00070
ns
WT
Kif21b+/-
Kif21b-/-
F
brain's volume (mm³)
300
280
260
240
220
ns
WT
Kif21b+/-
Kif21b-/-
ventricle's volume (mm³)
20
15
10
5
0
ns
WT
Kif21b+/-
Kif21b-/-

Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



Supplementary Table 1

Parameter	Description	Unit
4_TB_area	Total brain area	cm2
4_TC_area	Total cerebellar area	cm2
4_LV_area	Lateral ventricle area	cm2
4_cc_area	Corpus callosum area	cm2
4_cc_cellcount	Cell count of the corpus callosum	digit
4_cc_cellarea	Total cell area of the corpus callosum	cm2
4_cc_celldens	Cell density of the corpus callosum	digit
4_cc_avgcellarea	Average cell area of the corpus callosum	cm2
4_cc_cellcirc	Cell circularity of the corpus callosum	digit
4_cc_cellsol	Cell solidity of the corpus callosum	digit
4_TCTX_area	Total cortical area	cm2
4_TCTX_cellcount	Cell count of the cortex	digit
4_TCTX_cellarea	Total cell area of the cortex	cm2
4_TCTX_celldens	Cell density of the cortex	digit
4_TCTX_avgcellarea	Average cell area of the cortex	cm2
4_TCTX_cellcirc	Cell circularity of the cortex	digit
4_TCTX_cellsol	Cell solidity of the cortex	digit
4_TTh_area	Total thalamic area	cm2
4_TTh_cellcount	Cell count of the thalamus	digit
4_TTh_cellarea	Total cell area of the thalamus	cm2
4_TTh_celldens	Cell density of the thalamus	digit
4_TTh_avgcellarea	Average cell area of the thalamus	cm2
4_TTh_cellcirc	Cell circularity of the thalamus	digit
4_TTh_cellsol	Cell solidity of the thalamus	digit
4_CPu_area	Caudate putamen area	cm2
4_CPu_cellcount	Cell count of the caudate putamen	digit
4_CPu_cellarea	Total cell area of the caudate putamen	cm2
4_CPu_celldens	Cell density of the caudate putamen	digit
4_CPu_avgcellarea	Average cell area of the caudate putamen	cm2
4_CPu_cellcirc	Cell circularity of the caudate putamen	digit
4_CPu_cellsol	Cell solidity of the caudate putamen	digit
4_HP_area	Hippocampus area	cm2
4_HP_cellcount	Cell count of the hippocampus	digit
4_HP_cellarea	Total cell area of the hippocampus	cm2
4_HP_celldens	Cell density of the hippocampus	digit
4_HP_avgcellarea	Average cell area of the hippocampus	cm2
4_HP_cellcirc	Cell circularity of the hippocampus	digit
4_HP_cellsol	Cell solidity of the hippocampus	digit
4_TILpy_area	Area of pyramidal cells of the hippocampus	cm2
4_TILpy_cellcount	Cell count of the pyramidal cells of the hippocampus	digit
4_TILpy_cellarea	Total cell area of the pyramidal cells of the hippocampus	cm2
4_TILpy_celldens	Cell density of the pyramidal cells of the hippocampus	digit
4_TILpy_avgcellarea	Average cell area of the pyramidal cells of the hippocampus	cm2
4_TILpy_cellcirc	Cell circularity of the pyramidal cells of the hippocampus	digit
4_TILpy_cellsol	Cell solidity of the pyramidal cells of the hippocampus	digit
4_DG_area	Dentate gyrus area	cm2
4_DG_cellcount	Cell count of the dentate gyrus	digit
4_DG_cellarea	Total cell area of the dentate gyrus	cm2
4_DG_celldens	Cell density of the dentate gyrus	digit
4_DG_avgcellarea	Average cell area of the dentate gyrus	cm2
4_DG_cellcirc	Cell circularity of the dentate gyrus	digit
4_DG_cellsol	Cell solidity of the dentate gyrus	digit
4_fi_area	Area of the fimbria of the hippocampus	cm2
4_fi_cellcount	Cell count of the fimbria of the hippocampus	digit
4_fi_cellarea	Total cell area of the fimbria of the hippocampus	cm2
4_fi_celldens	Cell density of the fimbria of the hippocampus	digit
4_fi_avgcellarea	Average cell area of the fimbria of the hippocampus	cm2

4_fi_cellcirc	Cell circularity of the fimbria of the hippocampus	digit
4_fi_cellsol	Cell solidity of the fimbria of the hippocampus	digit
4_aca_area	Anterior commissure area	cm2
4_aca_cellcount	Cell count of the anterior commissure	digit
4_aca_cellarea	Total cell area of the anterior commissure	cm2
4_aca_celldens	Cell density of the anterior commissure	digit
4_aca_avgcellarea	Average cell area of the anterior commissure	cm2
4_aca_cellcirc	Cell circularity of the anterior commissure	digit
4_aca_cellsol	Cell solidity of the anterior commissure	digit
4_sm_area	Stria medullaris area	cm2
4_sm_cellcount	Cell count of the stria medullaris	digit
4_sm_cellarea	Total cell area of the stria medullaris	cm2
4_sm_celldens	Cell density of the stria medullaris	digit
4_sm_avgcellarea	Average cell area of the stria medullaris	cm2
4_sm_cellcirc	Cell circularity of the stria medullaris	digit
4_sm_cellsol	Cell solidity of the stria medullaris	digit
4_f_area	Fornix area	cm2
4_f_cellcount	Cell count of the fornix	digit
4_f_cellarea	Total cell area of the fornix	cm2
4_f_celldens	Cell density of the fornix	digit
4_f_avgcellarea	Average cell area of the fornix	cm2
4_f_cellcirc	Cell circularity of the fornix	digit
4_f_cellsol	Cell solidity of the fornix	digit
4_och_area	Optic chiasm area	cm2
4_och_cellcount	Cell count of the optic chiasm	digit
4_och_cellarea	Total cell area of the optic chiasm	cm2
4_och_celldens	Cell density of the optic chiasm	digit
4_och_avgcellarea	Average cell area of the optic chiasm	cm2
4_och_cellcirc	Cell circularity of the optic chiasm	digit
4_och_cellsol	Cell solidity of the optic chiasm	digit
4_VMHvl_area	Area of ventromedial nucleus of the hypothalamus	cm2
4_VMHvl_cellcount	Cell count of the ventromedial nucleus of the hypothalamus	digit
4_VMHvl_cellarea	Total cell area of the ventromedial nucleus of the hypothalamus	cm2
4_VMHvl_celldens	Cell density of the ventromedial nucleus of the hypothalamus	digit
4_VMHvl_avgcellarea	Average cell area of the ventromedial nucleus of the hypothalamus	cm2
4_VMHvl_cellcirc	Cell circularity of the ventromedial nucleus of the hypothalamus	digit
4_VMHvl_cellsol	Cell solidity of the ventromedial nucleus of the hypothalamus	digit
4_Pn_area	Pontine nuclei area	cm2
4_Pn_cellcount	Cell count of the pontine nuclei	digit
4_Pn_cellarea	Total cell area of the pontine nuclei	cm2
4_Pn_celldens	Cell density of the pontine nuclei	digit
4_Pn_avgcellarea	Average cell area of the pontine nuclei	cm2
4_Pn_cellcirc	Cell circularity of the pontine nuclei	digit
4_Pn_cellsol	Cell solidity of the pontine nuclei	digit
4_SN_area	Substantia nigra area	cm2
4_SN_cellcount	Cell count of the substantia nigra	digit
4_SN_cellarea	Total cell area of the substantia nigra	cm2
4_SN_celldens	Cell density of the substantia nigra	digit
4_SN_avgcellarea	Average cell area of the substantia nigra	cm2
4_SN_cellcirc	Cell circularity of the substantia nigra	digit
4_SN_cellsol	Cell solidity of the substantia nigra	digit
4_fp_area	Area of fibre of pons	cm2
4_fp_cellcount	Cell count of the fibre of pons	digit
4_fp_cellarea	Total cell area of the fibre of pons	cm2
4_fp_celldens	Cell density of the fibre of pons	digit
4_fp_avgcellarea	Average cell area of the fibre of pons	cm2
4_fp_cellcirc	Cell circularity of the fibre of pons	digit
4_fp_cellsol	Cell solidity of the fibre of pons	digit
4_Cg_area	Cingulate cortex area	cm2

4_Cg_cellcount	Cell count of the cingulate cortex	digit
4_Cg_cellarea	Total cell area of the cingulate cortex	cm2
4_Cg_celldens	Cell density of the cingulate cortex	digit
4_Cg_avgcellarea	Average cell area of the cingulate cortex	cm2
4_Cg_cellcirc	Cell circularity of the cingulate cortex	digit
4_Cg_cellsol	Cell solidity of the cingulate cortex	digit
4_DS_area	Dorsal subiculum area	cm2
4_DS_cellcount	Cell count of the dorsal subiculum	digit
4_DS_cellarea	Total cell area of the dorsal subiculum	cm2
4_DS_celldens	Cell density of the dorsal subiculum	digit
4_DS_avgcellarea	Average cell area of the dorsal subiculum	cm2
4_DS_cellcirc	Cell circularity of the dorsal subiculum	digit
4_DS_cellsol	Cell solidity of the dorsal subiculum	digit
4_InfC_area	Inferior colliculus area	cm2
4_InfC_cellcount	Cell count of the inferior colliculus	digit
4_InfC_cellarea	Total cell area of the inferior colliculus	cm2
4_InfC_celldens	Cell density of the inferior colliculus	digit
4_InfC_avgcellarea	Average cell area of the inferior colliculus	cm2
4_InfC_cellcirc	Cell circularity of the inferior colliculus	digit
4_InfC_cellsol	Cell solidity of the inferior colliculus	digit
4_SupC_area	Superior colliculus area	cm2
4_SupC_cellcount	Cell count of the superior colliculus	digit
4_SupC_cellarea	Total cell area of the superior colliculus	cm2
4_SupC_celldens	Cell density of the superior colliculus	digit
4_SupC_avgcellarea	Average cell area of the superior colliculus	cm2
4_SupC_cellcirc	Cell circularity of the superior colliculus	digit
4_SupC_cellsol	Cell solidity of the superior colliculus	digit
4_Med_area	Area of the medial cerebellar nucleus	cm2
4_Med_cellcount	Cell count of the medial cerebellar nucleus	digit
4_Med_cellarea	Total cell area of the medial cerebellar nucleus	cm2
4_Med_celldens	Cell density of the medial cerebellar nucleus	digit
4_Med_avgcellarea	Average cell area of the medial cerebellar nucleus	cm2
4_Med_cellcirc	Cell circularity of the medial cerebellar nucleus	digit
4_Med_cellsol	Cell solidity of the medial cerebellar nucleus	digit
4_TILpy_length	Total internal length of pyramidal cell layer of the hippocampus	cm
4_DG_length	Dentate gyrus length	cm
4_cc_length	Total outer length of the corpus callosum	cm
4_Mol_length	Length of the molecular layer of the hippocampus	cm
4_Rad_length	Length of the radiatum layer of the hippocampus	cm
4_Or_length	Length of the oriens layer of the hippocampus	cm
4_cc_height	Corpus callosum thickness	cm
4_M2_length	Length of the secondary motor cortex	cm
4_M1_length	Length of the primary motor cortex	cm
4_Cg_height	Height of the cingulate cortex	cm
4_TB_width	Width of the total brain	cm
4_TB_height_CS1	Height of the total brain at CS1 (coronal critical section 1)	cm
4_TB_height_CS2	Height of the total brain at CS2 (coronal critical section 2)	cm
4_Pons_height	Height of the pons	cm
4_IGL_area	Area of the internal granular layer of the cerebellum	cm2
4_Folia	Number of folia	digit

Supplementary Table 2

Sex	Male	Male	Male	Male	Male	Male	Male	Male	Male	Male	Male	Male	Male	Male	Male	Male	Male	Male	Statistics			
Barcode	A00006786	A00006795	A00006801	A00006810	A00006812	A00006819	A00006790	A00006791	A00006802	A00006815	A00006816	A00006817	A00006787	A00006793	A00006798	A00006799	A00006808	A00006809				
Gene	Kif21b	Kif21b	Kif21b	Kif21b	Kif21b	Kif21b	Kif21b	Kif21b	Kif21b	Kif21b	Kif21b	Kif21b	Kif21b	Kif21b	Kif21b	Kif21b	Kif21b	Kif21b	*% HOM/WT*	*T test*	*% HET/WT*	*T test*
Genotype	HET	HET	HET	HET	HET	HET	HOM	HOM	HOM	HOM	HOM	HOM	WT	WT	WT	WT	WT	WT	HOM Males		HET Males	
4_TB_area	0,226396937	0,216827508	0,213661121	0,193765838	0,216296849		0,183763292	0,1533	0,1716	0,175622037		0,167644584		0,174166925		0,1827	0,163186247	0,208438656	-6,444533184	0,288145483	17,16790355	0,007562
4_TB_width	0,54525236	0,482843137	0,488244372	0,462418301	0,491285403		0,465953086	0,438032339	0,457162378	0,459485311		0,452653154		0,471965384		0,450193578	0,461216124	0,503393304	-3,611432964	0,178084555	4,731183163	0,158917
4_TB_height_CS1	0,374371478	0,375756127	0,355816903	0,338608791	0,350160506	0,394472613	0,334849861	0,3208	0,3165	0,3632	0,3187	0,309110736	0,3296	0,306357383	0,30109163	0,335529331	0,294240365	0,373892755	1,156747585	0,801233232	12,80329192	0,004801
4_TB_height_CS2	0,441167279	0,472648275	0,462651236	0,471529169	0,473519805	0,515350249	0,442035078	0,392067388	0,403080555	0,414234526	0,395851455	0,389807786	0,420777706	0,395718515	0,40375814	0,428825462	0,378774767	0,445806201	-1,478941783	0,642658892	14,6829033	0,000212
4_TCTX_area	0,021193726	0,020418348	0,021531652	0,019956555	0,020595706	0,027935338	0,017631964	0,018045833	0,019967181	0,014960698	0,018459638	0,016141914	0,018158969	0,016414727	0,017631997	0,017406215	0,016337803	0,021685708	-2,255940491	0,7155692	22,2936894	0,006956
4_M2_length	0,100688537	0,072364096	0,070368953	0,064678105	0,068408498	0,094292864	0,063253161	0,072354428	0,053580528	0,100279397	0,055112731	0,079780051	0,074301832	0,073689046	0,067414383	0,075152454	0,070845215	0,092827308	-6,575947504	0,550060633	3,648109178	0,495197
4_M1_length	0,102689708	0,106681181	0,10958407	0,101238264	0,111398376	0,118292738	0,097328348	0,113140515	0,1084	0,103641779	0,100387156	0,09633	0,08635846	0,09419	0,099202915	0,103848782	0,088212964	0,1054	7,278884605	0,127473445	12,59001456	0,007177
4_Pons_height	0,182494107	0,170577698	0,174273027	0,150891499	0,172565281		0,152592419	0,147170738	0,14616714			0,158817443		0,159128659		0,157883794	0,151251667	0,161604987	-3,988347217	0,136454086	8,060751359	0,054053
4_TC_area	0,025555336	0,025832356	0,025067376	0,026477017	0,028152816					0,01702				0,020328382	0,01616				-6,710031703		43,70042607	0,002482
4_IGL_area	0,01706	0,01635	0,01608	0,01628	0,01804		0,01578		0,01589	0,01145				0,0131	0,0104				22,32624113	0,307502377	42,65531915	0,003027
4_Folia	7	7	7	7	7	7	8	7	7	7				7	8		8		-5,434782609	0,352413195	-8,695652174	0,018452
4_Med_area																						
4_LV_area		0,003117317	0,0007688	0,000755668	0,000246251	0,003309965	0,0008592		0,00023263	0,0002907	0,000678199	0,0003721	0,001804436	0,0007258	0,0007326	0,0003021	0,000182041	0,000176818	-25,59767266	0,589752576	150,7164926	0,093975
4_cc_area	0,012758592	0,012849622	0,013119359	0,013048967	0,013149563	0,01728	0,011757513	0,004049427	0,009798523	0,009060242	0,010273562	0,010285063	0,01004261	0,009784179	0,0107278	0,012232609	0,009570276	0,012071743	-14,28682115	0,226672362	27,5913426	0,001336
4_cc_length	0,491946591	0,463652016	0,483469352	0,427406296	0,454472569	0,581319148	0,42665588	0,295773585	0,376742599	0,385254209	0,426492708	0,436923107	0,428823934	0,437278556	0,437370135	0,436617082	0,406028369	0,457500892	-9,823898318	0,088708617	11,47045738	0,023432
4_cc_height	0,038517803	0,034717204	0,034861672	0,0367069	0,034926174	0,033842487	0,036801931	0,014095968	0,026926365	0,027443167	0,030323744	0,024816105	0,030337716	0,029884297	0,02861455	0,037235303	0,027876539	0,034448647	-14,85679935	0,199045025	13,36283542	0,010395
4_TTh_area	0,020965915	0,021029673	0,020252765	0,019366555	0,02002169	0,026271703	0,0185	0,01411	0,016389834	0,016817312	0,015674439	0,016762977	0,01815	0,01681	0,017087522	0,017861804	0,015471424	0,017770298	-4,746908631	0,279782822	24,00097089	0,000684
4_CPu_area							0,000475402								0,000406967				16,81585976			
4_HP_area	0,010510479	0,008957762	0,009161139	0,007550329	0,008442402	0,01321	0,006785547	0,003917582	0,005551226	0,006389911	0,006698785	0,006864423	0,007096	0,007720164	0,006922644	0,006968028	0,006032413	0,00812946	-15,53868814	0,072226152	34,90518457	0,004633
4_Rad_length																						
4_Or_length	0,010866931	0,010874346	0,010318659	0,008390581	0,009164806	0,011053409	0,009331	0,007539	0,009468	0,009397	0,008389	0,007924	0,007931	0,008794	0,007263	0,007925	0,007033	0,007631987	11,74377287	0,057835634	30,25194069	0,000289
4_TILpy_area	0,002151443	0,001699003	0,001819337	0,001555486	0,001542555	0,002574464	0,001424765	0,000763913	0,001183888	0,001414554	0,00141563	0,001471593	0,001348198	0,001457452	0,001440123	0,001340742	0,001269604	0,001662528	-9,911245295	0,284463204	33,14659006	0,008730
4_TILpy_length	0,194922811	0,17841262	0,175157005	0,154481446	0,158703042	0,20827278	0,15070482	0,108483598	0,127632415	0,133079476	0,153015455	0,151437537	0,156856595	0,166349125	0,145380835	0,152154714	0,141675798	0,154418516	-10,08711744	0,084947406	16,70028125	0,006586
4_Mol_length																						
4_DG_area	0,000883148	0,000623274	0,000714548	0,000543546	0,000713434	0,000949597	0,000465807	0,000349658	0,000460292	0,00057147	0,000516634	0,000532478	0,000582515	0,000617914	0,000543585	0,000557207	0,000534967	0,000708953	-18,30116207	0,025748568	24,89057558	0,017676
4_DG_length	0,120679127	0,098196965	0,100128518	0,087862722	0,108121304	0,123523374	0,077342533	0,061539794	0,066276964	0,073305398	0,08011131	0,08379745	0,089851721	0,099696852	0,087164196	0,092018362	0,092397963	0,102084557	-21,45548173	0,000720882	13,36941299	0,018512
4_fi_area	0,003057775	0,002741449	0,00262866	0,002559261	0,003217896	0,003847519	0,002336	0,00193	0,002203879	0,002224587	0,001990231	0,002182191	0,002033	0,001892679	0,002240825	0,002150074	0,002122994	0,002489285	-0,479307645	0,922523784	39,62997657	0,000491
4_aca_area	0,000689969	0,00063891	0,000674259		0,000698533	0,000816269			0,000483524		0,000488189	0,000434638	0,000617291	0,000579349	0,000562879	0,000562012		0,000724031	-23,0382329	0,016294629	15,51037214	0,018516
4_sm_area	0,000456576	0,000486701	0,000414803		0,000347423	0,000518778	0,000382053				0,000445461		0,000311583						32,79190456		42,77293691	0,327543
4_f_area					0,00037805		0,000284539															
4_och_area																						
4_VMHvl_area												0,001384727			0,001485225	0,000753065			23,73079449			
4_Pn_area		0,002000809	0,000869622		0,000933472		0,002040934							0,00089921					126,9696734		41,00907093	
4_SN_area																						
4_fp_area																						
4_Cg_area	0,005300016	0,005284009	0,004882051	0,005048453	0,00608372	0,005325527	0,005001357	0,004191624	0,005392743	0,006263131	0,004739371	0,004228074	0,004930932	0,003685979	0,004515258	0,004919555	0,00456363	0,005514447	5,995417458	0,502855728	13,48738656	0,024131
4_Cg_height	0,082550914	0,087268109	0,085635234	0,111398376	0,098153944	0,082913775	0,086540651	0,106171715	0,110772034	0,076520155	0,07542701	0,070872239	0,086905033	0,067228422	0,073058529	0,080528353	0,081029378	0,079981781	12,28257723	0,227759831	16,89428952	0,010409
4_DS_area	0,001121533	0,000865283	0,00094751	0,000609862	0,000840811	0,001578	0,000638251	0,000317809	0,000467466	0,000626162	0,000716988	0,000822467	0,000627712	0,00078629	0,000732977	0,000675538	0,000655082	0,000834064	-16,75733934	0,165915141	38,29928267	0,048679
4_InfC_area	0,009208705		0,008695031		0,008113643	0,011780977	0,004681948	0,004422549		0,006649252	0,006978833	0,005931173		0,007085846	0,007389583	0,006903705	0,007582929	0,008006545	-22,46460835	0,016242152	27,80558305	0,007285
4_SupC_area	0,038431935	0,040684819	0,037792061				0,033555172			0,032486609	0,028963612	0,031492235		0,03123422		0,034326452	0,031315824	0,033248833	-2,787851549	0,492268424	19,79099012	0,000680

Supplementary Table 3

Sex	Female	Female	Female	Female	Female	Female	Female	Female	Female	Female	Female	Female	Female	Female	Female	Female	Statistics			
Barcode	A00006789	A00006794	A00006800	A00006805	A00006811	A00006820	A00006784	A00006785	A00006797	A00006821	A00006783	A00006788	A00006796	A00006807	A00006814	A00006818				
Gene	Kif21b	Kif21b	Kif21b	Kif21b	Kif21b	Kif21b	Kif21b	Kif21b	Kif21b	Kif21b	Kif2b	Kif21b	Kif21b	Kif21b	Kif21b	Kif21b	*% HOM/WT*	*T test*	*% HET/WT*	*T test*
Genotype	HET	HET	HET	HET	HET	HET	HOM	HOM	HOM	HOM	WT	WT	WT	WT	WT	WT	HOM Females		HET Females	
4_TB_area		0,224239293	0,2581063	0,214507947	0,273795841	0,242092846	0,19201951		0,155447795	0,180802118	0,1968	0,164117245	0,200051035		0,195397136	0,204942847	-8,411373103	0,241919878	26,15539403	0,001004
4_TB_width		0,518927015	0,531227306	0,505718954	0,557098765	0,532543573	0,468367115		0,427146436	0,473331815	0,480983831	0,443725803	0,48080164		0,48080164	0,492461854	-4,093108182	0,253017572	11,21337121	0,000826
4_TB_height_CS1	0,368862039	0,343602717	0,396688872	0,351883445	0,419380859	0,390432391	0,312615275	0,317887014	0,311910726	0,3341	0,319453736	0,278927014	0,342435242	0,347539287	0,331510481	0,343878472	-2,493945428	0,57035053	15,63880296	0,002518
4_TB_height_CS2	0,470010224	0,460098158	0,516769469	0,456864425	0,528558816	0,476680159	0,405102642	0,413999815	0,389380415	0,42119967	0,421445618	0,386498446	0,453494539	0,414847529	0,435097408	0,437177995	-4,082213459	0,217638068	14,14208411	0,000656
4_TCTX_area	0,021587155	0,021977484	0,027212631	0,020698778	0,030295246	0,024164584	0,020481195	0,018105768	0,014796718	0,018711767	0,019940514	0,017141096	0,020953304	0,019333718	0,019269758	0,02023509	-7,469879394	0,241636984	24,86654629	0,003715
4_M2_length	0,065850702	0,072093035	0,065690361	0,08494668	0,089765615	0,094057606	0,067537795	0,065919514	0,064659657	0,065952897	0,062967582	0,063405621	0,06947169	0,084074734	0,065807979	0,067929781	-4,243268234	0,487779693	14,20175581	0,061002
4_M1_length	0,100240527	0,104141153	0,119965726	0,10804191	0,135710074	0,111851953	0,103575495	0,097836484	0,098811029	0,1029	0,1005	0,091004327	0,10488576	0,109041221	0,099840583	0,100751537	-0,220934693	0,947379494	12,1988543	0,028884
4_Pons_height		0,163800946	0,197436506	0,173119193	0,187545861	0,176679931			0,143767085	0,152928569	0,1636		0,168722181		0,156179323	0,168770589	-9,719077636	0,038695481	9,37113522	0,014903
4_TC_area		0,024461982	0,03088236	0,022877412	0,029960411				0,019402252	0,028092637			0,023100507		0,024489628	0,029588602	-7,691760361	0,663854648	5,128208758	0,459330
4_IGL_area		0,0161	0,02029	0,01547					0,002770151	0,0177			0,01502		0,01552	0,01922	-38,2933551	0,354991944	4,220257235	0,453646
4_Folia		7	7	7	7				7	8			7		7	7	7,142857143	0,272228401	0	0,407084
4_Med_area																				
4_LV_area	0,001747	0,00124	0,0008734	0,000718319	0,000255831	0,000338097	0,0009972	0,001359	0,000157124	0,0004669	0,0007773	0,0004123		0,000163839	0,0006789	0,0005254	45,64738623	0,407612499	68,52928179	0,107564
4_cc_area	0,012681322	0,013569973	0,017573578	0,011794482	0,012954369	0,013948458	0,01077	0,010745652	0,00714253	0,008544	0,01173	0,010364296	0,011640234	0,008876354	0,012956539	0,013515494	-19,22276096	0,082597337	19,45381808	0,019004
4_cc_length	0,475132625	0,526184362	0,529724313	0,488569163	0,487528337	0,478973921	0,507144614	0,480869468	0,341678759	0,36999852	0,4534	0,454350296	0,419345053	0,38413873	0,459027164	0,453703458	-2,836458108	0,736203082	13,80155838	0,002134
4_cc_height	0,032749671	0,03063704	0,046234586	0,036577976	0,033949773	0,03905047	0,022234189	0,025650278	0,025675985	0,022811174	0,029890683	0,031088106	0,040704978	0,029658521	0,035922796	0,040256885	-30,34113945	0,004631698	5,627137722	0,196002
4_TTh_area	0,019607518		0,025049301		0,026796287	0,023945884	0,02003	0,01548	0,014461837	0,01786	0,01730157	0,01602	0,017680221	0,016869679	0,017111282	0,020057822	-3,13480627	0,661686468	36,23162893	0,000473
4_CPu_area	0,002522712	0,000499756						0,000874296			0,001261005						-30,66673011		19,8436168	
4_HP_area	0,008518113	0,009600376	0,010580618	0,010027412	0,009501749	0,009140068	0,009087089	0,008122102	0,005068	0,006846413	0,008120226	0,006780279	0,007134624	0,005780763	0,007532496	0,008103762	0,536811182	0,963495165	32,02646129	0,000216
4_Rad_length																				
4_Or_length	0,010495933	0,009910033	0,013072711	0,009454099	0,010101288	0,009949807	0,011151244	0,010102789	0,00863588	0,009966059	0,009387151	0,00789041	0,008407416	0,007866388	0,007815353	0,010306628	15,69592958	0,075505027	21,88850902	0,015902
4_TILpy_area	0,001732867	0,001753747	0,001968586	0,001980988	0,001725907	0,001792208	0,002102	0,001696512	0,001118851	0,001366101	0,001743306	0,001318	0,001307863	0,001218791	0,001634	0,001405427	9,247400169	0,521722381	26,97127183	0,000602
4_TILpy_length	0,171485406	0,189484846	0,19020985	0,184541848	0,168205017	0,165716049	0,176452535	0,173245486	0,119409127	0,150759092	0,158262339	0,150000707	0,153430721	0,128857421	0,148649146	0,15391845	4,107020998	0,614529388	19,76492211	0,000430
4_Mol_length																				
4_DG_area	0,00066232	0,000757591	0,0007997	0,000716438	0,00073842	0,000653743	0,000623372	0,00065676	0,000395447	0,000585826	0,000795852	0,000559516	0,000525434	0,000462108	0,000587988	0,000643271	-5,093813415	0,695703952	21,09701584	0,014637
4_DG_length	0,103602388	0,105226396	0,101755688	0,103914769	0,101571818	0,101192239	0,07767429	0,087693367	0,060537528	0,078053025	0,089585528	0,093306843	0,089046973	0,079546852	0,092215146	0,095248473	-15,40264004	0,030765584	14,53075608	0,002623
4_fi_area	0,002449461	0,002490847	0,00348992	0,003011023	0,003562422	0,003031279	0,002356	0,002281	0,001772	0,002179	0,002387	0,001522	0,002369695	0,002042338	0,002429435	0,002552508	-3,16452499	0,757633409	35,57080761	0,002360
4_aca_area			0,000868465	0,000655543	0,00092004	0,000720396		0,000577337	0,000398127	0,000638425	0,000708136	0,000498641		0,000548489	0,000704503	0,000738446	-15,89636719	0,267968567	23,68008405	0,042733
4_sm_area				0,00041234	0,000779121				0,000351254	0,000347409	0,000359399	0,000814448		0,000404123	0,000389565	0,00053198	-30,12014331	0,332939088	19,16921883	0,381465
4_f_area									0,000177459					0,000259079	0,000280647	0,000455048	-46,48261816			
4_och_area																				
4_VMHvl_area						0,001175453	0,001124789		0,000755426		0,0009125	0,001133867	0,001322487				-16,2824361	0,439694797	4,675328762	
4_Pn_area			0,001628809		0,001249565	0,002835979			0,002145767											
4_SN_area																				
4_fp_area																				
4_Cg_area	0,005648	0,005149791	0,006238397	0,005221548	0,007947354	0,006469229	0,005099	0,00412	0,004677892	0,00401	0,004739	0,004537544	0,004963609	0,005798434	0,004735161	0,005830723	-12,23394124	0,115105215	19,83320672	0,019369
4_Cg_height	0,080555178	0,078740872	0,099423958	0,079466594	0,113394113	0,090352429	0,07146	0,07297	0,096014575	0,09091	0,08704	0,060806194	0,106217263	0,097472102	0,072329765	0,091824186	-3,618000199	0,760294403	5,089037782	0,752325
4_DS_area	0,000948943	0,001225748	0,001018583	0,001238565	0,001001123	0,001028646	0,000798632	0,000840126	0,000458481	0,0006224	0,000801802	0,000540345	0,000676905	0,000542268	0,000835433	0,000749933	-1,621234403	0,909137677	55,82583297	0,000063
4_InfC_area		0,010905039	0,008161525	0,009261363	0,011332459	0,00793898	0,00546836	0,007576811	0,004389073	0,005467175	0,005386511		0,006098172		0,007184053	0,005871506	-6,678104478	0,612878523	55,17162708	0,000702
4_SupC_area			0,049070835		0,048204764	0,042426747	0,033492121	0,030629671	0,031351657	0,03332817	0,03829		0,038036198		0,033726457	0,038648419	-13,38218647	0,01058513	25,26459269	0,002094

Discussion

I. Effets des variants faux-sens sur l'auto-inhibition de KIF21B

Au cours de ce travail de thèse, nous avons identifié 4 variants pour le gène *KIF21B* chez 4 individus présentant une agénésie du corps calleux (ACC) et une microcéphalie, associés à une déficience intellectuelle (DI) plus ou moins sévère. Trois des patients présentent une mutation hétérozygote faux-sens dans différents domaines de *KIF21B* (p.Ile678Leu dans le domaine coiled-coil – Patient 1; p.Gln313Lys dans le domaine moteur - Patient 2; et p.Ala1001Thr dans le domaine d'auto-inhibition, Patient 3) tandis que le quatrième patient possède une duplication (p.Asn988Serfs*4 – Patient 4) conduisant à un codon-stop prématuré (**Article 1, Fig.1**). Des analyses de séquençage et de RT-qPCR, ont montré que les transcrits c.2959_2962dup (p.Asn988Serfs*4) étaient dégradés, conduisant à une haplo-insuffisance. Pour étudier les conséquences fonctionnelles du variant tronquant p.Asn988Serfs*4 (haplo-insuffisance), nous avons procédé à des expériences d'électroporation *in utero* (EIU) de sh-RNA chez la souris et mis en évidence que la déplétion de *Kif21b* conduit à une altération de la migration radiaire, phénotype sauvé par la co-expression du gène sauvage.

Afin de comprendre les mécanismes pathologiques à l'origine des malformations retrouvées chez les patients, nous avons analysé *in vivo* les conséquences de la surexpression des 3 variants faux-sens chez la souris et chez le poisson zèbre. Nos résultats montrent que l'expression ectopique des variants récapitulent les phénotypes neuro-développementaux observés chez les patients. *En effet, l'expression du variant* p.Gln313Lys conduit à une diminution de la taille de la tête chez le poisson mais n'empêche pas la formation du corps calleux. Au contraire, l'expression du variant p.Ile678Leu affecte la formation des connections intra- et inter-corticales chez la souris sans affecter la taille du cerveau.

Des analyses plus poussées nous ont permis de mettre en évidence que les variants *KIF21B* altèrent la fonction auto-inhibitrice de KIF21B, rendant la protéine mutée hyperactive pour la fonction motilité, conduisant ainsi aux défauts de migration radiaire et d'axogenèse. En plus de son effet « gain de fonction », le variant p.Ile678Leu conduit à des défauts de branchements callosaux par un effet dominant négatif.

A. Notions de dominant-négatif (DN) et de gain de fonction (GF)

Les mutations de types faux-sens sont des mutations ponctuelles responsables du remplacement d'un acide-aminé (aa) par un aa différent au sein de la séquence protéique. Cette modification d'aa peut être tolérée et ne pas avoir de conséquence délétère pour la cellule, ce qui explique que de nombreuses variations de séquence de type faux-sens n'ont pas d'effet pathogène et constituent par ailleurs une part importante des polymorphismes. L'effet délétère de ces mutations est fonction du type d'aa touché et de la localisation de cet aa au sein de la protéine. Ainsi, les mutations faux-sens peuvent affecter la stabilité, la localisation ou la maturation de la protéine, ainsi que sa structure (altération du repliement protéique) ou encore ses interactions fonctionnelles avec

d’autres protéines. Des expériences sont nécessaires pour déterminer les conséquences d’une mutation nucléotidique faux-sens dans la pathologie.

De manière générale, les mutations faux-sens peuvent avoir trois conséquences majeures sur la fonction de la protéine : une haplo-insuffisance, un effet **dominant-négatif** (DN) ou un effet **gain de fonction** (GF) (Wilkie, 1994).

Les mutations a effet DN sont dominantes (un allèle muté suffit pour générer le phénotype) et produisent une protéine mutée qui interfère avec la fonction de l’allèle sauvage chez l’hétérozygote (**Figure 59**). Ces mutations empêchent alors la fonction de la protéine sauvage, soit en interagissant avec la protéine sauvage, soit en interagissant avec les mêmes éléments que la protéine sauvage. Les mutations GF confèrent une activité nouvelle ou renforcée de la protéine, ce qui est délétère pour la cellule (**Figure 59**). On distingue alors deux cas : 1) la mutation GF conduit à une hyperactivation de la protéine ou 2) la mutation GF produit une protéine dont la fonction est différente de celle de la protéine sauvage. Dans le cas de l’**haplo-insuffisance**, la mutation du gène, qui est présente à l’état hétérozygote, conduit à une copie non fonctionnelle du gène qui est suffisante pour induire la maladie (l’autre copie sauvage du gène n’étant pas suffisante pour compenser le déficit). Enfin, une mutation par **perte de fonction** abolie la fonction du gène et nécéssite pour se manifester une atteinte des deux allèles (Wilkie, 1994).

Une façon simple de distinguer si une mutation dominante exerce son effet délétère par un effet GF ou par effet DN est de procéder à un sauvetage du phénotype par expression de doses croissantes de protéines sauvages. Dans le cas d’une mutation de type DN, le phénotype est sauvé par ajout de doses croissantes de protéine sauvage. En revanche, lorsque la mutation est GF, l’ajout de protéines sauvages n’a pas d’effet sur le phénotype (Wilkie, 1994).

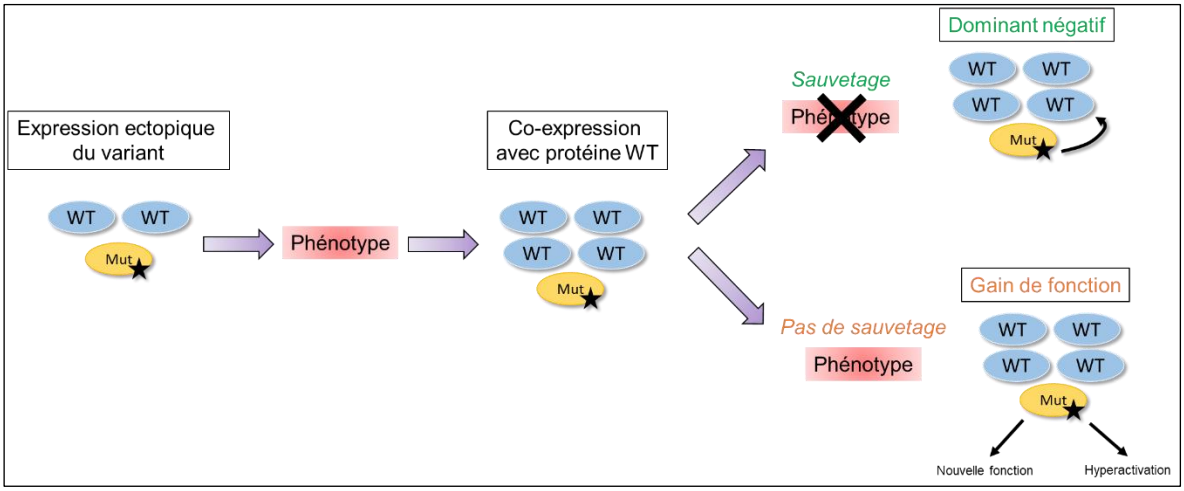


Figure 59 : Les mutations dominantes peuvent avoir un effet gain de fonction ou dominant négatif. Des mutations (Mut) à effet dominant négatif conduisent à la synthèse d'une protéine qui interfère avec la fonction de la protéine sauvage (WT). En revanche, des mutations à effet gain de fonction altèrent l'expression spatiale et/ou temporelle de la protéine mutée et/ou confèrent à la protéine mutée une nouvelle activité et/ou augmentent son activité. Un sauvetage du phénotype par expression de doses croissantes de protéines sauvages permet de distinguer ces deux mécanismes.

B. Les variants conduisent à une atténuation de l'auto-inhibition

Nous avons mis en évidence par EIU que les trois variants faux-sens altèrent la migration radiaire des neurones de projection de façon plus ou moins sévère (**Article 1, Fig. 3**). De manière intéressante, la co-expression de la forme sauvage de *KIF21B* avec les trois variants faux-sens (rapports 1:1 ou 1,5:1) ne restaure pas le phénotype de migration, suggérant donc que ces trois variants ont un effet **gain de fonction** sur le phénotype migratoire. De la même façon, nous avons montré que le variant p.Ile678Leu affecte spécifiquement la formation des connections inter-corticales chez la souris, également par un effet de GF.

Une régulation fine de l'activité motrice des kinésines est importante pour de nombreux aspects du développement neuronal. Ceci est en effet mis en évidence par le fait que des mutations dans les kinésines sont retrouvées chez des individus présentant différentes anomalies neuro-développementales (MDC, malformations du corps calleux, ciliopathies…) le plus souvent associées à de l'épilepsie et de la DI (Introduction chapitre 2, tableau 2). Le mécanisme majeur utilisé pour réguler les fonctions des kinésines est l'auto-inhibition. L'auto-inhibition varie d'une kinésine à l'autre, et implique une ou plusieurs interactions intramoléculaires entre le domaine moteur et le domaine coiled-coil ou carboxy-terminal, qui interfèrent avec l'attachement aux MTs, l'hydrolyse d'ATP ou les deux (Introduction chapitre 2, § I-B-1-c-i). Dans le cas de KIF21B, l'auto-inhibition est permise par l'interaction de la région régulatrice située dans le domaine coiled-coil (rCC ; aa 930-1010) avec le domaine moteur (aa 1-660) (van Riel et al., 2017).

De façon intéressante, la perte de ces interactions intramoléculaires chez certaines kinésines (Kif21a, Kif1a, kinésine-1) entraîne l'inactivation de la fonction auto-inhibitrice conduisant ainsi à l'activation excessive de ces kinésines et à l'apparition de divers phénotypes tels qu'une altération

du nombre et de la taille des synapses dendritiques (Niwa et al., 2016), des défauts de morphologie et de guidage axonal (van der Vaart et al., 2013), ou encore une altération du transport des vésicules excrétées du Golgi dans les dendrites (Kelliher et al., 2018). Ainsi, les trois mutations faux-sens retrouvées le long du gène *KIF21B* pourraient interférer dans le repliement de KIF21B et ainsi amoindrir son auto-inhibition. L'effet GF médié par les variants *KIF21B* pourrait donc être la conséquence d'un amoindrissement de la fonction auto-inhibitrice de la kinésine, rendant ainsi la protéine « hyperactivée ». Plusieurs arguments vont en effet dans ce sens :

Premièrement, l'expression de la forme constitutivement active de KIF21B pour laquelle le domaine rCC est délété entraîne un défaut de migration radiaire des neurones de projection. Deuxièmement, la surexpression de doses croissantes de la forme sauvage de KIF21B altère également la migration neuronale, suggérant ainsi que l'hyperactivation de KIF21B suffit à altérer la migration des neurones de projection. Troisièmement, Van der Vaart et coll., ont testé les conséquences de trois mutations faux-sens (impliquées dans la maladie CFEOM1) dans le gène *KIF21A* (appartenant à la même famille que KIF21B), sur l'auto-inhibition de la kinésine. Deux des mutations faux-sens sont situées dans le domaine moteur, et la troisième est située dans le domaine rCC (van der Vaart et al., 2013). Par co-immunoprécipitation (co-IP), ils ont montré que les trois variants faux-sens empêchent l'interaction entre le domaine moteur et le domaine coiled-coil. Ces résultats montrent que ces mutations interfèrent avec la fonction d'auto-inhibition de KIF21A. Quatrièmement, le domaine rCC de Kif21a (également situé dans la région coiled-coil) interagit avec le domaine moteur de Kif21b, suggérant une conservation du mécanisme d'auto-inhibition entre Kif21a et Kif21b (Bianchi et al., 2016). Nous effectuons actuellement des analyses biochimiques de co-IP et espérons montrer une perte d'interaction entre le domaine coiled-coil et le domaine moteur de KIF21B avec les variants. Cinquièmement, la surexpression du variant p.Ile678Leu rendu immobile par délétion du domaine de liaison de l'ATP (p.Ile678Leu-ΔATP) diminue la sévérité des phénotypes de migration et d'axogenèse comparé à la condition p.Ile678Leu. Ceci suggère que le variant p.Ile678Leu induit à une hypermobilité de KIF21B, ce qui conduirait au phénotype de migration et de connectivité.

Nos résultats suggèrent ainsi que les trois mutations faux-sens altèrent l'auto-inhibition de KIF21B. Toutefois ce mécanisme reste à démontrer pour les autres variants (par EIU des constructions p.Glu313Lys-ΔATP et p.Ala1001Thr-ΔATP).

1. Quels sont les mécanismes moléculaires impliqués dans l'atténuation de l'auto-inhibition ?

In vitro, l'auto-inhibition de KIF21B régule à la fois sa fonction motrice et son activité régulatrice sur les MTs. Cependant, contrairement aux autres kinésines et à KIF21A, l'interaction auto-inhibitrice de KIF21B n'abolie pas complètement ses fonctions, puisqu'il a été observé que la

protéine tronquée pour son domaine rCC possède une activité motrice et régulatrice des MTs résiduelle (Muhia et al., 2016; van Riel et al., 2017).

Hyperactivation de la fonction mobilité. Comme nous venons de le voir, la perte de processivité (p.Ile678Leu-ΔATP) limite grandement le phénotype induit par le variant p.Ile678Leu, montrant que l'auto-inhibition de KIF21B régule également sa fonction motrice *in vivo*. Est-ce que l'inhibition de l'activité motrice de KIF21B est causée par une diminution de sa liaison aux MTs, par le relargage d'ADP, les deux ou d'autres mécanismes ?

Nos résultats avec la construction p.Ile678Leu-ΔATP suggèrent que la liaison à l'ATP ou l'hydrolyse d'ATP en ADP pourraient participer à l'autorégulation de KIF21B. Est-ce que la liaison aux MTs est impliquée ? Ceci reste à démontrer. L'homodimérisation pourrait être un autre des mécanismes impliqués. En effet, pour certaines kinésines, l'auto-inhibition empêche la dimérisation et donc la formation d'un domaine moteur fonctionnel capable de se lier aux MTs (Voir introduction chapitre 2, § I-B-1-c-ii). Puisque Kif21b fonctionne sous forme de dimère (Ghiretti et al., 2016; van Riel et al., 2017), l'auto-inhibition pourrait empêcher l'homodimérisation de Kif21b et, par conséquence, inhiber sa fonction de transport de cargos. Les mutations pourraient alors interférer avec ce mécanisme. En empêchant l'interaction du domaine rCC avec le domaine moteur, les variants resteraient alors sous forme dépliée ce qui pourrait entraver la séparation des deux monomères. KIF21B mutée resterait alors sous forme dimérique constitutivement active.

Hyperactivation d'une autre fonction. Il est intéressant de noter que la forme immobile du variant (p.Ile678Leu-ΔATP) mène, même si de façon moins drastique, à des défauts de migration, suggérant que d'autres fonctions de KIF21B pourraient être augmentées par le relâchement de l'auto-inhibition. Le rôle de KIF21B sur la dynamique des MTs pourrait être une de ces autres fonctions. En effet, Van Riel et coll., montrent que l'auto-inhibition de KIF21B est impliquée dans la régulation des pauses des MTs, et l'inactivation de KIF21B inhibe ses fonctions régulatrices sur le réseau de MTs (van Riel et al., 2017).

Donc, en plus d'exacerber la fonction motrice de KIF21B, les variants pourraient également altérer la fonction de régulation du réseau de MTs médié par KIF21B. Cette hypothèse reste toutefois à démontrer. Il serait intéressant de tester l'effet sur la migration du variant p.Ile678Leu qui a perdu son domaine d'interaction avec les MTs. Un prérequis à cela serait de définir avec précision les domaines d'interaction avec les MTs. A ce jour, seuls deux domaines d'interactions aux MTs ont été identifiés par deux études différentes : le domaine aa1-660 (qui comprend le domaine moteur et une partie de la région coiled-coil) et le domaine aa696-1163 (dans la région coiled-coil) (Ghiretti et al., 2016; van Riel et al., 2017). Van Riel et coll., ont également identifié le domaine aa1236-1624 (dans la partie WD-40) comme interagissant avec les MTs (van Riel et al., 2017), mais leurs résultats sont contredits par l'étude de Ghirretti et coll. De plus, la position exacte des domaines de liaison aux MTs n'est pas connue.

Les fonctions potentielles de KIF21B dans la régulation de la dynamique des MTs restent par ailleurs assez floues : il a été montré que dans les neurones déplétés pour *KIF21B*, le réseau de MTs est déstabilisé (Muhia et al., 2016), suggérant ainsi que KIF21B permet la stabilisation des MTs dans les neurones. Au contraire, Ghiretti et coll., montrent dans ces mêmes cultures de neurones que la perte de fonction de *KIF21B* promeut à la fois la croissance et la catastrophe des MTs dans les dendrites (Ghiretti et al., 2016) ce qui suggère que KIF21B favoriserait non pas la stabilité, mais l'instabilité (et donc la dynamique) des MTs.

Comme expliqué dans l'introduction, la migration radiaire et l'élongation axonale nécessitent le remodelage du cytosquelette de MTs, qui est régulé par diverses MAPs et kinésines qui stabilisent ou déstabilisent les MTs (Chapitre I, §IV-B-4-a; §V-B-4-b). Même si les fonctions exactes de KIF21B dans la dynamique du réseau de MTs restent à élucider, on peut imaginer que les variants puissent altérer la dynamique du réseau de MTs dans les neurones, soit en le stabilisant ou en le déstabilisant de manière trop forte, et être ainsi à l'origine des phénotypes. Nous sommes actuellement en train de tester cette hypothèse.

Nous sommes partis du fait que la fonction normale de Kif21b serait de favoriser l'instabilité dynamique du réseau de MTs dans les neurones en migration (Ghiretti et al., 2016). En atténuant l'auto-inhibition de KIF21B, nous pensons que les variants (notamment p.Ile678Leu) pourraient entraîner une trop forte déstabilisation du réseau. Nous souhaitons procéder à des expériences de sauvetage du phénotype de migration *in vivo*, en utilisant une drogue stabilisatrice du réseau de MTs : l'épothilone D (EpoD). Si notre hypothèse est valide, alors l'application d'épothilone D permettrait de sauver, au moins en partie, le phénotype de migration radiaire induit par le variant.

Contrairement au taxol, l'EpoD traverse la barrière hémato-encéphalique et pénètre dans le cerveau (Brunden et al., 2010; Fellner et al., 2002). L'injection intra-péritonéale de faibles doses d'EpoD (2 à 3 mg/kg, 1x par semaine pendant 3 mois) chez la souris adulte n'affecte pas le développement ni le comportement des souris (Brunden et al., 2010; Nishioka et al., 2019). Le niveau d'EpoD reste relativement stable dans le cerveau pendant les 4 premiers jours suivant l'injection puis son taux diminue jusqu'à ne plus être détectable au bout de 10 jours (Brunden et al., 2010). Par ailleurs, l'administration de faibles doses d'EpoD chez la souris gestante n'affecte pas le développement des embryons (Andrieux et al., 2006).

Les conséquences de l'administration d'EpoD chez l'embryon n'ayant jamais été testées, nous avons d'abord voulu savoir si l'EpoD pouvait affecter la migration et les connections callosales intra- et inter-corticales en conditions contrôles. Nous avons d'abord procédé à une injection de 2,5mM d'EpoD par EIU à E15,5, suivie de deux injections intra-péritonéales à P1 et P6 (2 mg/kg). Bien que les souriceaux soient tous vivants, nous observons à P8 un élargissement de l'hémisphère électroporé chez tous les embryons injectés. L'injection de 2,5 mM d'EpoD *in utero* étant visiblement délétère pour le développement du cerveau, nous avons diminué la dose injectée de 10 fois (EIU de

0,25mM d'EpoD à E15,5). Nous n'observons plus d'élargissement de l'hémisphère électroporé. Cependant, les souriceaux présentent une altération sévère de la migration neuronale et les branchements intra- et inter- corticaux sont altérés. Dans un troisième test, nous avons procédé à 2 injections intra-péritonéales d'EpoD à P1 et P6 (2 mg/kg) chez des souriceaux non électroporés. Nous n'observons aucun défaut de migration ni de branchements apparent. Nous souhaitons donc procéder à ces injections intra-péritonéales (EpoD ou contrôle DMSO) à P1 et P6 chez des souriceaux électroporés avec le variant p.Ile678Leu.

2. D'autres mécanismes indépendants de la fonction d'auto-inhibition pourraient-ils être impliqués ?

Bien que nos travaux indiquent fortement que les variants faux-sens puissent exercer leurs effets « GF » par une sur-activation de KIF21B, il est également possible que ces variants exercent une nouvelle fonction différente de celle de la protéine sauvage (un GF qui n'est pas lié à une sur-activation de KIF21B). Cette idée est en effet soutenue par le fait que la forme immobile du variant (p.Ile678Leu-ΔATP) conduit quand même à des défauts de migration, même légers.

Cet effet GF pourrait par exemple conduire à 1) la régulation anormale du cytosquelette de MTs ou d'actine (**Article 2**), 2) l'interaction aberrante avec une nouvelle protéine, ou encore 3) le transport d'un cargo normalement non transporté par la protéine sauvage. Cette dernière hypothèse (3) reste cependant peu probable compte tenu du fait que la construction p.Ile678Leu-ΔATP abolie le transport.

Ainsi, il serait nécessaire de compléter nos expériences par des analyses biochimiques pour tester les conséquences des mutations sur l'interaction avec les MTs et les filaments d'actine. Par ailleurs, il serait intéressant d'identifier les cargos transportés par KIF21B, mais également ceux transportés par les variants faux-sens, afin de déterminer s'il existe des différences.

C. Deux mécanismes, même phénotype ?

De façon surprenante, les phénotypes cliniques des patients 3 (mutation faux-sens p.Ala1001Thr dans le domaine d'auto-inhibition) et 4 (duplication c.2959_2962dup, p.Asn988Serfs*4) sont assez similaires et ne présentent pas d'anomalies morphologiques, bien que les mutations qu'ils portent semblent avoir des conséquences moléculaires différentes d'après nos résultats (respectivement « GF » et haplo-insuffisance). Comment expliquer cela ? Nos résultats, essentiellement basés sur la technique de l'EIU, ne permettent pas d'exclure un possible effet DN des variants faux-sens. En effet, des expériences de complémentation du phénotype ne peuvent pas être réalisées avec une quantité de protéine sauvage supérieure à 1,5 unités, puisque l'expression du sauvage altère la distribution neuronale de façon dose dépendante. Par ailleurs, l'expression du variant immobile (p.Ile678Leu-ΔATP) conduit quand même à un léger défaut de migration. Ainsi, il est tout à fait possible que les variants faux-sens interfèrent avec la fonction de la protéine sauvage (par exemple en séquestrant la protéine sauvage ou bien ses protéines

adaptatrices), inhibant ainsi la fonction de KIF21B et conduisant à une haplo-insuffisance. En accord avec cette hypothèse, nous avons mis en évidence que la déplétion de *Kif21b* par shRNA ou bien son inactivation dans le modèle souris, conduit également à une altération du développement cortical avec un retard de migration radiaire (**Article 2**), une microcéphalie et une réduction de l'épaisseur du corps calleux (Kannan et al., 2017, **Résultats préliminaires**). Il serait donc intéressant de regarder si la surexpression des variants faux-sens entraîne une localisation anormale de la protéine KIF21B sauvage au sein des neurones.

D. Un niveau minimal d'auto-inhibition est requis pour le développement cortical normal

Nos analyses montrent que les variants *KIF21B* altèrent la fonction auto-inhibitrice de KIF21B, rendant la protéine mutée hyperactive pour la fonction motilité, conduisant ainsi aux défauts de migration radiaire. Contrairement aux variants *p.Gln313Lys et p.Ala1001Thr,* le variant p.Ile678Leu abolit complètement la migration radiaire et conduit spécifiquement à des défauts d'axogenèse et de branchement callosaux chez la souris. ***Comment expliquer le fait que le variant p.Ile678Leu conduise à des phénotypes plus sévères et plus larges que les deux autres variants?***

Une première hypothèse pour expliquer l'exacerbation des phénotypes par le variant p.Ile678Leu est qu'il soit différemment exprimé comparé aux deux autres variants. Cette hypothèse semble assez peu probable d'après nos résultats. Nous montrons que la surexpression des variants *p.Gln313Lys, p.Ile678Leu et p.Ala1001Thr* n'a pas d'effet sur la production, la stabilité et le renouvellement des différentes constructions mutées. De plus, la localisation des variants n'est pas différente de celle de la protéine sauvage dans des cultures de neurones. L'expression ou la stabilité protéique des variants n'est donc pas à l'origine de cette exacerbation des phénotypes. Ceci suggère donc un rôle potentiel de l'auto-inhibition.

Une seconde hypothèse serait donc que les variants p.Gln313Lys et *p.Ala1001Thr* sur-activent seulement la mobilité de KIF21B tandis que le variant *p.Ile678Leu conduit à l'hyperactivation de plusieurs fonctions de KIF21B.* En accord avec cette hypothèse, on remarque que la surexpression de la construction p.Ile678Leu–ΔATP conduit quand même à l'apparition d'un phénotype léger de migration neuronal, semblable à celui exercé par la surexpression des variants p.Gln313Lys et *p.Ala1001Thr*. Ceci suggère que le variant p.Ile678Leu exacerbe d'autre(s) fonction(s) que la fonction mobilité. Plusieurs expériences peuvent être faites pour tester cette hypothèse. 1) Il faut s'assurer que les variants p.Gln313Lys et *p.Ala1001Thr* altèrent la migration radiaire par un seul effet de sur-activation de la mobilité de KIF21B. Si tel est le cas, alors l'EIU des constructions p.Gln313Lys et *p.Ala1001Thr* rendues immobiles par délétion du domaine de liaison à l'ATP (p.Gln313Lys–ΔATP et *p.Ala1001Thr*–ΔATP) ne devraient pas entraîner de phénotype migratoire et être ainsi semblables au contrôle surexprimant le vecteur vide. 2) Il faut ensuite identifier quelle(s) autre(s) fonction(s) est/sont hyper-activée(s) avec le variant p.Ile678Leu. Comme

expliqué plus haut (§B-1-b), nous pouvons supposer que le variant p.Ile678Leu altère spécifiquement la dynamique du réseau de MTs dans les neurones. En abolissant complètement l'auto-inhibition de KIF21B, le variant p.Ile678Leu pourraient entraîner une trop forte déstabilisation du réseau et être responsable des phénotypes observés.

Puisque les trois mutations ne sont pas situées dans les mêmes domaines fonctionnels de KIF21B, nous pouvons imaginer qu'elles affectent différemment le repliement de KIF21B et donc l'interaction du domaine rCC avec le domaine moteur. Ainsi, les trois variants conduiraient à des niveaux différents d'auto-inhibition de KIF21B. Nous proposons donc un modèle dans lequel un niveau minimal d'auto-inhibition est requis pour le développement cortical normal (**Figure 60**). Dans ce modèle, les variants p.Gln313Lys et p.Ala1001Thr conduiraient à un repliement anormal de KIF21B, atténuant la fonction auto-inhibitrice, ce qui serait responsable d'une sur-activation légère de KIF21B. En revanche, le variant p.Ile678Leu abolirait complètement la fixation du domaine rCC avec le domaine moteur, ce qui résulterait d'une abolition complète de l'auto-inhibition et donc d'une sur-activation beaucoup plus grande de KIF21B. Ainsi, l'hyperactivation plus forte médiée par le variant aurait pour conséquence un arrêt complet de la migration et des défauts de connections intra- et inter-corticaux, phénotypes qui ne sont pas retrouvés avec les variants p.Gln313Lys et p.Ala1001Thr.

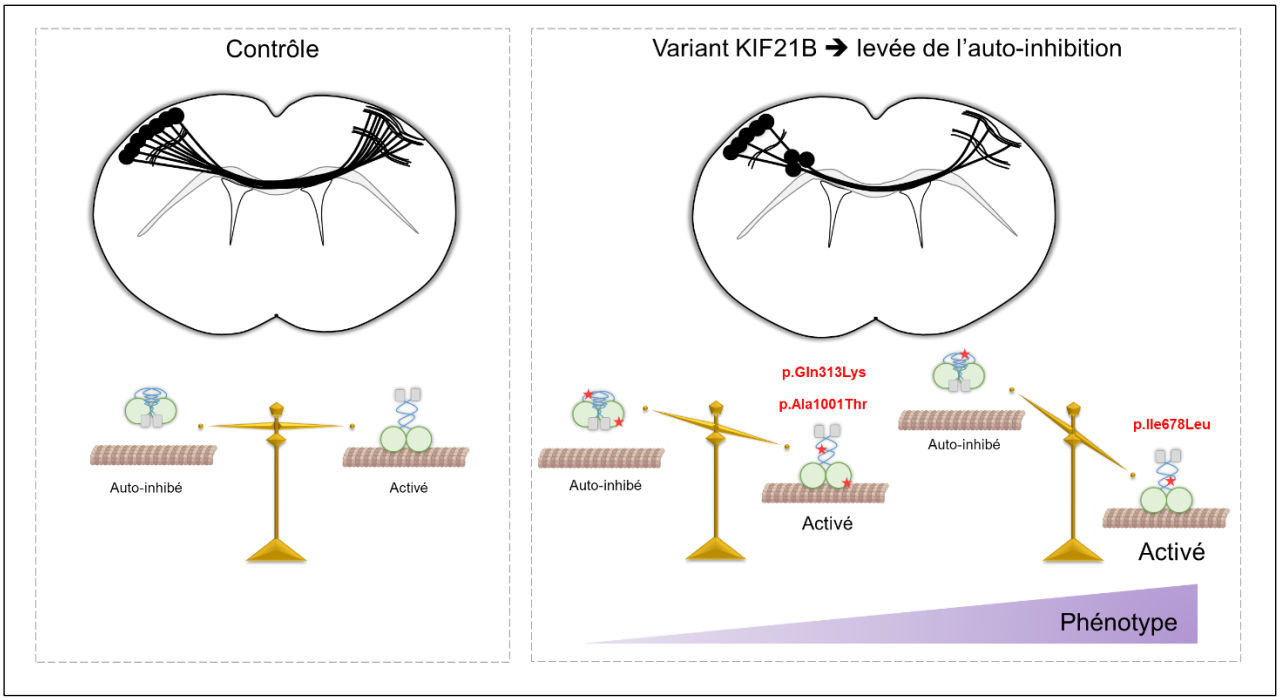


Figure 60 : Un niveau minimal d'auto-inhibition est requis pour le développement cortical normal.
En condition contrôle la balance auto-inhibition/activation de KIF21B est normale. En condition pathologiques, les variants empêchent l'interaction du domaine moteur avec le domaine d'auto-inhibition (rCC) de KIF21B et donc inhibent son repliement conduisant à une atténuation de l'auto-inhibition. Le variant p.Ile678Leu abolirait complètement l'auto-inhibition et conduirait à une activation plus forte de KIF21B, ce qui aurait pour conséquence un arrêt complet de la migration et des phénotypes plus variés, qui ne sont pas retrouvés avec les variants p.Gln313Lys et p.Ala1001Thr.

Une façon relativement simple de confirmer ce modèle est de procéder à des expériences de co-IP et de regarder dans quelles mesures les différentes mutations affectent l'interaction entre le domaine rCC et le domaine moteur de KIF21B. Si l'hypothèse est valide, alors les interactions entre le variant p.Gln313Lys et le domaine rCC d'une part et l'interaction entre le variant p.Ala1001Thr et le *domaine moteur* d'autre part, seront diminuées comparées à l'interaction entre les formes sauvages rCC et *domaine moteur* ; tandis que l'interaction entre le variant p.Ile678Leu et le domaine rCC sera quant à lui complétement abolit.

Jusqu'à présent, le mécanisme d'auto-inhibition a été montré comme impliqué dans plusieurs fonctions cellulaires tels que la régulation du transport intracellulaire (Moua et al., 2011; Niwa et al., 2016), la distribution spécifique de cargos (Kelliher et al., 2018), la synaptogenèse (Niwa et al., 2016) et le guidage axonal (Cheng et al., 2014; van der Vaart et al., 2013) (Introduction chapitre 2, § I-B-1-c-ii). Nos résultats mettent en évidence des **nouveaux rôles physiologiques** pour le mécanisme d'auto-inhibition, et montrent que la régulation précise des fonctions de KIF21B est essentielle pour la migration neuronale et la croissance axonale.

II. Rôles du variant p.Ile678Leu dans l'axogenèse et le branchement axonal

Collectivement, nos résultats montrent que l'expression ectopique du variant p.Ile678Leu induit spécifiquement des défauts d'axogenèse et de branchement callosal chez la souris, récapitulant ainsi les défauts de connections inter-hémisphériques retrouvés chez le patient. De manière surprenante le variant p.Ile678Leu altère l'axogenèse en hyper-activant la mobilité de KIF21B tandis qu'il conduit à des défauts de branchements callosaux par un effet DN sur la fonction mobilité de KIF21B-WT.

Bien que ces résultats semblent en apparence contradictoires, ils montrent cependant que la fonction mobilité de KIF21B est requise pour le branchement et l'axogenèse. Nous pouvons donc supposer que KIF21B régule le transport de différents cargos dans l'axone et dans les branchements collatéraux. L'élongation de l'axone à partir de son cône de croissance, de même que la formation des branches collatérales, requièrent en effet le transport de nombreuses protéines impliquées dans le remodelage des cytosquelettes d'actine et de MTs (Introduction Chapitre I, §IV). Ainsi, le variant p.Ile678Leu pourrait altérer l'élongation de l'axone en hyper-activant le transport d'un cargo spécifique dans l'axone. En parallèle, ce même variant pourrait inhiber la formation des branches collatérales en empêchant le transport de cargos par la protéine sauvage.

Puisque Kif21b régule l'axogenèse et le branchement collatéral par deux mécanismes qui semblent impliquer sa fonction motrice, l'identification des cargos transportés par Kif21b est essentielle pour mieux comprendre les rôles joués par cette kinésine dans ces évènements. Des analyses de spectrométrie de masse permettraient d'identifier les protéines qui interagissent avec

la forme sauvage de KIF21B. Il serait également intéressant d'identifier les protéines qui s'associent avec le variant p.Ile678Leu, afin de les comparer avec celle interagissant avec la forme sauvage.

A. p.Ile678Leu exerce un effet dominant-négatif sur le branchement axonal ipsilatéral dans la couche corticale V

Le variant p.Ile678Leu altère le branchement axonal ipsilatéral par un effet DN sur la fonction mobilité de KIF21B (**Article 1**, **Fig. 6**). En effet, la co-expression du variant p.Ile678Leu avec le gène sauvage *KIF21B*, permet de sauver les défauts de branchement intra-corticaux. En accord avec l'effet DN exercé par le variant p.Ile678Leu sur le branchement axonal, les neurones surexprimant la forme hyper-activée de Kif21b (mKif21b-ΔrCC) présentent un branchement axonal ipsilatéral comparable au contrôle. Ceci suggère que l'auto-inhibition de KIF21B n'est pas impliquée dans ce phénotype. Confirmant cette idée, les neurones surexprimant le variant p.Ile678Leu rendu immobile (p.Ile678Leu-ΔATP) présentent également une altération du branchement axonal.

L'ensemble de nos analyses ayant été faites à P8, il serait intéressant de regarder si les défauts de branchement intra-corticaux sont toujours présents à P22, afin de savoir si le phénotype est transitoire ou permanent. Nos analyses préliminaires tendent vers des défauts permanents.

Comment le variant altère-t-il la fonction de la protéine sauvage ? Bien que l'expression spatiale du variant *p.Ile678Leu* ne semble pas différente de celle de la protéine sauvage dans des cultures de neurones, l'altération potentielle de la localisation de la protéine sauvage KIF21B dans des cellules surexprimant le variant n'a pas été investigué. Ainsi, le variant *p.*Ile678Leu pourrait par exemple séquestrer la protéine sauvage et ainsi inhiber sa fonction. Afin de tester cette hypothèse, nous pourrions par exemple regarder les effets de la déplétion de Kif21b (condition shRNA) sur le branchement axonal. Par ailleurs, le variant *p.Ile678Leu* pourrait entrer en compétition avec les cargos ou bien les protéines adaptatrices qui interagissent avec KIF21B.

Quels sont les mécanismes possibles impliqués dans les défauts de branchement callosal ipsilatéral ? De manière intéressante, la co-expression du variant p.Ile678Leu avec une construction KIF21B immobile (KIF21B-ΔATP) ne parvient pas à sauver le phénotype. Ceci indique que le variant exerce son effet DN sur la fonction motrice ATP-dépendante de KIF21B. Ainsi, le variant p.Ile678Leu pourrait empêcher le transport spécifique de certains cargos dans les branches en interférant avec la protéine sauvage.

Comme décrit dans l'introduction (Chapitre I, §V-B-2), l'immobilisation des mitochondries au niveau des points de branchement est nécessaire à la formation des branches collatérales, mais ne semble pas requise pour la croissance axonale (Courchet et al., 2013). De manière intéressante, Muhia et coll., ont montré une réduction du nombre de mitochondries stationnaires dans des cultures de neurones hippocampiques inactivés pour *Kif21b* (Muhia et al., 2016). Bien que les auteurs suggèrent que ce phénotype soit la conséquence indirecte d'une altération de la dynamique des

MTs médié par la perte de fonction de Kif21b, il n'est pas exclu que Kif21b puisse participer indirectement (via son effet sur la dynamique des MTs) à l'immobilisation des mitochondries au niveau des points de branchement axonaux. Il est possible alors que le variant p.Ile678Leu puisse réduire l'immobilisation des mitochondries au niveau des points de branchements, en inhibant la fonction de la protéine sauvage, et ainsi altérer la formation des branches axonales collatérales. Le variant pourrait également avoir un effet indirect sur le transport de BDNF (Ghiretti et al., 2016), ou sur l'activation du complexe LBK1/NUAK1, requis pour l'immobilisation des mitochondries (Courchet et al., 2013). Enfin, Kif21b pourrait réguler la formation des branches collatérales par le transport d'un cargo encore inconnu à l'heure actuelle.

Les défauts de branchement callosal sont-ils la conséquence du défaut de migration ? L'expression du variant p.Ile678Leu conduisant à un arrêt total de la migration des neurones, on pourrait supposer que les défauts de branchement intra-cortical soient une conséquence indirecte de l'arrêt de migration des neurones. D'après nos résultats, cela ne semble pas être le cas. Premièrement, la co-expression du variant p.Ile678Leu avec le gène sauvage de KIF21B permet de sauver les défauts de branchement intra-corticaux, sans avoir d'effet sur la migration neuronale. Deuxièmement, les neurones callosaux surexprimant la construction p.Ile678Leu-ΔATP migrent normalement dans les couches supérieures, mais échouent à brancher en ipsilatéral. Par ailleurs, ces neurones projettent correctement leur axone au travers de la ligne médiane, ce qui confirme que les défauts de branchements axonaux ne sont pas non plus la conséquence d'une altération de l'axogenèse (Hand et al., 2015).

Les neurones callosaux surexprimant le variant p.Ile678Leu branchent correctement dans l'hémisphère contralatéral. Nos analyses mettent également en lumière un phénotype intéressant. De façon surprenante, les neurones callosaux surexprimant le variant p.Ile678Leu sont capables de brancher correctement dans l'hémisphère contralatéral (**Article 1, Suppl. Fig. 5**), alors qu'ils échouent à brancher en ipsilatéral, dans la couche corticale V. Ceci suggère que des mécanismes différents sont potentiellement impliqués dans ces deux processus. En accord avec cette hypothèse, Hand et coll. montrent que la formation des branches collatérales ipsilatérales semble indépendante du branchement contralatéral terminal. En effet, l'absence de traversée de la ligne médiane par les axones callosaux (et donc le branchement terminal) n'affecte pas la formation et le maintien du branchement intra-cortical ipsilatéral (Hand et al., 2015). Bien que les facteurs extracellulaires impliqués dans le branchement collatéral ipsilatéral semblent sécrétés localement dans la couche V (Hand et al., 2015; Harwell et al., 2012), les facteurs intrinsèques aux neurones de projection callosal permettant le branchement ipsilatéral demeurent inconnus à l'heure actuelle. Ainsi le variant p.Ile678Leu pourrait constituer un bon modèle d'étude pour identifier et comprendre les mécanismes intrinsèques impliqués spécifiquement dans le branchement callosal ipsilatéral.

Quels sont les conséquences physiologiques d'une altération du branchement intra-cortical ? Les axones des neurones de projection callosal de la couche II/III projettent verticalement vers la couche V, et se développent horizontalement au sein de cette couche, pour établir des connexions locales avec les cellules voisines (Anastasiades and Butt, 2012; Letzkus et al., 2006; Sjöström and Häusser, 2006). L'altération de l'activité synaptique entre ces deux couches pourrait donc inhiber localement la transmission de l'information nerveuse et induire un défaut de transmission neuronale des neurones de la couche corticale V, qui projettent entre autre vers la moelle épinière et le tronc cérébral.

Bien que l'importance des connections callosales inter-corticales est soulignée par le fait qu'une altération du transfert d'information entre les deux hémisphères conduit à des malformations du corps calleux qui peuvent être à l'origine de déficits cognitifs (Voir Introduction Chapitre I, §V-C-4), des anomalies qui impliquent des défauts de branchement callosaux ipsilatéral ou contralatéral ne sont pas diagnostiqués chez l'humain et les conséquences physiologiques (si elles existent) de ces altérations ne sont donc pas connues.

B. p.Ile678Leu exerce un effet « gain de fonction » sur l'axogenèse

Nous montrons par EIU à E15,5 que la surexpression du variant p.Ile678Leu dans les neurones callosaux conduit à une diminution du nombre de neurones qui projettent leur axone au travers de la ligne médiane (**Article 1, Fig. 5**). Ces défauts de projection axonale étant présents de P4 à P22, suggèrent qu'il ne s'agit pas d'un retard d'innervation mais bien d'une altération de la formation des projections. Par ailleurs, nous n'observons pas de projections axonales aberrantes vers d'autres commissures dans nos expériences d'EIU. De plus, les neurones callosaux toujours capables d'étendre un axone, branchent dans l'hémisphère en contralatéral. Ces résultats montrent que les défauts d'innervation ne sont pas la conséquence d'une altération du guidage axonal. Nous montrons également que les neurones surexprimant le variant p.Ile678Leu expriment correctement le marqueur des couches corticales superficielles Cux1 (**Article 1, Suppl. Fig. 3**), ce qui suggère que l'altération de la formation de l'axone n'est pas due à un problème de spécification neuronale.

Nos résultats suggèrent donc fortement que l'altération de la formation des projections axonales des neurones surexprimant le variant p.Ile678Leu pourrait être la conséquence d'un défaut d'élongation axonale (axogenèse).

Les défauts d'élongation axonale sont-ils la conséquence du défaut de migration ? Etant donné qu'une partie de ces neurones s'accumulent dans la substance blanche, on pourrait supposer que les défauts d'axogenèse soient une conséquence indirecte de l'arrêt de migration. Les neurones arrêtés pourraient empêcher physiquement le passage des axones au travers de la ligne médiane. Cependant, les cultures primaires de neurones corticaux exprimant le variant p.Ile678Leu présentent une diminution de la longueur du plus long neurite comparé à la condition contrôle. Ces résultats indiquent donc que les défauts d'axogenèse semblent être indépendants de la migration.

Une façon de confirmer cela *in vivo* serait d'effectuer un marquage antérograde de l'ensemble des projections axonales callosales en utilisant un colorant lipophile fluorescent (DiI) (Armentano et al., 2006; Hu et al., 2003), chez les souriceaux électroporés avec le variant p.Ile678Leu, et de regarder si les projections sont positives pour les deux marqueurs. Si comme nous le pensons, les défauts d'axogenèse sont indépendants du phénotype migratoire, alors nous observerons une diminution du nombre d'axones doublement marqués dans la condition électroporée avec le variant p.Ile678Leu, contrairement au contrôle. Puisque le colorant fluorescent ne diffuse que dans les neurones ayant correctement migré, ces expériences permettraient de savoir quels sont les neurones qui ne projettent pas (les neurones capables de migrer et/ou ceux arrêtés dans la substance blanche).

Quels sont les mécanismes impliqués dans les défauts d'axogenèse ? La co-expression du variant p.Ile678Leu avec la forme sauvage de KIF21B (KIF21B-WT) ne permettant pas de restaurer le phénotype, suggère que le variant exerce un effet GF, probablement via une hyperactivation de la fonction de KIF21B. En accord avec cette hypothèse, nous montrons que 1) les neurones surexprimant la forme constitutivement active de KIF21B (KIF21B-ΔrCC) échouent également à projeter leur axone au travers de la ligne médiane *in vivo* ; et 2) la surexpression du variant p.Ile678Leu ou de 2 unités de protéine sauvage (KIF21B-WT), présentent une diminution de la longueur du plus long neurite comparé à la condition contrôle *in vitro*. 3) Enfin, les neurones callosaux surexprimant le variant p.Ile678Leu rendu immobile (p.Ile678Leu-ΔATP) ne présentent plus de défauts de projections axonales. Nos résultats montrent que la surexpression de cette construction diminue la sévérité des phénotypes de migration et d'axogenèse comparé à la condition p.Ile678Leu. Ainsi, le variant p.Ile678Leu exerce son effet délétère en hyper-activant la fonction mobilité de KIF21B.

L'élongation axonale se fait à partir du cône de croissance et implique le remodelage des cytosquelettes d'actine et de MTs par leurs protéines régulatrices associées. Le transport des différents composants du cytosquelette et de leurs protéines régulatrices, du soma vers la terminaison axonale est donc essentiel et permis par les kinésines. Comme décrit dans l'introduction (Chapitre II, §V-B-4), l'altération de la fonction des kinésines conduit à une altération de la croissance axonale. Kif21b étant impliqué dans le transport axonal (Lipka et al., 2016), on peut donc imaginer que la fonction d'auto-inhibition pourrait permettre la localisation spécifique de certains cargos dans un compartiment neuronal donné (dans notre cas, le cône de croissance), comme il a récemment été montré pour la kinésine-1 (Kelliher et al., 2018). Ainsi, l'inactivation de la fonction auto-inhibitrice du variant p.Ile678Leu pourrait entraîner la localisation anormale d'un ou plusieurs cargo(s) dans le cône de croissance et conduire alors à une altération de l'axogenèse.

Puisque KIF21B est également impliqué dans la régulation du cytosquelette de MTs (Ghiretti et al., 2016; Muhia et al., 2016), on peut imaginer qu'il pourrait jouer un rôle dans la croissance axonale par un effet direct sur la régulation de la dynamique des MTs. Cette hypothèse est supportée

par les faits que 1) Kif21b est enrichi dans le cône de croissance (Labonté et al., 2013; **Article 2**) et 2) nos analyses indiquent que Kif21b semble réguler la division (et donc potentiellement la dynamique) du cône de croissance (**Article 2**, **Fig. 4**). Le variant p.Ile678Leu constitutivement actif pourrait donc agir sur la dynamique du cytosquelette de MTs et conduire à une trop forte déstabilisation des MTs, altérant ainsi l'axogenèse (Srivatsa et al., 2015).

Par ailleurs, nous montrons que Kif21b colocalise avec les filaments d'actine dans les cônes de croissance (**Article 2**, **Fig. 1**), ce qui suggère une fonction possible de Kif21b dans la régulation de la dynamique de l'actine. Comme décrit dans l'introduction (Chapitre I, §V-B-4), la protéine Rac1 stimule la croissance axonale en agissant sur le remodelage du cytosquelette d'actine au niveau du cône de croissance, par l'intermédiaire de PAK1 et de Shootin-1 (Toriyama et al., 2013; Goley and Welch, 2006; Korobova and Svitkina, 2008). Puisqu'il a récemment été montré que Kif21b régule indirectement l'activité de Rac1, par l'intermédiaire de la protéine activatrice Elmo1 (Morikawa et al., 2018), nous pouvons donc supposer que le variant p.Ile678Leu constitutivement actif pourrait séquestrer trop fortement la protéine Elmo1, altérant ainsi le cycle d'activation de Rac1. Rac1 deviendrait alors toujours inactif, conduisant à un défaut d'axogenèse, par déstabilisation des filaments d'actine à la périphérie du cône de croissance.

Ainsi, KIF21B pourrait être requis pour l'axogenèse via le remodelage de ces deux cytosquelettes (actine et MTs) dans le cône de croissance. De ce fait, il serait intéressant de regarder si la surexpression du variant entraîne spécifiquement des défauts de morphologie ou de dynamique du cône de croissance, par vidéo-microscopie dans des cultures de neurones corticaux transfectées. Nous pourrions également procéder à des expériences de vidéo-microscopie de coupes organotypiques électroporées et regarder si l'élongation de l'axone est altérée dans le cas de la surexpression du variant. Ce type d'expérience a déjà été réalisée sur des coupes organotypiques de cerveau de hamster à P0, afin de suivre la croissance des axones callosaux au travers de la ligne médiane (Hutchins et al., 2011). Nous pourrions également réaliser des analyses biochimiques et tester les conséquences de l'expression du variant p.Ile678Leu sur la stabilité des cytosquelettes d'actine et de MTs *in vitro*.

III. Kif21b et microcéphalie

A. La microcéphalie des souris *Kif21b*$^{-/-}$ semble apparaître au cours du développement post-natal

Des études précédentes menées par l'équipe de Binnaz Yalcin ont révélé que les souris knock-out (KO) homozygotes (*Kif21b*$^{-/-}$)âgées de 16 semaines présentent une microcéphalie, une diminution de l'épaisseur corticale et une hydrocéphalie (Kannan et al., 2017). Dans le but de savoir à quel moment ces anomalies apparaissent (notamment la microcéphalie), nous avons commencé des analyses histologiques neuro-anatomiques à P7 (**Résultats préliminaires**). Nos analyses n'ont révélé qu'une légère réduction de la taille globale du cerveau chez les souris *Kif21b*$^{-/-}$, ce qui suggère

que la microcéphalie apparaît plutôt pendant le développement post-natal. Par ailleurs, nous avons également détecté une légère réduction de la taille du CC et de l'hippocampe. Nous n'avons observé aucune différence entre les mâles et les femelles, bien que les phénotypes semblent plus sévères et plus larges chez les femelles. Globalement, nos résultats indiquent que les anomalies neuro-anatomiques précédemment observées chez les jeunes souris KO (Kannan et al., 2017), apparaissent probablement après la naissance.

Étonnamment, nos analyses histologiques montrent que les souris hétérozygotes (*Kif21b*$^{+/-}$) présentent une macrocéphalie à P7, vraisemblablement associée à une augmentation globale taille de presque toutes les régions du cerveau (**Résultats préliminaires**).

L'ensemble de ces résultats doit être complété par de nouvelles analyses histologiques à 16 semaines de développement (P120) : 1) Nous souhaitons confirmer que les souris *Kif21b*$^{-/-}$ présentent en effet une microcéphalie à l'âge adulte, puisque le volume cérébral de ces souris ne semble pas affecté d'après nos analyses IRM. Notons toutefois que l'imagerie IRM n'est pas adaptée pour détecter des réductions de taille inférieures à 15-20% ; 2) Nous voulons confirmer que les défauts neuro-anatomiques apparaissent effectivement après la naissance. En effet, il n'est pas possible de comparer précisément les résultats obtenus à P7 avec ceux obtenus à P120, puisque le plan de coupe (respectivement coronal et sagittal) est différent. La nouvelle cohorte d'animaux (mâles et femelles, 3 génotypes) sera analysée dans les mêmes conditions que les animaux à P7, afin de pouvoir conclure quant à la l'évolution des phénotypes ; 3) Enfin, nous souhaitons conclure de façon claire concernant la morphologie du cerveau chez les souris *Kif21b*$^{+/-}$. Nous procéderons également à des analyses neuro-anatomiques à l'E18.5 afin de déterminer si les anomalies cérébrales (telles que la macrocéphalie) observées chez les souris *Kif21b*$^{+/-}$ à P7 sont présentes plus tôt au cours du développement.

B. L'expression ectopique du variant p.Gln313Lys entraîne une réduction globale de la taille de la tête chez le poisson zèbre.

La mutation faux-sens p.Gln313Lys, retrouvée dans le domaine moteur de KIF21B, conduit à une microcéphalie primaire (c'est-à-dire présente à la naissance) chez le patient 2. De façon intéressante, l'*expression du variant* p.Gln313Lys conduit spécifiquement à une réduction physiologiquement significative de la taille de la tête chez le poisson zèbre, tandis que ce même variant n'a pas d'effet sur la formation des connections intra- et inter-corticales chez la souris (**Article 1**).

Par quels mécanismes le variant p.Gln313Lys conduit-il au phénotype de microcéphalie ? Nous pouvons d'abord exclure le rôle potentiel de la fonction d'auto-inhibition de KIF21B. D'après notre modèle (**Figure 60**), les variants p.Gln313Lys et p.Ala1001Thr conduiraient à une atténuation de l'auto-inhibition de KIF21B tandis que le variant p.Ile678Leu abolirait complètement l'auto-inhibition. Si l'auto-inhibition était impliquée dans le phénotype de

microcéphalie, alors les variants p.Ala1001Thr et p.Ile678Leu conduiraient également à une diminution de la taille de la tête chez le poisson zèbre. Il serait cependant nécessaire de procéder à des expériences de sauvetage du phénotype afin de savoir si le variant exerce un effet GF ou DN sur le phénotype. Puisque les souris *Kif21b*$^{-/-}$ présentent une microcéphalie à 16 semaines de développement (Kannan et al., 2017), il est possible que le variant p.Gln313Lys induise le phénotype de microcéphalie via un effet **DN**, en modulant la fonction de la protéine sauvage. Il est cependant peu probable que la mutation conduise à un effet d'haplo-insuffisance. En effet, dans notre modèle, le variant p.Gln313Lys est exprimé de façon ectopique dans un environnement sauvage. Pour tester l'effet d'haplo-insuffisance, nous pourrions procéder à une expérience de sauvetage du phénotype dans un modèle inactivé pour *KIF21B* (CRISPR-Cas9).

Comme expliqué dans l'introduction, la microcéphalie résulte le plus souvent d'un défaut de prolifération des progéniteurs, d'une altération de la neurogenèse ou encore de l'apoptose des progéniteurs et/ou des neurones. KIF21B étant exprimé uniquement par les neurones post-mitotiques, mais pas par les progéniteurs, comment expliquer le phénotype de microcéphalie ?

(1) L'inhibition de la fonction de KIF21B dans les neurones post-mitotiques pourrait altérer la prolifération des progéniteurs neuraux par un effet indirect sur cette population. Ce mécanisme a été mis en évidence par Saillour et coll., qui, dans leur étude, ont montré que la perte de l'expression de *TUBB3* dans les neurones post-mitotiques de souris conduit à un défaut de la migration radiaire par un effet indirect des neurones déplétés sur la prolifération des progéniteurs (Saillour et al., 2014). On pourrait donc imaginer le même type de mécanisme dans le cas des neurones exprimant le variant p.Gln313Lys. Cette hypothèse semble cependant être assez peu probable étant donné que nous n'avons observé aucun défaut de prolifération des progéniteurs apicaux et intermédiaires dans nos expériences d'EIU chez la souris.

(2) L'inhibition de la fonction de KIF21B conduirait à l'apoptose des neurones post-mitotiques ou des progéniteurs ou bien à l'altération de la morphologie des cellules gliales radiaires par un effet indirect. Ces hypothèses semblent également peu probables d'après nos analyses. En effet, nous n'observons pas d'apoptose cellulaire ni de défauts de la glie radiaire dans les coupes corticales électroporées avec variant p.Gln313Lys.

(3) L'inhibition de la fonction de KIF21B pourrait altérer la morphologie des neurones post-mitotiques et ainsi conduire à une réduction de la taille du cerveau. Cette dernière hypothèse semble être la plus probable. Pour tester cela, nous pourrions étudier la morphologie des neurones surexprimant le variant p.Gln313Lys, ou bien déplétés pour *Kif21b*, et regarder 1) si la taille du soma est réduite (Igarashi et al., 2018) et 2) si les neurones présentent une altération de l'arborisation dendritique (Barnat et al., 2017). Ces analyses pourraient être facilement réalisées *in vitro*, et également *in vivo* chez la souris. Il serait également très intéressant de pouvoir modéliser le phénotype de microcéphalie dans des cultures d'organoïdes de cerveau, issues des cellules couches pluripotentes reprogrammées du patient. Les cultures d'organoïdes ont en effet permis de mettre évidence de nouveaux mécanismes moléculaires et génétiques impliqués dans certaines

malformations du cerveau telles que la microcéphalie (Lancaster et al., 2013). Notons qu'il serait cependant peu probable qu'un défaut d'axogenèse soit à l'origine de la microcéphalie, puisque le variant p.Gln313Lys ne conduit pas à des défauts de branchements axonaux dans nos analyses.

IV. Rôles de Kif21b dans la migration neuronale

Nous montrons que la déplétion de *Kif21b* dans les neurones de projection par EIU de deux shRNA-*Kif21b* inductibles, conduit à un retard de migration à E18,5. Ce retard de migration est la conséquence d'un défaut de locomotion (diminution de la vitesse des neurones et augmentation du temps et du nombre de pause) et d'une altération de la morphologie neuronale (**Article 2, Fig. 2 et 4**). Ces défauts sont restaurés par la surexpression de la forme sauvage de Kif21b, mais pas par Kif21a, indiquant que Kif21b altère spécifiquement la migration neuronale. Nous confirmons ce résultat chez les mutants conditionnels pour *Kif21b*. Nous montrons également que Kif21b est essentiel à la migration tangentielle des interneurones. La déplétion de *Kif21b* dans les interneurones diminue de leur vitesse de migration et entraîne un défaut de translocation nucléaire et un défaut de branchement (**Article 2**, **Fig. 5**).

Par quels mécanismes Kif21b contrôle-t-il la migration neuronale ? Afin de déterminer les fonctions Kif21b impliquées dans la migration radiaire, nous avons effectué des expériences de complémentation par EIU des shRNAs avec différentes constructions mutées de Kif21b.

La co-expression de la forme tronquée sans le domaine moteur (Kif21b-ΔMD) ne parvient pas à restaurer complètement le phénotype migratoire, ce qui suggère que le domaine moteur de Kif21b est important pour la migration des neurones de projections. Puisque le domaine moteur est impliqué dans le transport intracellulaire, nous avons effectué une des expériences de complémentation avec une forme tronquée incapable d'hydrolyser l'ATP (Kif21b-ΔATP) ou bien une forme mutée immobile (Kif21b-T96N) (Muhia et al., 2016). De façon surprenante, ces deux constructions restaurent le phénotype, suggérant que la fonction mobilité n'est pas impliquée. Enfin, la co-expression de la forme tronquée sans le domaine WD-40 (Kif21bΔWD-40) parvient également à restaurer complètement le phénotype migratoire. Le domaine WD-40 étant proposé comme étant le domaine de liaison aux cargos (Marszalek et al., 1999), ces résultats confirment que la fonction mobilité de Kif21b ne semble pas impliquée. Cependant, puisque le domaine de liaison aux cargos n'a pas été identifié, nous ne pouvons pas exclure le fait que Kif21b puisse lier les cargos via son domaine coiled-coil, comme c'est le cas pour d'autres kinésines (Hirokawa et al., 2010).

Il est important de noter que bien que nous ayons montré que l'hypermobilité de KIF21B conduit aux phénotypes de migration radiaire et soit potentiellement à l'origine de l'effet pathologique (**Article 1**), cela ne signifie pas que la mobilité de KIF21B (et donc le transport de cargo) soit requis pour la migration radiaire en condition physiologique.

Ainsi nos résultats indiquent que le phénotype de migration radiaire, bien que dépendant du domaine moteur, ne s'explique pas par la mobilité mais potentiellement via d'autres mécanismes qui

sont régulés par le domaine moteur comme par exemple la dynamique du cytosquelette de MTs. L'implication du domaine moteur dans la régulation de la dynamique des MTs reste cependant à démontrer. En effet, tandis que Van Riel propose que le domaine aa1-660 régule la dynamique des MTs *in vitro* (van Riel et al., 2017), ce même domaine ne semble pas impliqué dans cette fonction d'après l'étude menée par Ghiretti et coll. (Ghiretti et al., 2016). Par ailleurs, le domaine aa1-660 comprend les domaines moteurs et coiled-coil-1. Il serait donc nécessaire de définir avec précision les domaines impliqués dans la régulation des MTs.

Comme décrit dans l'introduction (Chapitre 1 § IV), le remodelage des cytosquelettes d'actine et de MTs joue un rôle essentiel dans la migration radiaire et tangentielle. Puisque Kif21b régule la dynamique des MTs dans les dendrites (Ghiretti et al., 2016; Muhia et al., 2016; van Riel et al., 2017) et qu'il interagit avec les MTs dans des extraits corticaux (**Article 2**, **Fig. 1**), nous pouvons imaginer que Kif21b puisse participer au remodelage des MTs dans les neurones en migration. Par ailleurs, bien qu'il n'ait encore jamais été montré qu'une kinésine puisse avoir un rôle dans le remodelage de l'actine-F, notre étude suggère un rôle potentiel de Kif21b sur la dynamique du cytosquelette d'actine. En accord avec ces hypothèses, nous montrons que 1) la déplétion de Kif21b perturbe plusieurs mécanismes actine-dépendant (nucléokinèse et dynamique du cône de croissance, (Bellion et al., 2005)) et MT-dépendant (nucléokinèse et formation des branchements (Godin et al., 2012)) au cours de la migration neuronale (**Article 2**, **Fig. 4 et 5**) ; 2) Kif21b interagit avec les MTs et l'actine-F dans des extraits corticaux ; et 3) Kif21b colocalise avec les filaments d'actine au sein des cônes de croissance (**Article 2**, **Fig. 1**).

Il serait donc intéressant d'étudier les conséquences de la déplétion de *Kif21b* sur le réseau et la dynamique de l'actine et de MTs au cours de la migration radiaire et tangentielle. Il serait également intéressant de savoir comment Kif21b est recruté au cytosquelette d'actine dans les cônes de croissance et s'il interagit avec l'actine de manière directe ou indirecte. Il a précédemment été montré que Kif21a interagit avec la protéine KANK1 (KN motif and ankyrin repeat domains 1) au niveau des cônes de croissance (van der Vaart et al., 2013; Weng et al., 2018). Nous pouvons tout à fait imaginer que KANK1 puisse également permettre le recrutement de Kif21b au niveau du cytosquelette d'actine. Par ailleurs, KANK1 est impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine par l'intermédiaire des voies de signalisation RhoA/PI3K/Akt et Rac1 (Kakinuma et al., 2009).

Bien que les rôles des contractions du cytosquelette d'acto-myosine soient bien décrits dans la migration tangentielle (Bellion et al., 2005; Godin et al., 2012), l'implication de l'actine dans la migration radiaire reste peu connue. Il a été montré que l'actine-F est enrichie dans la partie proximale du prolongement guide des neurones bipolaires en migration (Nishimura et al., 2014; Pinheiro et al., 2011; Yang et al., 2012) (Chapitre 1 § IV-B-4-b). Ceci suggère un rôle possible de l'actine dans la nucléokinèse des neurones de projection. De plus, l'actine-F est requise pour la dynamique du cône de croissance lors de la migration tangentielle (Bellion et al., 2005; Godin et al., 2012). Au cours de la migration radiaire en revanche, les fonctions précises du cône de croissance

ne sont pas connues, mais il a été suggéré qu'ils permettraient l'attachement des neurones à la glie radiaire lors de la transition MP-BP (Xie et al., 2013).

Tout d'abord, afin d'identifier les rôles précis de l'actine au cours de la migration radiaire, nous pourrions procéder à des expériences de vidéo-microscopie sur coupes organotypiques de cerveau de souris électroporées avec le plasmide Life-Act (permettant de visualiser la dynamique de l'actine (Melak et al., 2017)) afin de visualiser les contractions du cytosquelette d'actine au cours de la migration. Dans un second temps, nous pourrions procéder à ces mêmes expériences chez le modèle souris inactivé pour Kif21b (knock-out, KO), afin de regarder si la dynamique du cytosquelette d'actine est perturbée. Enfin, dans un troisième temps, nous pourrions procéder à des expériences de sauvetage du phénotype chez le KO en utilisant des agents polymérisants/dépolymérisants ou stabilisateurs/déstabilisateurs du cytosquelette d'actine, et regarder les conséquences sur la migration.

V. Conclusion générale

Nous avons montré, grâce à des analyses *in vivo* effectuées chez la souris et chez le poisson zèbre, que l'expression ectopique des trois variants faux-sens (p.Gln313Lys, p.Ile678Leu et p.Ala1001Thr) récapitule les phénotypes neuro-développementaux observés chez les patients : altération de la migration radiaire, microcéphalie, défauts d'axogenèse et défauts de branchements axonaux. Nous avons par ailleurs mis en évidence qu'une régulation précise de l'activité de Kif21b est essentielle à sa fonction au cours du développement cortical. En effet, la déplétion de Kif21b (variant p.Asn988Serfs*4, shRNA, modèle KO) ou bien son hyperactivation (variants faux-sens) conduisent à des altérations de la migration radiaire et tangentielle plus ou moins sévères, à une microcéphalie, à des anomalies de connections intra- et inter-corticales chez la souris, et à différents troubles cognitifs et malformations neuro-développementales chez l'humain.

Nos résultats suggèrent fortement que ces processus sont régulés par différentes fonctions de Kif21b, impliquant l'auto-inhibition, le transport intracellulaire de cargos et la régulation de la dynamique des cytosquelettes d'actine et de MTs.

Mon travail de thèse a pour la première fois mis en évidence un rôle essentiel de Kif21b dans différentes étapes du développement cortical. Ce travail a également permis de mieux comprendre les fonctions de Kif21b dans ces différents processus et a identifié de nouveaux rôles physiologiques pour le mécanisme d'auto-inhibition des kinésines. L'ensemble de mes résultats participe à une plus grande compréhension des fonctions cellulaires des kinésines dans l'apparition des maladies neuro-développementales et confirme l'importance de ces moteurs moléculaires dans le développement cortical.

Bibliographies

- 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. AJNR Am J Neuroradiol 32, 1123–1129.
- Adesnik, H., and Scanziani, M. (2010). Lateral competition for cortical space by layer-specific horizontal circuits. Nature 464, 1155–1160.
- Ahuja, R., Pinyol, R., Reichenbach, N., Custer, L., Klingensmith, J., Kessels, M.M., and Qualmann, B. (2007). Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. Cell 131, 337–350.
- Aiken, J., Moore, J.K., and Bates, E.A. (2018). TUBA1A mutations identified in lissencephaly patients dominantly disrupt neuronal migration and impair dynein activity. Hum. Mol. Genet.
- Aillaud, C., Bosc, C., Peris, L., Bosson, A., Heemeryck, P., Dijk, J.V., Friec, J.L., Boulan, B., Vossier, F., Sanman, L.E., et al. (2017). Vasohibins/SVBP are tubulin carboxypeptidases (TCPs) that regulate neuron differentiation. Science 358, 1448–1453.
- Aizawa, H., Wakatsuki, S., Ishii, A., Moriyama, K., Sasaki, Y., Ohashi, K., Sekine-Aizawa, Y., Sehara-Fujisawa, A., Mizuno, K., Goshima, Y., et al. (2001). Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse. Nat. Neurosci. 4, 367–373.
- Al-Bassam, J., Cui, Y., Klopfenstein, D., Carragher, B.O., Vale, R.D., and Milligan, R.A. (2003). Distinct conformations of the kinesin Unc104 neck regulate a monomer to dimer motor transition. J. Cell Biol. 163, 743–753.
- 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.
- Ali, B.R., Silhavy, J.L., Akawi, N.A., Gleeson, J.G., and Al-Gazali, L. (2012). A mutation in KIF7 is responsible for the autosomal recessive syndrome of macrocephaly, multiple epiphyseal dysplasia and distinctive facial appearance. Orphanet J Rare Dis 7, 27.
- Ali, Z., Xing, C., Anwar, D., Itani, K., Weakley, D., Gong, X., Pascual, J.M., and Mootha, V.V. (2014). A novel de novo KIF21A mutation in a patient with congenital fibrosis of the extraocular muscles and Möbius syndrome. Mol. Vis. 20, 368–375.
- Allen, N.J., and Lyons, D.A. (2018). Glia as architects of central nervous system formation and function. Science 362, 181–185.
- Alsahli, S., Arold, S.T., Alfares, A., Alhaddad, B., Al Balwi, M., Kamsteeg, E.-J., Al-Twaijri, W., and Alfadhel, M. (2018). KIF16B is a candidate gene for a novel autosomal-recessive intellectual disability syndrome. Am. J. Med. Genet. A 176, 1602–1609.
- Amberg, N., Laukoter, S., and Hippenmeyer, S. (2018). Epigenetic Cues Modulating the Generation of Cell-Type Diversity in the Cerebral Cortex. J. Neurochem.
- Anastasiades, P.G., and Butt, S.J.B. (2012). A Role for Silent Synapses in the Development of the Pathway from Layer 2/3 to 5 Pyramidal Cells in the Neocortex. J. Neurosci. 32, 13085–13099.
- Anda, F.C. de, Meletis, K., Ge, X., Rei, D., and Tsai, L.-H. (2010). Centrosome Motility Is Essential for Initial Axon Formation in the Neocortex. J. Neurosci. 30, 10391–10406.
- Anderson, C.T., and Stearns, T. (2009). Centriole age underlies asynchronous primary cilium growth in mammalian cells. Curr. Biol. 19, 1498–1502.
- Anderson, C.T., Sheets, P.L., Kiritani, T., and Shepherd, G.M.G. (2010). Sublayer-specific microcircuits of corticospinal and corticostriatal neurons in motor cortex. Nature Neuroscience 13, 739–744.
- Anderson, S.A., Eisenstat, D.D., Shi, L., and Rubenstein, J.L. (1997). Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. Science 278, 474–476.
- Andreadis, A., Brown, W.M., and Kosik, K.S. (1992). Structure and novel exons of the human tau gene. Biochemistry 31, 10626–10633.
- Andrews, W., Liapi, A., Plachez, C., Camurri, L., Zhang, J., Mori, S., Murakami, F., Parnavelas, J.G., Sundaresan, V., and Richards, L.J. (2006). Robo1 regulates the development of major axon tracts and interneuron migration in the forebrain. Development 133, 2243–2252.
- Andrieux, A., Salin, P.A., Vernet, M., Kujala, P., Baratier, J., Gory-Fauré, S., Bosc, C., Pointu, H., Proietto, D., Schweitzer, A., et al. (2002). The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. Genes Dev. 16, 2350–2364.
- Anton, E.S., Kreidberg, J.A., and Rakic, P. (1999). Distinct Functions of α3 and αV Integrin Receptors in Neuronal Migration and Laminar Organization of the Cerebral Cortex. Neuron 22, 277–289.
- Applewhite, D.A., Barzik, M., Kojima, S.-I., Svitkina, T.M., Gertler, F.B., and Borisy, G.G. (2007). Ena/VASP proteins have an anti-capping independent function in filopodia formation. Mol. Biol. Cell 18, 2579–2591.
- 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.
- Armentano, M., Filosa, A., Andolfi, G., and Studer, M. (2006). COUP-TFI is required for the formation of commissural projections in the forebrain by regulating axonal growth. Development 133, 4151–4162.
- Armijo-Weingart, L., and Gallo, G. (2017). It takes a village to raise a branch: Cellular mechanisms of the initiation of axon collateral branches. Molecular and Cellular Neuroscience 84, 36–47.

- Arora, K., Talje, L., Asenjo, A.B., Andersen, P., Atchia, K., Joshi, M., Sosa, H., Allingham, J.S., and Kwok, B.H. (2014). KIF14 binds tightly to microtubules and adopts a rigor-like conformation. J. Mol. Biol. 426, 2997–3015.
- Asada, N., Sanada, K., and Fukada, Y. (2007). LKB1 regulates neuronal migration and neuronal differentiation in the developing neocortex through centrosomal positioning. J. Neurosci. 27, 11769–11775.
- 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. Nature Genetics 35, 270.
- Atherton, J., Houdusse, A., and Moores, C. (2013). MAPping out distribution routes for kinesin couriers. Biology of the Cell 105, 465–487.
- 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, e2388.
- Baffet, A.D., Hu, D.J., and Vallee, R.B. (2015). Cdk1 Activates Pre-mitotic Nuclear Envelope Dynein Recruitment and Apical Nuclear Migration in Neural Stem Cells. Dev. Cell 33, 703–716.
- Bagri, A., Marín, O., Plump, A.S., Mak, J., Pleasure, S.J., Rubenstein, J.L.R., and Tessier-Lavigne, M. (2002). Slit Proteins Prevent Midline Crossing and Determine the Dorsoventral Position of Major Axonal Pathways in the Mammalian Forebrain. Neuron 33, 233–248.
- 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., Saillour, Y., Castelnau, L., Philip, N., Buyse, G., Villard, L., Joriot, S., Marret, S., et al. (2008). Refinement of cortical dysgeneses spectrum associated with TUBA1A mutations. J. Med. Genet. 45, 647–653.
- 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. Nature Neuroscience 6, 1277.
- Bani-Yaghoub, M., Tremblay, R.G., Lei, J.X., Zhang, D., Zurakowski, B., Sandhu, J.K., Smith, B., Ribecco-Lutkiewicz, M., Kennedy, J., Walker, P.R., et al. (2006). Role of Sox2 in the development of the mouse neocortex. Dev. Biol. 295, 52–66.
- Barakeh, D., Faqeih, E., Anazi, S., Al-Dosari, M.S., Softah, A., Albadr, F., Hassan, H., Alazami, A.M., and Alkuraya, F.S. (2015). The many faces of KIF7. Human Genome Variation 2, 15006.
- 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.
- Barnat, M., Benassy, M.-N., Vincensini, L., Soares, S., Fassier, C., Propst, F., Andrieux, A., von Boxberg, Y., and Nothias, F. (2016). The GSK3-MAP1B pathway controls neurite branching and microtubule dynamics. Mol. Cell. Neurosci. 72, 9–21.
- Barnat, M., Le Friec, J., Benstaali, C., and Humbert, S. (2017). Huntingtin-Mediated Multipolar-Bipolar Transition of Newborn Cortical Neurons Is Critical for Their Postnatal Neuronal Morphology. Neuron 93, 99–114.
- Barnes, A.P., Lilley, B.N., Pan, Y.A., Plummer, L.J., Powell, A.W., Raines, A.N., Sanes, J.R., and Polleux, F. (2007). LKB1 and SAD kinases define a pathway required for the polarization of cortical neurons. Cell 129, 549–563.
- Barrett, J.C., Hansoul, S., Nicolae, D.L., Cho, J.H., Duerr, R.H., Rioux, J.D., Brant, S.R., Silverberg, M.S., Taylor, K.D., Barmada, M.M., et al. (2008). Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. Nat. Genet. 40, 955–962.
- Basnet, N., Nedozralova, H., Crevenna, A.H., Bodakuntla, S., Schlichthaerle, T., Taschner, M., Cardone, G., Janke, C., Jungmann, R., Magiera, M.M., et al. (2018). Direct induction of microtubule branching by microtubule nucleation factor SSNA1. Nature Cell Biology 20, 1172.
- Baudoin, J.-P., Alvarez, C., Gaspar, P., and Métin, C. (2008). Nocodazole-induced changes in microtubule dynamics impair the morphology and directionality of migrating medial ganglionic eminence cells. Dev. Neurosci. 30, 132–143.
- 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.
- Bazelot, M., Simonnet, J., Dinocourt, C., Bruel-Jungerman, E., Miles, R., Fricker, D., and Francis, F. (2012). Cellular anatomy, physiology and epileptiform activity in the CA3 region of Dcx knockout mice: a neuronal lamination defect and its consequences. European Journal of Neuroscience 35, 244–256.
- Beffert, U., Dillon, G.M., Sullivan, J.M., Stuart, C.E., Gilbert, J.P., Kambouris, J.A., and Ho, A. (2012). Microtubule plus-end tracking protein CLASP2 regulates neuronal polarity and synaptic function. J. Neurosci. 32, 13906–13916.
- Bégou, M., Volle, J., Bertrand, J.-B., Brun, P., Job, D., Schweitzer, A., Saoud, M., D'Amato, T., Andrieux, A., and Suaud-Chagny, M.-F. (2008). The stop null mice model for schizophrenia displays [corrected] cognitive and social deficits partly alleviated by neuroleptics. Neuroscience 157, 29–39.
- Bellion, A., Baudoin, J.-P., Alvarez, C., Bornens, M., and Métin, C. (2005). Nucleokinesis in tangentially migrating neurons comprises two alternating phases: forward migration of the Golgi/centrosome associated with centrosome splitting and myosin contraction at the rear. J. Neurosci. 25, 5691–5699.
- Bénézit, A., Hertz-Pannier, L., Dehaene-Lambertz, G., Monzalvo, K., Germanaud, D., Duclap, D., Guevara, P., Mangin, J.-F., Poupon, C., Moutard, M.-L., et al. (2015). Organising white matter in a brain without corpus callosum fibres. Cortex 63, 155–171.

- Benjelloun-Touimi, S., Jacque, C.M., Derer, P., De Vitry, F., Maunoury, R., and Dupouey, P. (1985). Evidence that mouse astrocytes may be derived from the radial glia. An immunohistochemical study of the cerebellum in the normal and reeler mouse. J. Neuroimmunol. 9, 87–97.
- Bertipaglia, C., Gonçalves, J.C., and Vallee, R.B. (2018). Nuclear migration in mammalian brain development. Semin. Cell Dev. Biol. 82, 57–66.
- Betizeau, M., Cortay, V., Patti, D., Pfister, S., Gautier, E., Bellemin-Ménard, A., Afanassieff, M., Huissoud, C., Douglas, R.J., Kennedy, H., et al. (2013). Precursor diversity and complexity of lineage relationships in the outer subventricular zone of the primate. Neuron 80, 442–457.
- Bianchi, S., van Riel, W.E., Kraatz, S.H.W., Olieric, N., Frey, D., Katrukha, E.A., Jaussi, R., Missimer, J., Grigoriev, I., Olieric, V., et al. (2016). Structural basis for misregulation of kinesin KIF21A autoinhibition by CFEOM1 disease mutations. Sci Rep 6, 30668.
- Bielas, S.L., Serneo, F.F., Chechlacz, M., Deerinck, T.J., Perkins, G.A., Allen, P.B., Ellisman, M.H., and Gleeson, J.G. (2007). Spinophilin facilitates dephosphorylation of doublecortin by PP1 to mediate microtubule bundling at the axonal wrist. Cell 129, 579–591.
- Bieling, P., Laan, L., Schek, H., Munteanu, E.L., Sandblad, L., Dogterom, M., Brunner, D., and Surrey, T. (2007). Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system in vitro. Nature 450, 1100–1105.
- 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.
- Binder, L.I., Frankfurter, A., and Rebhun, L.I. (1985). The distribution of tau in the mammalian central nervous system. J. Cell Biol. 101, 1371–1378.
- Blasius, T.L., Cai, D., Jih, G.T., Toret, C.P., and Verhey, K.J. (2007). Two binding partners cooperate to activate the molecular motor Kinesin-1. J. Cell Biol. 176, 11–17.
- 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.
- Bond, J., Roberts, E., Mochida, G.H., Hampshire, D.J., Scott, S., Askham, J.M., Springell, K., Mahadevan, M., Crow, Y.J., Markham, A.F., et al. (2002). ASPM is a major determinant of cerebral cortical size. Nat. Genet. 32, 316–320.
- 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.
- Bortone, D., and Polleux, F. (2009). KCC2 expression promotes the termination of cortical interneuron migration in a voltage-sensitive calcium-dependent manner. Neuron 62, 53–71.
- Bouquet, C., Soares, S., von Boxberg, Y., Ravaille-Veron, M., Propst, F., and Nothias, F. (2004). Microtubule-associated protein 1B controls directionality of growth cone migration and axonal branching in regeneration of adult dorsal root ganglia neurons. J. Neurosci. 24, 7204–7213.
- Bouquet, C., Ravaille-Veron, M., Propst, F., and Nothias, F. (2007). MAP1B coordinates microtubule and actin filament remodeling in adult mouse Schwann cell tips and DRG neuron growth cones. Mol. Cell. Neurosci. 36, 235–247.
- 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.
- Britanova, O., Akopov, S., Lukyanov, S., Gruss, P., and Tarabykin, V. (2005). Novel transcription factor Satb2 interacts with matrix attachment region DNA elements in a tissue-specific manner and demonstrates cell-type-dependent expression in the developing mouse CNS. Eur. J. Neurosci. 21, 658–668.
- 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.
- Brock, S., Stouffs, K., Scalais, E., D'Hooghe, M., Keymolen, K., Guerrini, R., Dobyns, W.B., Donato, N.D., and Jansen, A.C. (2018). Tubulinopathies continued: refining the phenotypic spectrum associated with variants in TUBG1. European Journal of Human Genetics 26, 1132.
- Broix, L., Asselin, L., Silva, C.G., Ivanova, E.L., Tilly, P., Gilet, J.G., Lebrun, N., Jagline, H., Muraca, G., Saillour, Y., et al. (2018). Ciliogenesis and cell cycle alterations contribute to KIF2A-related malformations of cortical development. Hum. Mol. Genet. 27, 224–238.
- Brown, M.E., and Bridgman, P.C. (2004). Myosin function in nervous and sensory systems. J. Neurobiol. 58, 118–130.
- Brückner, G., and Biesold, D. (1981). Histochemistry of glycogen deposition in perinatal rat brain: importance of radial glial cells. J. Neurocytol. 10, 749–757.
- Brunden, K.R., Zhang, B., Carroll, J., Yao, Y., Potuzak, J.S., Hogan, A.-M.L., Iba, M., James, M.J., Xie, S.X., Ballatore, C., et al. (2010). Epothilone D improves microtubule density, axonal integrity, and cognition in a transgenic mouse model of tauopathy. J. Neurosci. 30, 13861–13866.
- Buster, D.W., Baird, D.H., Yu, W., Solowska, J.M., Chauvière, M., Mazurek, A., Kress, M., and Baas, P.W. (2003). Expression of the mitotic kinesin Kif15 in postmitotic neurons: implications for neuronal migration and development. J. Neurocytol. 32, 79–96.
- Butt, S.J.B., Fuccillo, M., Nery, S., Noctor, S., Kriegstein, A., Corbin, J.G., and Fishell, G. (2005). The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. Neuron 48, 591–604.

- Butt, S.J.B., Sousa, V.H., Fuccillo, M.V., Hjerling-Leffler, J., Miyoshi, G., Kimura, S., and Fishell, G. (2008). The requirement of Nkx2-1 in the temporal specification of cortical interneuron subtypes. Neuron 59, 722–732.
- Cabrales Fontela, Y., Kadavath, H., Biernat, J., Riedel, D., Mandelkow, E., and Zweckstetter, M. (2017). Multivalent cross-linking of actin filaments and microtubules through the microtubule-associated protein Tau. Nat Commun 8.
- Caceres, A., Mautino, J., and Kosik, K.S. (1992). Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. Neuron 9, 607–618.
- Cai, D., Hoppe, A.D., Swanson, J.A., and Verhey, K.J. (2007). Kinesin-1 structural organization and conformational changes revealed by FRET stoichiometry in live cells. J. Cell Biol. 176, 51–63.
- Cai, L., Hayes, N.L., Takahashi, T., Caviness, V.S., and Nowakowski, R.S. (2002). Size distribution of retrovirally marked lineages matches prediction from population measurements of cell cycle behavior. Journal of Neuroscience Research 69, 731–744.
- 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. Journal of Cell Science 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.
- Cammarata, G.M., Bearce, E.A., and Lowery, L.A. (2016). Cytoskeletal social networking in the growth cone: How +TIPs mediate microtubule-actin cross-linking to drive axon outgrowth and guidance. Cytoskeleton (Hoboken) 73, 461–476.
- Cantagrel, V., Silhavy, J.L., Bielas, S.L., Swistun, D., Marsh, S.E., Bertrand, J.Y., Audollent, S., Attié-Bitach, T., Holden, K.R., Dobyns, W.B., et al. (2008). Mutations in the Cilia Gene ARL13B Lead to the Classical Form of Joubert Syndrome. The American Journal of Human Genetics 83, 170–179.
- Canty, A.J., Dietze, J., Harvey, M., Enomoto, H., Milbrandt, J., and Ibáñez, C.F. (2009). Regionalized loss of parvalbumin interneurons in the cerebral cortex of mice with deficits in GFRalpha1 signaling. J. Neurosci. 29, 10695–10705.
- 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. Nature Neuroscience 19, 253–262.
- Cardoso, C., Leventer, R.J., Matsumoto, N., Kuc, J.A., Ramocki, M.B., Mewborn, S.K., Dudlicek, L.L., May, L.F., Mills, P.L., Das, S., et al. (2000). The location and type of mutation predict malformation severity in isolated lissencephaly caused by abnormalities within the LIS1 gene. Hum. Mol. Genet. 9, 3019–3028.
- Cardoso, C., Leventer, R.J., Dowling, J.J., Ward, H.L., Chung, J., Petras, K.S., Roseberry, J.A., Weiss, A.M., Das, S., Martin, C.L., et al. (2002). Clinical and molecular basis of classical lissencephaly: Mutations in the LIS1 gene (PAFAH1B1). Hum. Mutat. 19, 4–15.
- Caronia-Brown, G., and Grove, E.A. (2011). Timing of cortical interneuron migration is influenced by the cortical hem. Cereb. Cortex 21, 748–755.
- Castro, D.S., Martynoga, B., Parras, C., Ramesh, V., Pacary, E., Johnston, C., Drechsel, D., Lebel-Potter, M., Garcia, L.G., Hunt, C., et al. (2011). A novel function of the proneural factor Ascl1 in progenitor proliferation identified by genome-wide characterization of its targets. Genes Dev. 25, 930–945.
- Causeret, F., Hidalgo-Sanchez, M., Fort, P., Backer, S., Popoff, M.-R., Gauthier-Rouvière, C., and Bloch-Gallego, E. (2004). Distinct roles of Rac1/Cdc42 and Rho/Rock for axon outgrowth and nucleokinesis of precerebellar neurons toward netrin 1. Development 131, 2841–2852.
- Cavallin, M., Hubert, L., Cantagrel, V., Munnich, A., Boddaert, N., Vincent-Delorme, C., Cuvellier, J.C., Masson, C., Besmond, C., and Bahi-Buisson, N. (2016). Recurrent KIF5C mutation leading to frontal pachygyria without microcephaly. Neurogenetics 17, 79–82.
- Cavallin, M., Bijlsma, E.K., El Morjani, A., Moutton, S., Peeters, E.A.J., Maillard, C., Pedespan, J.M., Guerrot, A.-M., Drouin-Garaud, V., Coubes, C., et al. (2017). Recurrent KIF2A mutations are responsible for classic lissencephaly. Neurogenetics 18, 73–79.
- 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.
- Chai, X., Förster, 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 143, 1029–1040.
- Chaudhary, A.R., Lu, H., Krementsova, E.B., Bookwalter, C.S., Trybus, K.M., and Hendricks, A.G. (2019). MAP7 regulates organelle transport by recruiting kinesin-1 to microtubules. J. Biol. Chem.
- Chen, Y., and Hancock, W.O. (2015). Kinesin-5 is a microtubule polymerase. Nat Commun 6, 8160.
- Chen, B., Schaevitz, L.R., and McConnell, S.K. (2005a). Fezl regulates the differentiation and axon targeting of layer 5 subcortical projection neurons in cerebral cortex. PNAS 102, 17184–17189.
- Chen, B., Schaevitz, L.R., and McConnell, S.K. (2005b). Fezl regulates the differentiation and axon targeting of layer 5 subcortical projection neurons in cerebral cortex. PNAS 102, 17184–17189.
- Chen, J., Ye, Q., Deng, D., Yan, J., Lin, H., Shen, T., and Lin, Y. (2016). KIF21A mutation in two Chinese families with congenital fibrosis of the extraocular muscles type 1 and 3. Mol Med Rep 14, 3145–3151.
- 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.

- Chen, J.-L., Chang, C.-H., and Tsai, J.-W. (2019). Gli2 Rescues Delays in Brain Development Induced by Kif3a Dysfunction. Cereb Cortex 29, 751–764.
- Chen, L., Liao, G., Waclaw, R.R., Burns, K.A., Linquist, D., Campbell, K., Zheng, Y., and Kuan, C.-Y. (2007). Rac1 controls the formation of midline commissures and the competency of tangential migration in ventral telencephalic neurons. J. Neurosci. 27, 3884–3893.
- Chen, N., Bao, Y., Xue, Y., Sun, Y., Hu, D., Meng, S., Lu, L., and Shi, J. (2017). Meta-analyses of RELN variants in neuropsychiatric disorders. Behav. Brain Res. 332, 110–119.
- Chen, T.-J., Gehler, S., Shaw, A.E., Bamburg, J.R., and Letourneau, P.C. (2006). Cdc42 participates in the regulation of ADF/cofilin and retinal growth cone filopodia by brain derived neurotrophic factor. Journal of Neurobiology 66, 103–114.
- Chen, Y., Tian, X., Kim, W.-Y., and Snider, W.D. (2011). Adenomatous polyposis coli regulates axon arborization and cytoskeleton organization via its N-terminus. PLoS ONE 6, e24335.
- Cheng, L., Desai, J., Miranda, C.J., Duncan, J.S., Qiu, W., Nugent, A.A., Kolpak, A.L., Wu, C.C., Drokhlyansky, E., Delisle, M.M., et al. (2014). Human CFEOM1 mutations attenuate KIF21A autoinhibition and cause oculomotor axon stalling. Neuron 82, 334–349.
- 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.
- Cheung, C.C., Yang, C., Berger, T., Zaugg, K., Reilly, P., Elia, A.J., Wakeham, A., You-Ten, A., Chang, N., Li, L., et al. (2010). Identification of BERP (brain-expressed RING finger protein) as a p53 target gene that modulates seizure susceptibility through interacting with GABAA receptors. PNAS 107, 11883–11888.
- Choe, Y., Siegenthaler, J.A., and Pleasure, S.J. (2012). A Cascade of Morphogenic Signaling Initiated by the Meninges Controls Corpus Callosum Formation. Neuron 73, 698–712.
- Choi, Y.-K., Liu, P., Sze, S.K., Dai, C., and Qi, R.Z. (2010). CDK5RAP2 stimulates microtubule nucleation by the γ-tubulin ring complex. The Journal of Cell Biology 191, 1089–1095.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., and Burridge, K. (1996). Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. The Journal of Cell Biology 133, 1403–1415.
- Close, J., Xu, H., García, N.D.M., Batista-Brito, R., Rossignol, E., Rudy, B., and Fishell, G. (2012). Satb1 Is an Activity-Modulated Transcription Factor Required for the Terminal Differentiation and Connectivity of Medial Ganglionic Eminence-Derived Cortical Interneurons. J. Neurosci. 32, 17690–17705.
- Cohen, D., Segal, M., and Reiner, O. (2008). Doublecortin Supports the Development of Dendritic Arbors in Primary Hippocampal Neurons. DNE 30, 187–199.
- Colas, J.-F., and Schoenwolf, G.C. (2001). Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. Developmental Dynamics 221, 117–145.
- Coles, C.H., and Bradke, F. (2015). Coordinating Neuronal Actin–Microtubule Dynamics. Current Biology 25, R677–R691.
- Conde, C., and Cáceres, A. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. Nat. Rev. Neurosci. 10, 319–332.
- Conti, L., Pollard, S.M., Gorba, T., Reitano, E., Toselli, M., Biella, G., Sun, Y., Sanzone, S., Ying, Q.-L., Cattaneo, E., et al. (2005). Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. PLoS Biol. 3, e283.
- Cooper, J.A. (2014). Molecules and mechanisms that regulate multipolar migration in the intermediate zone. Front Cell Neurosci 8.
- Corbo, J.C., Deuel, T.A., Long, J.M., LaPorte, P., Tsai, E., Wynshaw-Boris, A., and Walsh, C.A. (2002). Doublecortin is required in mice for lamination of the hippocampus but not the neocortex. J. Neurosci. 22, 7548–7557.
- Correas, I., Padilla, R., and Avila, J. (1990). The tubulin-binding sequence of brain microtubule-associated proteins, tau and MAP-2, is also involved in actin binding. Biochem. J. 269, 61–64.
- Courchet, J., Lewis, T.L., Lee, S., Courchet, V., Liou, D.-Y., Aizawa, S., and Polleux, F. (2013). Terminal axon branching is regulated by the LKB1-NUAK1 kinase pathway via presynaptic mitochondrial capture. Cell 153, 1510–1525.
- Coy, D.L., Wagenbach, M., and Howard, J. (1999). Kinesin Takes One 8-nm Step for Each ATP That It Hydrolyzes. J. Biol. Chem. 274, 3667–3671.
- Creppe, C., Malinouskaya, L., Volvert, M.-L., Gillard, M., Close, P., Malaise, O., Laguesse, S., Cornez, I., Rahmouni, S., Ormenese, S., et al. (2009). Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of alpha-tubulin. Cell 136, 551–564.
- Cunha-Ferreira, I., Chazeau, A., Buijs, R.R., Stucchi, R., Will, L., Pan, X., Adolfs, Y., van der Meer, C., Wolthuis, J.C., Kahn, O.I., et al. (2018). The HAUS Complex Is a Key Regulator of Non-centrosomal Microtubule Organization during Neuronal Development. Cell Reports 24, 791–800.
- Cuzon, V.C., Yeh, P.W., Cheng, Q., and Yeh, H.H. (2006). Ambient GABA Promotes Cortical Entry of Tangentially Migrating Cells Derived from the Medial Ganglionic Eminence. Cereb Cortex 16, 1377–1388.
- Dafinger, C., Liebau, M.C., Elsayed, S.M., Hellenbroich, Y., Boltshauser, E., Korenke, G.C., Fabretti, F., Janecke, A.R., Ebermann, I., Nürnberg, G., et al. (2011). Mutations in KIF7 link Joubert syndrome with Sonic Hedgehog signaling and microtubule dynamics. J. Clin. Invest. 121, 2662–2667.
- Dagenbach, E.M., and Endow, S.A. (2004). A new kinesin tree. J. Cell. Sci. 117, 3–7.
- D'Arcangelo, G. (2005). The reeler mouse: anatomy of a mutant. Int. Rev. Neurobiol. 71, 383–417.
- 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, e14680.
- D'Avino, P.P. (2017). Citron kinase – renaissance of a neglected mitotic kinase. J Cell Sci 130, 1701–1708.

- De Marco García, N.V., Karayannis, T., and Fishell, G. (2011). Neuronal activity is required for the development of specific cortical interneuron subtypes. Nature 472, 351–355.
- Dehmelt, L., Smart, F.M., Ozer, R.S., and Halpain, S. (2003). The role of microtubule-associated protein 2c in the reorganization of microtubules and lamellipodia during neurite initiation. J. Neurosci. 23, 9479–9490.
- 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.
- 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.
- Delgehyr, N., Sillibourne, J., and Bornens, M. (2005). Microtubule nucleation and anchoring at the centrosome are independent processes linked by ninein function. J. Cell. Sci. 118, 1565–1575.
- Deloulme, J.-C., Gory-Fauré, S., Mauconduit, F., Chauvet, S., Jonckheere, J., Boulan, B., Mire, E., Xue, J., Jany, M., Maucler, C., et al. (2015). Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3E-dependent signalling for axonal growth. Nat Commun 6, 7246.
- Denarier, E., Fourest-Lieuvin, A., Bosc, C., Pirollet, F., Chapel, A., Margolis, R.L., and Job, D. (1998). Nonneuronal isoforms of STOP protein are responsible for microtubule cold stability in mammalian fibroblasts. PNAS 95, 6055–6060.
- Dent, E.W., and Kalil, K. (2001). Axon branching requires interactions between dynamic microtubules and actin filaments. J. Neurosci. 21, 9757–9769.
- Dent, E.W., Callaway, J.L., Szebenyi, G., Baas, P.W., and Kalil, K. (1999). Reorganization and movement of microtubules in axonal growth cones and developing interstitial branches. J. Neurosci. 19, 8894–8908.
- Dent, E.W., Gupton, S.L., and Gertler, F.B. (2011). The Growth Cone Cytoskeleton in Axon Outgrowth and Guidance. Cold Spring Harb Perspect Biol 3.
- 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.
- Dhanesh, S.B., Subashini, C., and James, J. (2016). Hes1: the maestro in neurogenesis. Cell. Mol. Life Sci. 73, 4019–4042.
- Dietrich, K.A., Sindelar, C.V., Brewer, P.D., Downing, K.H., Cremo, C.R., and Rice, S.E. (2008). The kinesin-1 motor protein is regulated by a direct interaction of its head and tail. PNAS 105, 8938–8943.
- Dillon, G.M., Tyler, W.A., Omuro, K.C., Kambouris, J., Tyminski, C., Henry, S., Haydar, T.F., Beffert, U., and Ho, A. (2017). CLASP2 Links Reelin to the Cytoskeleton during Neocortical Development. Neuron 93, 1344-1358.e5.
- Dixit, R., Ross, J.L., Goldman, Y.E., and Holzbaur, E.L.F. (2008). Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. Science 319, 1086–1089.
- Dominguez, R., and Holmes, K.C. (2011). Actin Structure and Function. Annual Review of Biophysics 40, 169–186.
- 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/β-catenin signaling regulates sequential fate decisions of murine cortical precursor cells. Stem Cells 33, 170–182.
- Droppelmann, C.A., Campos-Melo, D., Volkening, K., and Strong, M.J. (2014). The emerging role of guanine nucleotide exchange factors in ALS and other neurodegenerative diseases. Front. Cell. Neurosci. 8.
- Dulabon, L., Olson, E.C., Taglienti, M.G., Eisenhuth, S., McGrath, B., Walsh, C.A., Kreidberg, J.A., and Anton, E.S. (2000). Reelin Binds α3β1 Integrin and Inhibits Neuronal Migration. Neuron 27, 33–44.
- Dun, X., Bandeira de Lima, T., Allen, J., Geraldo, S., Gordon-Weeks, P., and Chilton, J.K. (2012). Drebrin controls neuronal migration through the formation and alignment of the leading process. Molecular and Cellular Neuroscience 49, 341–350.
- Dunn, S., Morrison, E.E., Liverpool, T.B., Molina-París, C., Cross, R.A., Alonso, M.C., and Peckham, M. (2008). Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. Journal of Cell Science 121, 1085–1095.
- Ebneth, A., Godemann, R., Stamer, K., Illenberger, S., Trinczek, B., and Mandelkow, E. (1998). Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. J. Cell Biol. 143, 777–794.
- 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.
- Edwards, T.J., Sherr, E.H., Barkovich, A.J., and Richards, L.J. (2014). Clinical, genetic and imaging findings identify new causes for corpus callosum development syndromes. Brain 137, 1579–1613.
- Elie, A., Prezel, E., Guérin, C., Denarier, E., Ramirez-Rios, S., Serre, L., Andrieux, A., Fourest-Lieuvin, A., Blanchoin, L., and Arnal, I. (2015). Tau co-organizes dynamic microtubule and actin networks. Sci Rep 5, 9964.
- Englund, C., Fink, A., Lau, C., Pham, D., Daza, R.A.M., Bulfone, A., Kowalczyk, T., and Hevner, R.F. (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.
- Eom, D.S., Amarnath, S., and Agarwala, S. (2013). Apicobasal polarity and neural tube closure. Development, Growth & Differentiation 55, 164–172.
- Ericson, J., Muhr, J., Jessell, T.M., and Edlund, T. (1995). Sonic hedgehog: a common signal for ventral patterning along the rostrocaudal axis of the neural tube. Int. J. Dev. Biol. 39, 809–816.

- Esmaeeli Nieh, S., Madou, M.R.Z., Sirajuddin, M., Fregeau, B., McKnight, D., Lexa, K., Strober, J., Spaeth, C., Hallinan, B.E., Smaoui, N., et al. (2015). De novo mutations in KIF1A cause progressive encephalopathy and brain atrophy. Ann Clin Transl Neurol 2, 623–635.
- Espeut, J., Gaussen, A., Bieling, P., Morin, V., Prieto, S., Fesquet, D., Surrey, T., and Abrieu, A. (2008). Phosphorylation relieves autoinhibition of the kinetochore motor Cenp-E. Mol. Cell 29, 637–643.
- Eto, K., Kawauchi, T., Osawa, M., Tabata, H., and Nakajima, K. (2010). Role of dual leucine zipper-bearing kinase (DLK/MUK/ZPK) in axonal growth. Neurosci. Res. 66, 37–45.
- 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., 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.
- Fallet-Bianco, C., Loeuillet, L., Poirier, K., Loget, P., Chapon, F., Pasquier, L., Saillour, Y., Beldjord, C., Chelly, J., and Francis, F. (2008). Neuropathological phenotype of a distinct form of lissencephaly associated with mutations in TUBA1A. Brain 131, 2304–2320.
- Fallet-Bianco, C., Laquerrière, A., Poirier, K., Razavi, F., Guimiot, F., Dias, P., Loeuillet, L., Lascelles, K., Beldjord, C., Carion, N., et al. (2014). Mutations in tubulin genes are frequent causes of various foetal malformations of cortical development including microlissencephaly. Acta Neuropathol Commun 2, 69.
- 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.
- Farkas, L.M., Haffner, C., Giger, T., Khaitovich, P., Nowick, K., Birchmeier, C., Pääbo, S., and Huttner, W.B. (2008). Insulinoma-associated 1 has a panneurogenic role and promotes the generation and expansion of basal progenitors in the developing mouse neocortex. Neuron 60, 40–55.
- Farkhondeh, A., Niwa, S., Takei, Y., and Hirokawa, N. (2015). Characterizing KIF16B in Neurons Reveals a Novel Intramolecular “Stalk Inhibition” Mechanism That Regulates Its Capacity to Potentiate the Selective Somatodendritic Localization of Early Endosomes. J. Neurosci. 35, 5067–5086.
- Faux, C., Rakic, S., Andrews, W., and Britto, J.M. (2012). Neurons on the move: migration and lamination of cortical interneurons. Neurosignals 20, 168–189.
- Fellner, S., Bauer, B., Miller, D.S., Schaffrik, M., Fankhänel, M., Spruss, T., Bernhardt, G., Graeff, C., Färber, L., Gschaidmeier, H., et al. (2002). Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo. J. Clin. Invest. 110, 1309–1318.
- Feng, Y., and Walsh, C.A. (2004). Mitotic spindle regulation by Nde1 controls cerebral cortical size. Neuron 44, 279–293.
- Fenlon, L.R., and Richards, L.J. (2015). Contralateral targeting of the corpus callosum in normal and pathological brain function. Trends Neurosci. 38, 264–272.
- Ferhat, L., Cook, C., Chauviere, M., Harper, M., Kress, M., Lyons, G.E., and Baas, P.W. (1998). Expression of the mitotic motor protein Eg5 in postmitotic neurons: implications for neuronal development. J. Neurosci. 18, 7822–7835.
- Ferreira, A., Niclas, J., Vale, R.D., Banker, G., and Kosik, K.S. (1992). Suppression of kinesin expression in cultured hippocampal neurons using antisense oligonucleotides. The Journal of Cell Biology 117, 595–606.
- 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. Nature Neuroscience 13, 690–699.
- Filges, I., Nosova, E., Bruder, E., Tercanli, S., Townsend, K., Gibson, W.T., Röthlisberger, B., Heinimann, K., Hall, J.G., Gregory-Evans, C.Y., et al. (2014). Exome sequencing identifies mutations in KIF14 as a novel cause of an autosomal recessive lethal fetal ciliopathy phenotype. Clin. Genet. 86, 220–228.
- 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.
- Flames, N., Pla, R., Gelman, D.M., Rubenstein, J.L.R., Puelles, L., and Marín, O. (2007). Delineation of Multiple Subpallial Progenitor Domains by the Combinatorial Expression of Transcriptional Codes. J. Neurosci. 27, 9682–9695.
- Flandin, P., Zhao, Y., Vogt, D., Jeong, J., Long, J., Potter, G., Westphal, H., and Rubenstein, J.L.R. (2011). Lhx6 and Lhx8 coordinately induce neuronal expression of Shh that controls the generation of interneuron progenitors. Neuron 70, 939–950.
- Florio, M., and Huttner, W.B. (2014). Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. Development 141, 2182–2194.
- Flynn, K.C., Pak, C.W., Shaw, A.E., Bradke, F., and Bamburg, J.R. (2009). Growth cone-like waves transport actin and promote axonogenesis and neurite branching. Dev Neurobiol 69, 761–779.
- Foerster, P., Daclin, M., Asm, S., Faucourt, M., Boletta, A., Genovesio, A., and Spassky, N. (2017). mTORC1 signaling and primary cilia are required for brain ventricle morphogenesis. Development 144, 201–210.
- Fogarty, M., Grist, M., Gelman, D., Marín, O., Pachnis, V., and Kessaris, N. (2007). Spatial Genetic Patterning of the Embryonic Neuroepithelium Generates GABAergic Interneuron Diversity in the Adult Cortex. J. Neurosci. 27, 10935–10946.
- Fournet, V., de Lavilléon, G., Schweitzer, A., Giros, B., Andrieux, A., and Martres, M.-P. (2012). Both chronic treatments by epothilone D and fluoxetine increase the short-term memory and differentially alter the mood status of STOP/MAP6 KO mice. Journal of Neurochemistry 123, 982–996.
- 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.

- Fragkouli, A., Wijk, N.V. van, Lopes, R., Kessaris, N., and Pachnis, V. (2009). LIM homeodomain transcription factor-dependent specification of bipotential MGE progenitors into cholinergic and GABAergic striatal interneurons. Development 136, 3841–3851.
- 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., Gil-Sanz, C., Martinez-Garay, I., Espinosa, A., Harkins-Perry, S.R., Ramos, C., and Müller, U. (2012). Fate-Restricted Neural Progenitors in the Mammalian Cerebral Cortex. Science 337, 746–749.
- Franker, M.A., Esteves da Silva, M., Tas, R.P., Tortosa, E., Cao, Y., Frias, C.P., Janssen, A.F.J., Wulf, P.S., Kapitein, L.C., and Hoogenraad, C.C. (2016). Three-Step Model for Polarized Sorting of KIF17 into Dendrites. Current Biology 26, 1705–1712.
- Frantz, G.D., and McConnell, S.K. (1996). Restriction of late cerebral cortical progenitors to an upper-layer fate. Neuron 17, 55–61.
- Frazer, S., Prados, J., Niquille, M., Cadilhac, C., Markopoulos, F., Gomez, L., Tomasello, U., Telley, L., Holtmaat, A., Jabaudon, D., et al. (2017). Transcriptomic and anatomic parcellation of 5-HT3AR expressing cortical interneuron subtypes revealed by single-cell RNA sequencing. Nat Commun 8, 14219.
- Friocourt, G., Koulakoff, A., Chafey, P., Boucher, D., Fauchereau, F., Chelly, J., and Francis, F. (2003). Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes. Cereb. Cortex 13, 620–626.
- Fu, X., Brown, K.J., Yap, C.C., Winckler, B., Jaiswal, J., and Liu, J.S. (2013). Doublecortin (Dcx) family proteins regulate filamentous actin structure in developing neurons. J Neurosci 33, 709–721.
- Fujikura, K., Setsu, T., Tanigaki, K., Abe, T., Kiyonari, H., Terashima, T., and Sakisaka, T. (2013). Kif14 mutation causes severe brain malformation and hypomyelination. PLoS ONE 8, e53490.
- Furuta, Y., Piston, D.W., and Hogan, B.L. (1997). Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulators of dorsal forebrain development. Development 124, 2203–2212.
- Gadadhar, S., Bodakuntla, S., Natarajan, K., and Janke, C. (2017). The tubulin code at a glance. J Cell Sci 130, 1347–1353.
- Gadisseux, J.F., and Evrard, P. (1985). Glial-neuronal relationship in the developing central nervous system. A histochemical-electron microscope study of radial glial cell particulate glycogen in normal and reeler mice and the human fetus. Dev. Neurosci. 7, 12–32.
- Gai, M., Bianchi, F.T., Vagnoni, C., Vernì, F., Bonaccorsi, S., Pasquero, S., Berto, G.E., Sgrò, F., Chiotto, A.M., Annaratone, L., et al. (2016). ASPM and CITK regulate spindle orientation by affecting the dynamics of astral microtubules. EMBO Rep. 17, 1396–1409.
- 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.
- Gallo, G. (2006). RhoA-kinase coordinates F-actin organization and myosin II activity during semaphorin-3A-induced axon retraction. J. Cell. Sci. 119, 3413–3423.
- Gallo, G. (2011). The cytoskeletal and signaling mechanisms of axon collateral branching. Developmental Neurobiology 71, 201–220.
- Gao, P., Postiglione, M.P., Krieger, T.G., Hernandez, L., Wang, C., Han, Z., Streicher, C., Papusheva, E., Insolera, R., Chugh, K., et al. (2014). Deterministic Progenitor Behavior and Unitary Production of Neurons in the Neocortex. Cell 159, 775–788.
- Gärtner, A., Fornasiero, E.F., Munck, S., Vennekens, K., Seuntjens, E., Huttner, W.B., Valtorta, F., and Dotti, C.G. (2012). N-cadherin specifies first asymmetry in developing neurons. EMBO J. 31, 1893–1903.
- Garvalov, B.K., Flynn, K.C., Neukirchen, D., Meyn, L., Teusch, N., Wu, X., Brakebusch, C., Bamburg, J.R., and Bradke, F. (2007). Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity. J. Neurosci. 27, 13117–13129.
- 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.
- Gelman, D., Griveau, A., Dehorter, N., Teissier, A., Varela, C., Pla, R., Pierani, A., and Marín, O. (2011). A Wide Diversity of Cortical GABAergic Interneurons Derives from the Embryonic Preoptic Area. J. Neurosci. 31, 16570–16580.
- Gelman, D.M., Martini, F.J., Nóbrega-Pereira, S., Pierani, A., Kessaris, N., and Marín, O. (2009). The Embryonic Preoptic Area Is a Novel Source of Cortical GABAergic Interneurons. J. Neurosci. 29, 9380–9389.
- Geng, A., Qiu, R., Murai, K., Liu, J., Wu, X., Zhang, H., Farhoodi, H., Duong, N., Jiang, M., Yee, J.-K., et al. (2018). KIF20A/MKLP2 regulates the division modes of neural progenitor cells during cortical development. Nat Commun 9, 2707.
- Gennerich, A., and Vale, R.D. (2009). Walking the walk: how kinesin and dynein coordinate their steps. Curr Opin Cell Biol 21, 59–67.
- Geraldo, S., Khanzada, U.K., Parsons, M., Chilton, J.K., and Gordon-Weeks, P.R. (2008). Targeting of the F-actin-binding protein drebrin by the microtubule plus-tip protein EB3 is required for neuritogenesis. Nat. Cell Biol. 10, 1181–1189.
- Ghiretti, A.E., Thies, E., Tokito, M.K., Lin, T., Ostap, E.M., Kneussel, M., and Holzbaur, E.L.F. (2016). Activity-Dependent Regulation of Distinct Transport and Cytoskeletal Remodeling Functions of the Dendritic Kinesin KIF21B. Neuron 92, 857–872.

- Gimenez, U., Boulan, B., Mauconduit, F., Taurel, F., Leclercq, M., Denarier, E., Brocard, J., Gory-Fauré, S., Andrieux, A., Lahrech, H., et al. (2017). 3D imaging of the brain morphology and connectivity defects in a model of psychiatric disorders: MAP6-KO mice. Sci Rep 7, 10308.
- 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., Lin, P.T., 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.
- Gobius, I., Morcom, L., Suárez, R., Bunt, J., Bukshpun, P., Reardon, W., Dobyns, W.B., Rubenstein, J.L.R., Barkovich, A.J., Sherr, E.H., et al. (2016). Astroglial-Mediated Remodeling of the Interhemispheric Midline Is Required for the Formation of the Corpus Callosum. Cell Rep 17, 735–747.
- Godin, J.D., Colombo, K., Molina-Calavita, M., Keryer, G., Zala, D., Charrin, B.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). p27(Kip1) is a microtubule-associated protein that promotes microtubule polymerization during neuron migration. Dev. Cell 23, 729–744.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., and Crowther, R.A. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. Neuron 3, 519–526.
- Goley, E.D., and Welch, M.D. (2006). The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7, 713–726.
- Gonçalves, J.C., Dantas, T.J., and Vallee, R.B. (2019). Distinct roles for dynein light intermediate chains in neurogenesis, migration, and terminal somal translocation. J. Cell Biol.
- González-Billault, C., Del Río, J.A., Ureña, J.M., Jiménez-Mateos, E.M., Barallobre, M.J., Pascual, M., Pujadas, L., Simó, S., Torre, A.L., Gavin, R., et al. (2005). A role of MAP1B in Reelin-dependent neuronal migration. Cereb. Cortex 15, 1134–1145.
- Goris, A., Boonen, S., D'hooghe, M.-B., and Dubois, B. (2010). Replication of KIF21B as a susceptibility locus for multiple sclerosis. J. Med. Genet. 47, 775–776.
- Govindan, S., and Jabaudon, D. (2017). Coupling progenitor and neuronal diversity in the developing neocortex. FEBS Lett. 591, 3960–3977.
- Grabham, P.W., Seale, G.E., Bennecib, M., Goldberg, D.J., and Vallee, R.B. (2007). Cytoplasmic dynein and LIS1 are required for microtubule advance during growth cone remodeling and fast axonal outgrowth. J. Neurosci. 27, 5823–5834.
- Gromova, K.V., Muhia, M., Rothammer, N., Gee, C.E., Thies, E., Schaefer, I., Kress, S., Kilimann, M.W., Shevchuk, O., Oertner, T.G., et al. (2018). Neurobeachin and the Kinesin KIF21B Are Critical for Endocytic Recycling of NMDA Receptors and Regulate Social Behavior. Cell Rep 23, 2705–2717.
- Gruneberg, U., Neef, R., Honda, R., Nigg, E.A., and Barr, F.A. (2004). Relocation of Aurora B from centromeres to the central spindle at the metaphase to anaphase transition requires MKlp2. The Journal of Cell Biology 166, 167–172.
- Guernsey, D.L., Jiang, H., Hussin, J., Arnold, M., Bouyakdan, K., Perry, S., Babineau-Sturk, T., Beis, J., Dumas, N., Evans, S.C., et al. (2010). Mutations in centrosomal protein CEP152 in primary microcephaly families linked to MCPH4. Am. J. Hum. Genet. 87, 40–51.
- Guillaud, L., Bosc, C., Fourest-Lieuvin, A., Denarier, E., Pirollet, F., Lafanechère, L., and Job, D. (1998). STOP Proteins are Responsible for the High Degree of Microtubule Stabilization Observed in Neuronal Cells. J Cell Biol 142, 167–179.
- Guillaud, L., Setou, M., and Hirokawa, N. (2003). KIF17 dynamics and regulation of NR2B trafficking in hippocampal neurons. J. Neurosci. 23, 131–140.
- Guillaud, L., Wong, R., and Hirokawa, N. (2008). Disruption of KIF17–Mint1 interaction by CaMKII-dependent phosphorylation: a molecular model of kinesin–cargo release. Nature Cell Biology 10, 19–29.
- Gumy, L.F., Katrukha, E.A., Grigoriev, I., Jaarsma, D., Kapitein, L.C., Akhmanova, A., and Hoogenraad, C.C. (2017). MAP2 Defines a Pre-axonal Filtering Zone to Regulate KIF1- versus KIF5-Dependent Cargo Transport in Sensory Neurons. Neuron 94, 347-362.e7.
- 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.
- Hamdan, F.F., Gauthier, J., Araki, Y., Lin, D.-T., Yoshizawa, Y., Higashi, K., Park, A.-R., Spiegelman, D., Dobrzeniecka, S., Piton, A., et al. (2011). Excess of de novo deleterious mutations in genes associated with glutamatergic systems in nonsyndromic intellectual disability. Am. J. Hum. Genet. 88, 306–316.
- Hammond, J.W., Cai, D., Blasius, T.L., Li, Z., Jiang, Y., Jih, G.T., Meyhofer, E., and Verhey, K.J. (2009). Mammalian Kinesin-3 motors are dimeric in vivo and move by processive motility upon release of autoinhibition. PLoS Biol. 7, e72.
- Hammond, J.W., Huang, C.-F., Kaech, S., Jacobson, C., Banker, G., and Verhey, K.J. (2010). Posttranslational modifications of tubulin and the polarized transport of kinesin-1 in neurons. Mol. Biol. Cell 21, 572–583.
- Hand, R.A., Khalid, S., Tam, E., and Kolodkin, A.L. (2015). Axon Dynamics during Neocortical Laminar Innervation. Cell Reports 12, 172–182.
- 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.

- Hartfuss, E., Galli, R., Heins, N., and Götz, M. (2001). Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. Dev. Biol. 229, 15–30.
- Harwell, C.C., Parker, P.R.L., Gee, S.M., Okada, A., McConnell, S.K., Kreitzer, A.C., and Kriegstein, A.R. (2012). Sonic Hedgehog Expression in Corticofugal Projection Neurons Directs Cortical Microcircuit Formation. Neuron 73, 1116–1126.
- 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.
- Heins, N., Malatesta, P., Cecconi, F., Nakafuku, M., Tucker, K.L., Hack, M.A., Chapouton, P., Barde, Y.-A., and Götz, M. (2002). Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. Nat. Neurosci. 5, 308–315.
- Helenius, J., Brouhard, G., Kalaidzidis, Y., Diez, S., and Howard, J. (2006). The depolymerizing kinesin MCAK uses lattice diffusion to rapidly target microtubule ends. Nature 441, 115–119.
- Hemmati-Brivanlou, A. (2000). La morphogenèse du système nerveux chez les vertébrés. Med Sci (Paris) 16, 150.
- Hevner, R.F., Daza, R. a. M., Englund, C., Kohtz, J., and Fink, A. (2004). Postnatal shifts of interneuron position in the neocortex of normal and reeler mice: evidence for inward radial migration. Neuroscience 124, 605–618.
- 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., 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., Youn, Y.H., Moon, H.M., Miyamichi, K., Zong, H., Wynshaw-Boris, A., and Luo, L. (2010). Genetic mosaic dissection of Lis1 and Ndel1 in neuronal migration. Neuron 68, 695–709.
- Hirai, S., Banba, Y., Satake, T., and Ohno, S. (2011). Axon formation in neocortical neurons depends on stage-specific regulation of microtubule stability by the dual leucine zipper kinase-c-Jun N-terminal kinase pathway. J. Neurosci. 31, 6468–6480.
- Hirokawa, N. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. Science 279, 519–526.
- Hirokawa, N., Niwa, S., and Tanaka, Y. (2010a). Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. Neuron 68, 610–638.
- Hirokawa, N., Niwa, S., and Tanaka, Y. (2010b). Molecular Motors in Neurons: Transport Mechanisms and Roles in Brain Function, Development, and Disease. Neuron 68, 610–638.
- Hirotsune, S., Fleck, M.W., Gambello, M.J., Bix, G.J., Chen, A., Clark, G.D., Ledbetter, D.H., McBain, C.J., and Wynshaw-Boris, A. (1998). Graded reduction of Pafah1b1 (Lis1) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. Nature Genetics 19, 333.
- Hoch, R.V., Lindtner, S., Price, J.D., and Rubenstein, J.L.R. (2015). OTX2 Transcription Factor Controls Regional Patterning within the Medial Ganglionic Eminence and Regional Identity of the Septum. Cell Rep 12, 482–494.
- 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.
- Hong, S.E., Shugart, Y.Y., Huang, D.T., Shahwan, S.A., Grant, P.E., Hourihane, J.O., Martin, N.D., and Walsh, C.A. (2000). Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. Nat. Genet. 26, 93–96.
- Hooikaas, P.J., Martin, M., Mühlethaler, T., Kuijntjes, G.-J., Peeters, C.A.E., Katrukha, E.A., Ferrari, L., Stucchi, R., Verhagen, D.G.F., van Riel, W.E., et al. (2019). MAP7 family proteins regulate kinesin-1 recruitment and activation. J. Cell Biol. 218, 1298–1318.
- Hu, D.J.-K., Baffet, A.D., Nayak, T., Akhmanova, A., Doye, V., and Vallee, R.B. (2013a). Dynein recruitment to nuclear pores activates apical nuclear migration and mitotic entry in brain progenitor cells. Cell 154, 1300–1313.
- Hu, D.J.-K., Baffet, A.D., Nayak, T., Akhmanova, A., Doye, V., and Vallee, R.B. (2013b). Dynein Recruitment to Nuclear Pores Activates Apical Nuclear Migration and Mitotic Entry in Brain Progenitor Cells. Cell 154, 1300–1313.
- Hu, J., Bai, X., Bowen, J.R., Dolat, L., Korobova, F., Yu, W., Baas, P.W., Svitkina, T., Gallo, G., and Spiliotis, E.T. (2012). Septin-driven coordination of actin and microtubule remodeling regulates the collateral branching of axons. Curr. Biol. 22, 1109–1115.
- Hu, Z., Yue, X., Shi, G., Yue, Y., Crockett, D.P., Blair-Flynn, J., Reuhl, K., Tessarollo, L., and Zhou, R. (2003). Corpus Callosum Deficiency in Transgenic Mice Expressing a Truncated Ephrin-A Receptor. J. Neurosci. 23, 10963–10970.
- Hunter, A.W., Caplow, M., Coy, D.L., Hancock, W.O., Diez, S., Wordeman, L., and Howard, J. (2003). The kinesin-related protein MCAK is a microtubule depolymerase that forms an ATP-hydrolyzing complex at microtubule ends. Mol. Cell 11, 445–457.
- Hur, E.-M., Saijilafu, null, Lee, B.D., Kim, S.-J., Xu, W.-L., and Zhou, F.-Q. (2011). GSK3 controls axon growth via CLASP-mediated regulation of growth cone microtubules. Genes Dev. 25, 1968–1981.
- Hussain, M.S., Baig, S.M., Neumann, S., Nürnberg, G., Farooq, M., Ahmad, I., Alef, T., Hennies, H.C., Technau, M., Altmüller, J., et al. (2012). A truncating mutation of CEP135 causes primary microcephaly and disturbed centrosomal function. Am. J. Hum. Genet. 90, 871–878.
- Hutchins, B.I., Li, L., and Kalil, K. (2011). Wnt/calcium signaling mediates axon growth and guidance in the developing corpus callosum. Developmental Neurobiology 71, 269–283.
- Huttner, W.B., and Brand, M. (1997). Asymmetric division and polarity of neuroepithelial cells. Current Opinion in Neurobiology 7, 29–39.
- Ibisler, A., Hehr, U., Barth, A., Koch, M., Epplen, J.T., and Hoffjan, S. (2015). Novel KIF7 Mutation in a Tunisian Boy with Acrocallosal Syndrome: Case Report and Review of the Literature. Mol Syndromol 6, 173–180.

- Igarashi, A., Itoh, K., Yamada, T., Adachi, Y., Kato, T., Murata, D., Sesaki, H., and Iijima, M. (2018). Nuclear PTEN deficiency causes microcephaly with decreased neuronal soma size and increased seizure susceptibility. J. Biol. Chem. 293, 9292–9300.
- Ikegami, K., Heier, R.L., Taruishi, M., Takagi, H., Mukai, M., Shimma, S., Taira, S., Hatanaka, K., Morone, N., Yao, I., et al. (2007). Loss of alpha-tubulin polyglutamylation in ROSA22 mice is associated with abnormal targeting of KIF1A and modulated synaptic function. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104, 3213–3218.
- Imanishi, M., Endres, N.F., Gennerich, A., and Vale, R.D. (2006). Autoinhibition regulates the motility of the C. elegans intraflagellar transport motor OSM-3. The Journal of Cell Biology 174, 931–937.
- Insolera, R., Bazzi, H., Shao, W., Anderson, K.V., and Shi, S.-H. (2014). Cortical neurogenesis in the absence of centrioles. Nat. Neurosci. 17, 1528–1535.
- Ip, J.P.K., Shi, L., Chen, Y., Itoh, Y., Fu, W.-Y., Betz, A., Yung, W.-H., Gotoh, Y., Fu, A.K.Y., and Ip, N.Y. (2011). α2-chimaerin controls neuronal migration and functioning of the cerebral cortex through CRMP-2. Nat. Neurosci. 15, 39–47.
- Issa, L., Kraemer, N., Rickert, C.H., Sifringer, M., Ninnemann, O., Stoltenburg-Didinger, G., and Kaindl, A.M. (2013). CDK5RAP2 expression during murine and human brain development correlates with pathology in primary autosomal recessive microcephaly. Cereb. Cortex 23, 2245–2260.
- 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. Nature Neuroscience 16, 416–425.
- Ivanova, E.L., Gilet, J.G., Sulimenko, V., Duchon, A., Rudolf, G., Runge, K., Collins, S.C., Asselin, L., Broix, L., Drouot, N., et al. (2019). TUBG1 missense variants underlying cortical malformations disrupt neuronal locomotion and microtubule dynamics but not neurogenesis. Nature Communications 10, 2129.
- Izzi, L., and Charron, F. (2011). Midline axon guidance and human genetic disorders. Clinical Genetics 80, 226–234.
- Jabaudon, D. (2017). Fate and freedom in developing neocortical circuits. Nat Commun 8, 16042.
- Jackson, A.P., Eastwood, H., Bell, S.M., Adu, J., Toomes, C., Carr, I.M., Roberts, E., Hampshire, D.J., Crow, Y.J., Mighell, A.J., et al. (2002). Identification of microcephalin, a protein implicated in determining the size of the human brain. Am. J. Hum. Genet. 71, 136–142.
- 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.
- Jamuar, S.S., Lam, A.-T.N., Kircher, M., D'Gama, A.M., Wang, J., Barry, B.J., Zhang, X., Hill, R.S., Partlow, J.N., Rozzo, A., et al. (2014). Somatic mutations in cerebral cortical malformations. N. Engl. J. Med. 371, 733–743.
- Jamuar, S.S., Schmitz-Abe, K., D'Gama, A.M., Drottar, M., Chan, W.-M., Peeva, M., Servattalab, S., Lam, A.-T.N., Delgado, M.R., Clegg, N.J., et al. (2017). Biallelic mutations in human DCC cause developmental split-brain syndrome. Nature Genetics 49, 606–612.
- Janisch, K.M., Vock, V.M., Fleming, M.S., Shrestha, A., Grimsley-Myers, C.M., Rasoul, B.A., Neale, S.A., Cupp, T.D., Kinchen, J.M., Liem, K.F., et al. (2013). The vertebrate-specific Kinesin-6, Kif20b, is required for normal cytokinesis of polarized cortical stem cells and cerebral cortex size. Development 140, 4672–4682.
- 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.
- Ji, Z., Zhang, G., Chen, L., Li, J., Yang, Y., Cha, C., Zhang, J., Lin, H., and Guo, G. (2018). Spastin Interacts with CRMP5 to Promote Neurite Outgrowth by Controlling the Microtubule Dynamics. Dev Neurobiol 78, 1191–1205.
- Johnson, M.B., and Walsh, C.A. (2017). Cerebral cortical neuron diversity and development at single-cell resolution. Curr. Opin. Neurobiol. 42, 9–16.
- 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.
- Ju, X.-D., Guo, Y., Wang, N.-N., Huang, Y., Lai, M.-M., Zhai, Y.-H., Guo, Y.-G., Zhang, J.-H., Cao, R.-J., Yu, H.-L., et al. (2014). Both Myosin-10 isoforms are required for radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. Cereb. Cortex 24, 1259–1268.
- Ka, M., and Kim, W.-Y. (2016). Microtubule-Actin Crosslinking Factor 1 Is Required for Dendritic Arborization and Axon Outgrowth in the Developing Brain. Mol. Neurobiol. 53, 6018–6032.
- Kaan, H.Y.K., Hackney, D.D., and Kozielski, F. (2011). The structure of the kinesin-1 motor-tail complex reveals the mechanism of autoinhibition. Science 333, 883–885.
- Kakinuma, N., Zhu, Y., Wang, Y., Roy, B.C., and Kiyama, R. (2009). Kank proteins: structure, functions and diseases. Cell. Mol. Life Sci. 66, 2651–2659.
- Kalil, K., and Dent, E.W. (2014). Branch management: mechanisms of axon branching in the developing vertebrate CNS. Nat. Rev. Neurosci. 15, 7–18.
- Kanatani, S., Yozu, M., Tabata, H., and Nakajima, K. (2008). COUP-TFII is preferentially expressed in the caudal ganglionic eminence and is involved in the caudal migratory stream. J. Neurosci. 28, 13582–13591.
- Kannan, M., Bayam, E., Wagner, C., Rinaldi, B., Kretz, P.F., Tilly, P., Roos, M., McGillewie, L., Bär, S., Minocha, S., et al. (2017). WD40-repeat 47, a microtubule-associated protein, is essential for brain development and autophagy. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 114, E9308–E9317.
- Kanold, P.O., and Luhmann, H.J. (2010). The subplate and early cortical circuits. Annu. Rev. Neurosci. 33, 23–48.
- Kapitein, L.C., Peterman, E.J.G., Kwok, B.H., Kim, J.H., Kapoor, T.M., and Schmidt, C.F. (2005). The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks. Nature 435, 114–118.

- Karaca, E., Harel, T., Pehlivan, D., Jhangiani, S.N., Gambin, T., Akdemir, Z.C., Gonzaga-Jauregui, C., Erdin, S., Bayram, Y., Campbell, I.M., et al. (2015). Genes that affect brain structure and function identified by rare variant analyses of Mendelian neurologic disease. Neuron 88, 499–513.
- Karaer, K., Yuksel, Z., Ichkou, A., Calisir, C., and Attié-Bitach, T. (2015). A novel KIF7 mutation in two affected siblings with acrocallosal syndrome. Clin. Dysmorphol. 24, 61–64.
- Kardon, J.R., and Vale, R.D. (2009). Regulators of the cytoplasmic dynein motor. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 10, 854–865.
- Kaul, N., Soppina, V., and Verhey, K.J. (2014). Effects of α-tubulin K40 acetylation and detyrosination on kinesin-1 motility in a purified system. Biophys. J. 106, 2636–2643.
- Kawano, Y., Yoshimura, T., Tsuboi, D., Kawabata, S., Kaneko-Kawano, T., Shirataki, H., Takenawa, T., and Kaibuchi, K. (2005). CRMP-2 Is Involved in Kinesin-1-Dependent Transport of the Sra-1/WAVE1 Complex and Axon Formation. Molecular and Cellular Biology 25, 9920–9935.
- Kawauchi, T. (2015). Cellullar insights into cerebral cortical development: focusing on the locomotion mode of neuronal migration. Front Cell Neurosci 9.
- Kawauchi, T., Chihama, K., Nabeshima, Y., and Hoshino, M. (2003). The in vivo roles of STEF/Tiam1, Rac1 and JNK in cortical neuronal migration. EMBO J. 22, 4190–4201.
- Kawauchi, T., Sekine, K., Shikanai, M., Chihama, K., Tomita, K., Kubo, K., Nakajima, K., Nabeshima, Y.-I., and Hoshino, M. (2010). Rab GTPases-dependent endocytic pathways regulate neuronal migration and maturation through N-cadherin trafficking. Neuron 67, 588–602.
- Ke, Y.D., Suchowerska, A.K., van der Hoven, J., De Silva, D.M., Wu, C.W., van Eersel, J., Ittner, A., and Ittner, L.M. (2012). Lessons from tau-deficient mice. Int J Alzheimers Dis 2012, 873270.
- 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.
- Keeble, T.R., Halford, M.M., Seaman, C., Kee, N., Macheda, M., Anderson, R.B., Stacker, S.A., and Cooper, H.M. (2006). The Wnt Receptor Ryk Is Required for Wnt5a-Mediated Axon Guidance on the Contralateral Side of the Corpus Callosum. J. Neurosci. 26, 5840–5848.
- Kelava, I., Reillo, I., Murayama, A.Y., Kalinka, A.T., Stenzel, D., Tomancak, P., Matsuzaki, F., Lebrand, C., Sasaki, E., Schwamborn, J.C., et al. (2012). Abundant Occurrence of Basal Radial Glia in the Subventricular Zone of Embryonic Neocortex of a Lissencephalic Primate, the Common Marmoset Callithrix jacchus. Cereb Cortex 22, 469–481.
- Kelliher, M.T., Yue, Y., Ng, A., Kamiyama, D., Huang, B., Verhey, K.J., and Wildonger, J. (2018). Autoinhibition of kinesin-1 is essential to the dendrite-specific localization of Golgi outposts. J. Cell Biol. 217, 2531–2547.
- Kempf, M., Clement, A., Faissner, A., Lee, G., and Brandt, R. (1996). Tau binds to the distal axon early in development of polarity in a microtubule- and microfilament-dependent manner. J. Neurosci. 16, 5583–5592.
- Kern, J.V., Zhang, Y.V., Kramer, S., Brenman, J.E., and Rasse, T.M. (2013). The kinesin-3, unc-104 regulates dendrite morphogenesis and synaptic development in Drosophila. Genetics 195, 59–72.
- Kessaris, N., Magno, L., Rubin, A.N., and Oliveira, M.G. (2014). Genetic programs controlling cortical interneuron fate. Curr. Opin. Neurobiol. 26, 79–87.
- Ketschek, A., Spillane, M., Dun, X.-P., Hardy, H., Chilton, J., and Gallo, G. (2016). Drebrin coordinates the actin and microtubule cytoskeleton during the initiation of axon collateral branches. Developmental Neurobiology 76, 1092–1110.
- Ketschek, A.R., Jones, S.L., and Gallo, G. (2007). Axon extension in the fast and slow lanes: Substratum-dependent engagement of myosin II functions. Developmental Neurobiology 67, 1305–1320.
- Kim, S., and Dynlacht, B.D. (2013). Assembling a primary cilium. Curr. Opin. Cell Biol. 25, 506–511.
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., et al. (1996). Regulation of Myosin Phosphatase by Rho and Rho-Associated Kinase (Rho-Kinase). Science 273, 245–248.
- Kinoshita, K., Noetzel, T.L., Arnal, I., Drechsel, D.N., and Hyman, A.A. (2006). Global and local control of microtubule destabilization promoted by a catastrophe kinesin MCAK/XKCM1. J. Muscle Res. Cell. Motil. 27, 107–114.
- Kirischuk, S., Luhmann, H.J., and Kilb, W. (2014). Cajal-Retzius cells: update on structural and functional properties of these mystic neurons that bridged the 20th century. Neuroscience 275, 33–46.
- Koizumi, H., Tanaka, T., and Gleeson, J.G. (2006). Doublecortin-like kinase functions with doublecortin to mediate fiber tract decussation and neuronal migration. Neuron 49, 55–66.
- Kollins, K.M., Hu, J., Bridgman, P.C., Huang, Y.Q., and Gallo, G. (2009). Myosin-II negatively regulates minor process extension and the temporal development of neuronal polarity. Dev Neurobiol 69, 279–298.
- 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.
- Kondo, M., Takei, Y., and Hirokawa, N. (2012). Motor protein KIF1A is essential for hippocampal synaptogenesis and learning enhancement in an enriched environment. Neuron 73, 743–757.
- Konishi, Y., and Setou, M. (2009). Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. Nature Neuroscience 12, 559–567.
- Konjikusic, M.J., Yeetong, P., Boswell, C.W., Lee, C., Roberson, E.C., Ittiwut, R., Suphapeetiporn, K., Ciruna, B., Gurnett, C.A., Wallingford, J.B., et al. (2018). Mutations in Kinesin family member 6 reveal specific role in ependymal cell ciliogenesis and human neurological development. PLoS Genet. 14, e1007817.
- 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. Nature Cell Biology 10, 93–101.

- Korobova, F., and Svitkina, T. (2008). Arp2/3 complex is important for filopodia formation, growth cone motility, and neuritogenesis in neuronal cells. Mol. Biol. Cell 19, 1561–1574.
- 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.
- Kreft, K.L., van Meurs, M., Wierenga-Wolf, A.F., Melief, M.-J., van Strien, M.E., Hol, E.M., Oostra, B.A., Laman, J.D., and Hintzen, R.Q. (2014). Abundant kif21b is associated with accelerated progression in neurodegenerative diseases. Acta Neuropathol Commun 2, 144.
- Kumar, A., Girimaji, S.C., Duvvari, M.R., and Blanton, S.H. (2009). Mutations in STIL, encoding a pericentriolar and centrosomal protein, cause primary microcephaly. Am. J. Hum. Genet. 84, 286–290.
- 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.
- Labonté, D., Thies, E., Pechmann, Y., Groffen, A.J., Verhage, M., Smit, A.B., van Kesteren, R.E., and Kneussel, M. (2013). TRIM3 regulates the motility of the kinesin motor protein KIF21B. PLoS ONE 8, e75603.
- Labonté, D., Thies, E., and Kneussel, M. (2014). The kinesin KIF21B participates in the cell surface delivery of γ2 subunit-containing GABAA receptors. Eur. J. Cell Biol. 93, 338–346.
- Lai, M., Guo, Y., Ma, J., Yu, H., Zhao, D., Fan, W., Ju, X., Sheikh, M.A., Malik, Y.S., Xiong, W., et al. (2015). Myosin X regulates neuronal radial migration through interacting with N-cadherin. Front Cell Neurosci 9, 326.
- Lancaster, M.A., Renner, M., Martin, C.-A., Wenzel, D., Bicknell, L.S., Hurles, M.E., Homfray, T., Penninger, J.M., Jackson, A.P., and Knoblich, J.A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. Nature 501, 373–379.
- 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.
- Lawrence, C.J., Dawe, R.K., Christie, K.R., Cleveland, D.W., Dawson, S.C., Endow, S.A., Goldstein, L.S.B., Goodson, H.V., Hirokawa, N., Howard, J., et al. (2004). A standardized kinesin nomenclature. J. Cell Biol. 167, 19–22.
- Lebrand, C., Dent, E.W., Strasser, G.A., Lanier, L.M., Krause, M., Svitkina, T.M., Borisy, G.G., and Gertler, F.B. (2004). Critical role of Ena/VASP proteins for filopodia formation in neurons and in function downstream of netrin-1. Neuron 42, 37–49.
- Ledonne, F., Orduz, D., Mercier, J., Vigier, L., Grove, E.A., Tissir, F., Angulo, M.C., Pierani, A., and Coppola, E. (2016). Targeted Inactivation of Bax Reveals a Subtype-Specific Mechanism of Cajal-Retzius Neuron Death in the Postnatal Cerebral Cortex. Cell Reports 17, 3133–3141.
- Lee, J.-R., Shin, H., Choi, J., Ko, J., Kim, S., Lee, H.W., Kim, K., Rho, S.-H., Lee, J.H., Song, H.-E., et al. (2004). An intramolecular interaction between the FHA domain and a coiled coil negatively regulates the kinesin motor KIF1A. EMBO J. 23, 1506–1515.
- Lee, J.-R., Srour, M., Kim, D., Hamdan, F.F., Lim, S.-H., Brunel-Guitton, C., Décarie, J.-C., Rossignol, E., Mitchell, G.A., Schreiber, A., et al. (2015). De novo mutations in the motor domain of KIF1A cause cognitive impairment, spastic paraparesis, axonal neuropathy, and cerebellar atrophy. Hum. Mutat. 36, 69–78.
- Lee, S., Hjerling-Leffler, J., Zagha, E., Fishell, G., and Rudy, B. (2010). The Largest Group of Superficial Neocortical GABAergic Interneurons Expresses Ionotropic Serotonin Receptors. J. Neurosci. 30, 16796–16808.
- Lee, S.M., Tole, S., Grove, E., and McMahon, A.P. (2000). A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. Development 127, 457–467.
- Leterrier, C. (2016). Chapter Six - The Axon Initial Segment, 50Years Later: A Nexus for Neuronal Organization and Function. In Current Topics in Membranes, V. Bennett, ed. (Academic Press), pp. 185–233.
- Leterrier, C., Dubey, P., and Roy, S. (2017). The nano-architecture of the axonal cytoskeleton. Nature Reviews Neuroscience 18, 713–726.
- Letzkus, J.J., Kampa, B.M., and Stuart, G.J. (2006). Learning Rules for Spike Timing-Dependent Plasticity Depend on Dendritic Synapse Location. J. Neurosci. 26, 10420–10429.
- Leventer, R.J., Cardoso, C., Ledbetter, D.H., and Dobyns, W.B. (2001). LIS1: from cortical malformation to essential protein of cellular dynamics. Trends Neurosci. 24, 489–492.
- Levitt, P., and Rakic, P. (1980). Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. J. Comp. Neurol. 193, 815–840.
- Leyva-Díaz, E., and López-Bendito, G. (2013). In and out from the cortex: Development of major forebrain connections. Neuroscience 254, 26–44.
- Li, L., Wei, D., Wang, Q., Pan, J., Liu, R., Zhang, X., and Bao, L. (2012). MEC-17 deficiency leads to reduced α-tubulin acetylation and impaired migration of cortical neurons. J. Neurosci. 32, 12673–12683.
- Li, L., Jayabal, S., Ghorbani, M., Legault, L.-M., McGraw, S., Watt, A.J., and Yang, X.-J. (2019). ATAT1 regulates forebrain development and stress-induced tubulin hyperacetylation. Cell. Mol. Life Sci.

- Lim, L., Mi, D., Llorca, A., and Marín, O. (2018a). Development and Functional Diversification of Cortical Interneurons. Neuron 100, 294–313.
- Lim, L., Pakan, J.M.P., Selten, M.M., Marques-Smith, A., Llorca, A., Bae, S.E., Rochefort, N.L., and Marín, O. (2018b). Optimization of interneuron function by direct coupling of cell migration and axonal targeting. Nature Neuroscience 21, 920.
- Lin, S., Liu, M., Mozgova, O.I., Yu, W., and Baas, P.W. (2012). Mitotic Motors Coregulate Microtubule Patterns in Axons and Dendrites. J. Neurosci. 32, 14033–14049.
- Liodis, P., Denaxa, M., Grigoriou, M., Akufo-Addo, C., Yanagawa, Y., and Pachnis, V. (2007). Lhx6 Activity Is Required for the Normal Migration and Specification of Cortical Interneuron Subtypes. J. Neurosci. 27, 3078–3089.
- Lipka, J., Kapitein, L.C., Jaworski, J., and Hoogenraad, C.C. (2016). Microtubule-binding protein doublecortin-like kinase 1 (DCLK1) guides kinesin-3-mediated cargo transport to dendrites. The EMBO Journal 35, 302–318.
- Liu, G., Chen, X., Sun, X., Liu, H., Zhao, K., Chang, Q., Pan, X., Wang, X., Yuan, S., Liu, Q., et al. (2014). Maternal germline mosaicism of kinesin family member 21A (KIF21A) mutation causes complex phenotypes in a Chinese family with congenital fibrosis of the extraocular muscles. Mol. Vis. 20, 15–23.
- Liu, J.S., Schubert, C.R., Fu, X., Fourniol, F.J., Jaiswal, J.K., Houdusse, A., Stultz, C.M., Moores, C.A., and Walsh, C.A. (2012). Molecular Basis for Specific Regulation of Neuronal Kinesin-3 Motors by Doublecortin Family Proteins. Molecular Cell 47, 707–721.
- Liu, M., Nadar, V.C., Kozielski, F., Kozlowska, M., Yu, W., and Baas, P.W. (2010). Kinesin-12, a Mitotic Microtubule-Associated Motor Protein, Impacts Axonal Growth, Navigation, and Branching. J. Neurosci. 30, 14896–14906.
- Lodato, S., Tomassy, G.S., De Leonibus, E., Uzcategui, Y.G., Andolfi, G., Armentano, M., Touzot, A., Gaztelu, J.M., Arlotta, P., Menendez de la Prida, L., et al. (2011a). Loss of COUP-TFI alters the balance between caudal ganglionic eminence- and medial ganglionic eminence-derived cortical interneurons and results in resistance to epilepsy. J. Neurosci. 31, 4650–4662.
- Lodato, S., Rouaux, C., Quast, K.B., Jantrachotechatchawan, C., Studer, M., Hensch, T.K., and Arlotta, P. (2011b). Excitatory projection neuron subtypes control the distribution of local inhibitory interneurons in the cerebral cortex. Neuron 69, 763–779.
- López-Bendito, G., Sánchez-Alcañiz, J.A., Pla, R., Borrell, V., Picó, E., Valdeolmillos, M., and Marín, O. (2008). Chemokine Signaling Controls Intracortical Migration and Final Distribution of GABAergic Interneurons. J. Neurosci. 28, 1613–1624.
- 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.
- Lu, T., Chen, R., Cox, T.C., Moldrich, R.X., Kurniawan, N., Tan, G., Perry, J.K., Ashworth, A., Bartlett, P.F., Xu, L., et al. (2013). X-linked microtubule-associated protein, Mid1, regulates axon development. PNAS 110, 19131–19136.
- Lüders, J., Patel, U.K., and Stearns, T. (2006). GCP-WD is a gamma-tubulin targeting factor required for centrosomal and chromatin-mediated microtubule nucleation. Nat. Cell Biol. 8, 137–147.
- Luhmann, H.J., Fukuda, A., and Kilb, W. (2015). Control of cortical neuronal migration by glutamate and GABA. Front. Cell. Neurosci. 9.
- M Das, J., and Geetha, R. (2019). Corpus Callosum Agenesis. In StatPearls, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Ma, T., Zhang, Q., Cai, Y., You, Y., Rubenstein, J.L.R., and Yang, Z. (2012). A subpopulation of dorsal lateral/caudal ganglionic eminence-derived neocortical interneurons expresses the transcription factor Sp8. Cereb. Cortex 22, 2120–2130.
- Makrythanasis, P., Maroofian, R., Stray-Pedersen, A., Musaev, D., Zaki, M.S., Mahmoud, I.G., Selim, L., Elbadawy, A., Jhangiani, S.N., Coban Akdemir, Z.H., et al. (2018a). Biallelic variants in KIF14 cause intellectual disability with microcephaly. Eur. J. Hum. Genet. 26, 330–339.
- Makrythanasis, P., Maroofian, R., Stray-Pedersen, A., Musaev, D., Zaki, M.S., Mahmoud, I.G., Selim, L., Elbadawy, A., Jhangiani, S.N., Coban Akdemir, Z.H., et al. (2018b). Biallelic variants in KIF14 cause intellectual disability with microcephaly. Eur. J. Hum. Genet. 26, 330–339.
- 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.
- 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.
- Marín, O., Yaron, A., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., and Rubenstein, J.L.R. (2001). Sorting of Striatal and Cortical Interneurons Regulated by Semaphorin-Neuropilin Interactions. Science 293, 872–875.
- Marsh, A.P.L., Heron, D., Edwards, T.J., Quartier, A., Galea, C., Nava, C., Rastetter, A., Moutard, M.-L., Anderson, V., Bitoun, P., et al. (2017). Mutations in DCC cause isolated agenesis of the corpus callosum with incomplete penetrance. Nature Genetics 49, 511–514.
- Marsick, B.M., Roche, F.K., and Letourneau, P.C. (2012). Repulsive axon guidance cues ephrin-A2 and slit3 stop protrusion of the growth cone leading margin concurrently with inhibition of ADF/cofilin and ERM proteins. Cytoskeleton (Hoboken) 69, 496–505.
- Marszalek, J.R., Weiner, J.A., Farlow, S.J., Chun, J., and Goldstein, L.S. (1999). Novel dendritic kinesin sorting identified by different process targeting of two related kinesins: KIF21A and KIF21B. J. Cell Biol. 145, 469–479.
- 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.
- Martin, C.-A., Ahmad, I., Klingseisen, A., Hussain, M.S., Bicknell, L.S., Leitch, A., Nürnberg, G., Toliat, M.R., Murray, J.E., Hunt, D., et al. (2014). Mutations in PLK4, encoding a master regulator of centriole biogenesis, cause microcephaly, growth failure and retinopathy. Nat. Genet. 46, 1283–1292.

- Martínez-Cerdeño, V., and Noctor, S.C. (2014). Cajal, Retzius, and Cajal-Retzius cells. Front Neuroanat 8, 48.
- Martinez-Garay, I., Gil-Sanz, C., Franco, S.J., Espinosa, A., Molnár, Z., and Mueller, U. (2016). Cadherin 2/4 signaling via PTP1B and catenins is crucial for nucleokinesis during radial neuronal migration in the neocortex. Development 143, 2121–2134.
- Martínez-Martínez, M.Á., Ciceri, G., Espinós, A., Fernández, V., Marín, O., and Borrell, V. (2019). Extensive branching of radially-migrating neurons in the mammalian cerebral cortex. J. Comp. Neurol. 527, 1558–1576.
- 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.
- Marx, A., Godinez, W.J., Tsimashchuk, V., Bankhead, P., Rohr, K., and Engel, U. (2013). Xenopus cytoplasmic linker-associated protein 1 (XCLASP1) promotes axon elongation and advance of pioneer microtubules. Mol. Biol. Cell 24, 1544–1558.
- Matsuki, T., Chen, J., and Howell, B.W. (2013). Acute inactivation of the serine-threonine kinase Stk25 disrupts neuronal migration. Neural Dev 8, 21.
- Mayer, C., Hafemeister, C., Bandler, R.C., Machold, R., Batista Brito, R., Jaglin, X., Allaway, K., Butler, A., Fishell, G., and Satija, R. (2018). Developmental diversification of cortical inhibitory interneurons. Nature 555, 457–462.
- Mayr, M.I., Hümmer, S., Bormann, J., Grüner, T., Adio, S., Woehlke, G., and Mayer, T.U. (2007). The human kinesin Kif18A is a motile microtubule depolymerase essential for chromosome congression. Curr. Biol. 17, 488–498.
- McConnell, S.K., and Kaznowski, C.E. (1991). Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex. Science 254, 282–285.
- McNally, F.J., and Roll-Mecak, A. (2018). Microtubule-severing enzymes: From cellular functions to molecular mechanism. J. Cell Biol. 217, 4057–4069.
- McNeely, K.C., Cupp, T.D., Little, J.N., Janisch, K.M., Shrestha, A., and Dwyer, N.D. (2017). Mutation of Kinesin-6 Kif20b causes defects in cortical neuron polarization and morphogenesis. Neural Dev 12, 5.
- Meixner, A., Haverkamp, S., Wässle, H., Führer, S., Thalhammer, J., Kropf, N., Bittner, R.E., Lassmann, H., Wiche, G., and Propst, F. (2000). MAP1B is required for axon guidance and Is involved in the development of the central and peripheral nervous system. J. Cell Biol. 151, 1169–1178.
- Melak, M., Plessner, M., and Grosse, R. (2017). Actin visualization at a glance. J Cell Sci 130, 525–530.
- Mendes, S.W., Henkemeyer, M., and Liebl, D.J. (2006). Multiple Eph Receptors and B-Class Ephrins Regulate Midline Crossing of Corpus Callosum Fibers in the Developing Mouse Forebrain. J. Neurosci. 26, 882–892.
- Michels, S., Foss, K., Park, K., Golden-Grant, K., Saneto, R., Lopez, J., and Mirzaa, G.M. (2017). Mutations of KIF5C cause a neurodevelopmental disorder of infantile-onset epilepsy, absent language, and distinctive malformations of cortical development. Am. J. Med. Genet. A 173, 3127–3131.
- Mierke, C.T. (2018). Microtubules during migration and matrix invasion. In Physics of Cancer, Volume 2 (Second Edition), (IOP Publishing), pp. 9–1 to 9–84.
- Miki, H., Setou, M., Kaneshiro, K., and Hirokawa, N. (2001). All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. PNAS 98, 7004–7011.
- Miki, H., Setou, M., Group, R.G., Members, G.S.L., and Hirokawa, N. (2003). Kinesin Superfamily Proteins (KIFs) in the Mouse Transcriptome. Genome Res. 13, 1455–1465.
- Mitchell, B.D., and Macklis, J.D. (2005). Large-scale maintenance of dual projections by callosal and frontal cortical projection neurons in adult mice. Journal of Comparative Neurology 482, 17–32.
- 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 10, 664–673.
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H., and Ogawa, M. (2001a). Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. Neuron 31, 727–741.
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H., and Ogawa, M. (2001b). 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, 3133–3145.
- Miyoshi, G., Butt, S.J.B., Takebayashi, H., and Fishell, G. (2007). Physiologically Distinct Temporal Cohorts of Cortical Interneurons Arise from Telencephalic Olig2-Expressing Precursors. J. Neurosci. 27, 7786–7798.
- Miyoshi, G., Hjerling-Leffler, J., Karayannis, T., Sousa, V.H., Butt, S.J.B., Battiste, J., Johnson, J.E., Machold, R.P., and Fishell, G. (2010). Genetic Fate Mapping Reveals That the Caudal Ganglionic Eminence Produces a Large and Diverse Population of Superficial Cortical Interneurons. J. Neurosci. 30, 1582–1594.
- Mizuno, H., Hirano, T., and Tagawa, Y. (2007). Evidence for activity-dependent cortical wiring: formation of interhemispheric connections in neonatal mouse visual cortex requires projection neuron activity. J. Neurosci. 27, 6760–6770.
- Mizuno, H., Hirano, T., and Tagawa, Y. (2010). Pre-synaptic and post-synaptic neuronal activity supports the axon development of callosal projection neurons during different post-natal periods in the mouse cerebral cortex. Eur. J. Neurosci. 31, 410–424.
- Mizutani, K., Yoon, K., Dang, L., Tokunaga, A., and Gaiano, N. (2007). Differential Notch signalling distinguishes neural stem cells from intermediate progenitors. Nature 449, 351–355.
- Moawia, A., Shaheen, R., Rasool, S., Waseem, S.S., Ewida, N., Budde, B., Kawalia, A., Motameny, S., Khan, K., Fatima, A., et al. (2017). Mutations of KIF14 cause primary microcephaly by impairing cytokinesis. Ann. Neurol. 82, 562–577.
- Molina-Calavita, M., Barnat, M., Elias, S., Aparicio, E., Piel, M., and Humbert, S. (2014). Mutant huntingtin affects cortical progenitor cell division and development of the mouse neocortex. J. Neurosci. 34, 10034–10040.

- 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., and Macklis, J.D. (2007a). Molecular development of corticospinal motor neuron circuitry. Novartis Found. Symp. 288, 3–15; discussion 15-20, 96–98.
- Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Menezes, J.R.L., and Macklis, J.D. (2007b). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. Nat. Rev. Neurosci. 8, 427–437.
- Monroy, B.Y., Sawyer, D.L., Ackermann, B.E., Borden, M.M., Tan, T.C., and Ori-McKenney, K.M. (2018). Competition between microtubule-associated proteins directs motor transport. Nat Commun 9, 1487.
- Moon, M., and Gomez, T.M. (2010). Balanced Vav2 GEF activity regulates neurite outgrowth and branching in vitro and in vivo. Mol. Cell. Neurosci. 44, 118–128.
- Moore, A.T., Rankin, K.E., von Dassow, G., Peris, L., Wagenbach, M., Ovechkina, Y., Andrieux, A., Job, D., and Wordeman, L. (2005). MCAK associates with the tips of polymerizing microtubules. J. Cell Biol. 169, 391–397.
- Moores, C.A., Perderiset, M., Francis, F., Chelly, J., Houdusse, A., and Milligan, R.A. (2004). Mechanism of Microtubule Stabilization by Doublecortin. Molecular Cell 14, 833–839.
- Morfini, G.A., You, Y.-M., Pollema, S.L., Kaminska, A., Liu, K., Yoshioka, K., Björkblom, B., Coffey, E.T., Bagnato, C., Han, D., et al. (2009). Pathogenic huntingtin inhibits fast axonal transport by activating JNK3 and phosphorylating kinesin. Nature Neuroscience 12, 864–871.
- Morikawa, M., Tanaka, Y., Cho, H.-S., Yoshihara, M., and Hirokawa, N. (2018). The Molecular Motor KIF21B Mediates Synaptic Plasticity and Fear Extinction by Terminating Rac1 Activation. Cell Rep 23, 3864–3877.
- Moua, P., Fullerton, D., Serbus, L.R., Warrior, R., and Saxton, W.M. (2011). Kinesin-1 tail autoregulation and microtubule-binding regions function in saltatory transport but not ooplasmic streaming. Development 138, 1087–1092.
- Muhammad, F., Mahmood Baig, S., Hansen, L., Sajid Hussain, M., Anjum Inayat, I., Aslam, M., Anver Qureshi, J., Toilat, M., Kirst, E., Wajid, M., et al. (2009). Compound heterozygous ASPM mutations in Pakistani MCPH families. Am. J. Med. Genet. A 149A, 926–930.
- Muhia, M., Thies, E., Labonté, D., Ghiretti, A.E., Gromova, K.V., Xompero, F., Lappe-Siefke, C., Hermans-Borgmeyer, I., Kuhl, D., Schweizer, M., et al. (2016). The Kinesin KIF21B Regulates Microtubule Dynamics and Is Essential for Neuronal Morphology, Synapse Function, and Learning and Memory. Cell Rep 15, 968–977.
- 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.
- Muralidharan, H., and Baas, P.W. (2019). Mitotic Motor KIFC1 Is an Organizer of Microtubules in the Axon. J. Neurosci. 39, 3792–3811.
- Murthy, S., Niquille, M., Hurni, N., Limoni, G., Frazer, S., Chameau, P., van Hooft, J.A., Vitalis, T., and Dayer, A. (2014). Serotonin receptor 3A controls interneuron migration into the neocortex. Nat Commun 5, 5524.
- Myers, K.A., and Baas, P.W. (2007). Kinesin-5 regulates the growth of the axon by acting as a brake on its microtubule array. J. Cell Biol. 178, 1081–1091.
- Nadar, V.C., Ketschek, A., Myers, K.A., Gallo, G., and Baas, P.W. (2008). Kinesin-5 is essential for growth-cone turning. Curr. Biol. 18, 1972–1977.
- 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.
- Nadarajah, B., Alifragis, P., Wong, R.O.L., and Parnavelas, J.G. (2002). Ventricle-directed migration in the developing cerebral cortex. Nat. Neurosci. 5, 218–224.
- 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.
- Nakagawa, H., Koyama, K., Murata, Y., Morito, M., Akiyama, T., and Nakamura, Y. (2000). EB3, a novel member of the EB1 family preferentially expressed in the central nervous system, binds to a CNS-specific APC homologue. Oncogene 19, 210–216.
- Nakamuta, S., Funahashi, Y., Namba, T., Arimura, N., Picciotto, M.R., Tokumitsu, H., Soderling, T.R., Sakakibara, A., Miyata, T., Kamiguchi, H., et al. (2011). Local application of neurotrophins specifies axons through inositol 1,4,5-trisphosphate, calcium, and Ca2+/calmodulin-dependent protein kinases. Sci Signal 4, ra76.
- Namba, T., and Huttner, W.B. (2017). Neural progenitor cells and their role in the development and evolutionary expansion of the neocortex. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol 6.
- Namba, T., Kibe, Y., Funahashi, Y., Nakamuta, S., Takano, T., Ueno, T., Shimada, A., Kozawa, S., Okamoto, M., Shimoda, Y., et al. (2014). Pioneering axons regulate neuronal polarization in the developing cerebral cortex. Neuron 81, 814–829.
- 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.
- Narboux-Nême, N., and Gaspar, P. (2008). Development of the cerebral cortex : recent findings from studies in mouse and primate. Epilepsies 20, 220–228.
- Neukirchen, D., and Bradke, F. (2011a). Neuronal polarization and the cytoskeleton. Seminars in Cell & Developmental Biology 22, 825–833.
- Neukirchen, D., and Bradke, F. (2011b). Cytoplasmic linker proteins regulate neuronal polarization through microtubule and growth cone dynamics. J. Neurosci. 31, 1528–1538.
- Ng, J., and Luo, L. (2004). Rho GTPases Regulate Axon Growth through Convergent and Divergent Signaling Pathways. Neuron 44, 779–793.
- Ng, J., Nardine, T., Harms, M., Tzu, J., Goldstein, A., Sun, Y., Dietzl, G., Dickson, B.J., and Luo, L. (2002). Rac GTPases control axon growth, guidance and branching. Nature 416, 442.

- Nguyen, M.M., Stone, M.C., and Rolls, M.M. (2011). Microtubules are organized independently of the centrosome in Drosophilaneurons. Neural Development 6, 38.
- 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.
- Nicole, O., Bell, D.M., Leste-Lasserre, T., Doat, H., Guillemot, F., and Pacary, E. (2018). A novel role for CAMKIIβ in the regulation of cortical neuron migration: implications for neurodevelopmental disorders. Mol. Psychiatry 23, 2209–2226.
- Nieto, M., Monuki, E.S., Tang, H., Imitola, J., Haubst, N., Khoury, S.J., Cunningham, J., Gotz, M., and Walsh, C.A. (2004). Expression of Cux-1 and Cux-2 in the subventricular zone and upper layers II-IV of the cerebral cortex. J. Comp. Neurol. 479, 168–180.
- Nieuwenhuis, J., Adamopoulos, A., Bleijerveld, O.B., Mazouzi, A., Stickel, E., Celie, P., Altelaar, M., Knipscheer, P., Perrakis, A., Blomen, V.A., et al. (2017). Vasohibins encode tubulin detyrosinating activity. Science 358, 1453–1456.
- Niquille, M., Garel, S., Mann, F., Hornung, J.-P., Otsmane, B., Chevalley, S., Parras, C., Guillemot, F., Gaspar, P., Yanagawa, Y., et al. (2009). Transient Neuronal Populations Are Required to Guide Callosal Axons: A Role for Semaphorin 3C. PLOS Biology 7, e1000230.
- Nishikimi, M., Oishi, K., and Nakajima, K. (2013). Axon Guidance Mechanisms for Establishment of Callosal Connections. Neural Plast 2013.
- 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.
- Nishimura, Y.V., Nabeshima, Y.-I., and Kawauchi, T. (2017). Morphological and Molecular Basis of Cytoplasmic Dilation and Swelling in Cortical Migrating Neurons. Brain Sci 7.
- Nishioka, C., Liang, H.-F., Barsamian, B., and Sun, S.-W. (2019). Amyloid-beta induced retrograde axonal degeneration in a mouse tauopathy model. Neuroimage 189, 180–191.
- Niwa, S., Tanaka, Y., and Hirokawa, N. (2008). KIF1Bbeta- and KIF1A-mediated axonal transport of presynaptic regulator Rab3 occurs in a GTP-dependent manner through DENN/MADD. Nat. Cell Biol. 10, 1269–1279.
- Niwa, S., Nakajima, K., Miki, H., Minato, Y., Wang, D., and Hirokawa, N. (2012). KIF19A Is a Microtubule-Depolymerizing Kinesin for Ciliary Length Control. Developmental Cell 23, 1167–1175.
- Niwa, S., Lipton, D.M., Morikawa, M., Zhao, C., Hirokawa, N., Lu, H., and Shen, K. (2016). Autoinhibition of a Neuronal Kinesin UNC-104/KIF1A Regulates the Size and Density of Synapses. Cell Reports 16, 2129–2141.
- 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.
- Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Wong, W.S., Clinton, B.K., and Kriegstein, A.R. (2002). Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. J. Neurosci. 22, 3161–3173.
- Noctor, S.C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L., and Kriegstein, A.R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. Nat. Neurosci. 7, 136–144.
- Nowakowski, T.J., Bhaduri, A., Pollen, A.A., Alvarado, B., Mostajo-Radji, M.A., Di Lullo, E., Haeussler, M., Sandoval-Espinosa, C., Liu, S.J., Velmeshev, D., et al. (2017). Spatiotemporal gene expression trajectories reveal developmental hierarchies of the human cortex. Science 358, 1318–1323.
- Ohba, C., Haginoya, K., Osaka, H., Kubota, K., Ishiyama, A., Hiraide, T., Komaki, H., Sasaki, M., Miyatake, S., Nakashima, M., et al. (2015). De novo KIF1A mutations cause intellectual deficit, cerebellar atrophy, lower limb spasticity and visual disturbance. J. Hum. Genet. 60, 739–742.
- Ohshima, T., Ward, J.M., Huh, C.G., Longenecker, G., Veeranna, null, 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.
- Ohtaka-Maruyama, C., Okamoto, M., Endo, K., Oshima, M., Kaneko, N., Yura, K., Okado, H., Miyata, T., and Maeda, N. (2018). Synaptic transmission from subplate neurons controls radial migration of neocortical neurons. Science 360, 313–317.
- Okada, Y., and Hirokawa, N. (1999). A processive single-headed motor: kinesin superfamily protein KIF1A. Science 283, 1152–1157.
- Okada, Y., Yamazaki, H., Sekine-Aizawa, Y., and Hirokawa, N. (1995). The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a unique monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors. Cell 81, 769–780.
- Okada, Y., Higuchi, H., and Hirokawa, N. (2003). Processivity of the single-headed kinesin KIF1A through biased binding to tubulin. Nature 424, 574.
- Olson, H.E., Shen, Y., Poduri, A., Gorman, M.P., Dies, K.A., Robbins, M., Hundley, R., Wu, B., and Sahin, M. (2012). Micro-duplications of 1q32.1 associated with neurodevelopmental delay. European Journal of Medical Genetics 55, 145–150.
- O'Neill, A.C., Kyrousi, C., Einsiedler, M., Burtscher, I., Drukker, M., Markie, D.M., Kirk, E.P., Götz, M., Robertson, S.P., and Cappello, S. (2018). Mob2 Insufficiency Disrupts Neuronal Migration in the Developing Cortex. Front. Cell. Neurosci. 12.
- Oriola, D., and Casademunt, J. (2013). Cooperative force generation of KIF1A Brownian motors. Phys. Rev. Lett. 111, 048103.

- Ostergaard, P., Simpson, M.A., Mendola, A., Vasudevan, P., Connell, F.C., van Impel, A., Moore, A.T., Loeys, B.L., Ghalamkarpour, A., Onoufriadis, A., et al. (2012). Mutations in KIF11 cause autosomal-dominant microcephaly variably associated with congenital lymphedema and chorioretinopathy. Am. J. Hum. Genet. 90, 356–362.
- Otsuka, T., and Kawaguchi, Y. (2008). Firing-Pattern-Dependent Specificity of Cortical Excitatory Feed-Forward Subnetworks. J. Neurosci. 28, 11186–11195.
- Ou, G., Blacque, O.E., Snow, J.J., Leroux, M.R., and Scholey, J.M. (2005). Functional coordination of intraflagellar transport motors. Nature 436, 583–587.
- Papandréou, M.-J., and Leterrier, C. (2018). The functional architecture of axonal actin. Molecular and Cellular Neuroscience 91, 151–159.
- Paridaen, J.T.M.L., 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). Asymmetric inheritance of centrosome-associated primary cilium membrane directs ciliogenesis after cell division. Cell 155, 333–344.
- Park, J.H., and Roll-Mecak, A. (2018). The tubulin code in neuronal polarity. Current Opinion in Neurobiology 51, 95–102.
- Parrini, E., Ramazzotti, A., Dobyns, W.B., Mei, D., Moro, F., Veggiotti, P., Marini, C., Brilstra, E.H., Dalla Bernardina, B., Goodwin, L., et al. (2006). Periventricular heterotopia: phenotypic heterogeneity and correlation with Filamin A mutations. Brain 129, 1892–1906.
- Peckham, M. (2011). Coiled coils and SAH domains in cytoskeletal molecular motors. Biochem. Soc. Trans. 39, 1142–1148.
- Peris, L., Bisbal, M., Martinez-Hernandez, J., Saoudi, Y., Jonckheere, J., Rolland, M., Sebastien, M., Brocard, J., Denarier, E., Bosc, C., et al. (2018). A key function for microtubule-associated-protein 6 in activity-dependent stabilisation of actin filaments in dendritic spines. Nat Commun 9, 3775.
- Petros, T.J., Bultje, R.S., Ross, M.E., Fishell, G., and Anderson, S.A. (2015). Apical versus Basal Neurogenesis Directs Cortical Interneuron Subclass Fate. Cell Rep 13, 1090–1095.
- Petryniak, M.A., Potter, G.B., Rowitch, D.H., and Rubenstein, J.L.R. (2007). Dlx1 and Dlx2 control neuronal versus oligodendroglial cell fate acquisition in the developing forebrain. Neuron 55, 417–433.
- Peyre, E., Silva, C.G., and Nguyen, L. (2015). Crosstalk between intracellular and extracellular signals regulating interneuron production, migration and integration into the cortex. Front Cell Neurosci 9, 129.
- 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, 2125.
- Pinheiro, E.M., Xie, Z., Norovich, A.L., Vidaki, M., Tsai, L.-H., and Gertler, F.B. (2011). Lpd depletion reveals that SRF specifies radial versus tangential migration of pyramidal neurons. Nat Cell Biol 13, 989–995.
- Pinto, L., Drechsel, D., Schmid, M.-T., Ninkovic, J., Irmler, M., Brill, M.S., Restani, L., Gianfranceschi, L., Cerri, C., Weber, S.N., et al. (2009). AP2γ regulates basal progenitor fate in a region- and layer-specific manner in the developing cortex. Nature Neuroscience 12, 1229–1237.
- Piotrowska-Nitsche, K., and Caspary, T. (2012). Live imaging of individual cell divisions in mouse neuroepithelium shows asymmetry in cilium formation and Sonic hedgehog response. Cilia 1.
- Piper, M., Plachez, C., Zalucki, O., Fothergill, T., Goudreau, G., Erzurumlu, R., Gu, C., and Richards, L.J. (2009). Neuropilin 1-Sema Signaling Regulates Crossing of Cingulate Pioneering Axons during Development of the Corpus Callosum. Cereb Cortex 19, i11–i21.
- Pirozzi, F., Nelson, B., and Mirzaa, G. (2018). From microcephaly to megalencephaly: determinants of brain size. Dialogues Clin Neurosci 20, 267–282.
- Pla, R., Borrell, V., Flames, N., and Marín, O. (2006). Layer acquisition by cortical GABAergic interneurons is independent of Reelin signaling. J. Neurosci. 26, 6924–6934.
- 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., Saillour, Y., Fourniol, F., Francis, F., Souville, I., Valence, S., Desguerre, I., Marie Lepage, J., Boddaert, N., Line Jacquemont, M., et al. (2013a). Expanding the spectrum of TUBA1A-related cortical dysgenesis to Polymicrogyria. Eur. J. Hum. Genet. 21, 381–385.
- Poirier, K., Lebrun, N., Broix, L., Tian, G., Saillour, Y., Boscheron, C., Parrini, E., Valence, S., Pierre, B.S., Oger, M., et al. (2013b). Mutations in TUBG1, DYNC1H1, KIF5C and KIF2A cause malformations of cortical development and microcephaly. Nat. Genet. 45, 639–647.
- Pollen, A.A., Nowakowski, T.J., Chen, J., Retallack, H., Sandoval-Espinosa, C., Nicholas, C.R., Shuga, J., Liu, S.J., Oldham, M.C., Diaz, A., et al. (2015). Molecular Identity of Human Outer Radial Glia during Cortical Development. Cell 163, 55–67.
- Polleux, F., and Snider, W. (2010). Initiating and growing an axon. Cold Spring Harb Perspect Biol 2, a001925.
- Pongrakhananon, V., Saito, H., Hiver, S., Abe, T., Shioi, G., Meng, W., and Takeichi, M. (2018). CAMSAP3 maintains neuronal polarity through regulation of microtubule stability. PNAS 115, 9750–9755.
- des Portes, V., Pinard, J.M., Billuart, P., Vinet, M.C., Koulakoff, A., Carrié, A., Gelot, A., Dupuis, E., Motte, J., Berwald-Netter, Y., et al. (1998). A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. Cell 92, 51–61.
- Potter, G.B., Petryniak, M.A., Shevchenko, E., McKinsey, G.L., Ekker, M., and Rubenstein, J.L.R. (2009). Generation of Cre-transgenic mice using Dlx1/Dlx2 enhancers and their characterization in GABAergic interneurons. Molecular and Cellular Neuroscience 40, 167–186.

- Powell, K.J., Hori, S.E., Leslie, R., Andrieux, A., Schellinck, H., Thorne, M., and Robertson, G.S. (2007). Cognitive impairments in the STOP null mouse model of schizophrenia. Behav. Neurosci. 121, 826–835.
- Pozas, E., and Ibáñez, C.F. (2005). GDNF and GFRalpha1 promote differentiation and tangential migration of cortical GABAergic neurons. Neuron 45, 701–713.
- Purohit, A., Tynan, S.H., Vallee, R., and Doxsey, S.J. (1999). Direct Interaction of Pericentrin with Cytoplasmic Dynein Light Intermediate Chain Contributes to Mitotic Spindle Organization. The Journal of Cell Biology 147, 481–492.
- Putoux, A., Thomas, S., Coene, K.L.M., Davis, E.E., Alanay, Y., Ogur, G., Uz, E., Buzas, D., Gomes, C., Patrier, S., et al. (2011). KIF7 mutations cause fetal hydrolethalus and acrocallosal syndromes. Nat. Genet. 43, 601–606.
- Qiang, L., Yu, W., Andreadis, A., Luo, M., and Baas, P.W. (2006). Tau protects microtubules in the axon from severing by katanin. J. Neurosci. 26, 3120–3129.
- Rabadán, M.A., Cayuso, J., Le Dréau, G., Cruz, C., Barzi, M., Pons, S., Briscoe, J., and Martí, E. (2012). Jagged2 controls the generation of motor neuron and oligodendrocyte progenitors in the ventral spinal cord. Cell Death and Differentiation 19, 209–219.
- Raballo, R., Rhee, J., Lyn-Cook, R., Leckman, J.F., Schwartz, M.L., and Vaccarino, F.M. (2000). Basic fibroblast growth factor (Fgf2) is necessary for cell proliferation and neurogenesis in the developing cerebral cortex. J. Neurosci. 20, 5012–5023.
- 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.
- Rallu, M., Machold, R., Gaiano, N., Corbin, J.G., McMahon, A.P., and Fishell, G. (2002). Dorsoventral patterning is established in the telencephalon of mutants lacking both Gli3 and Hedgehog signaling. Development 129, 4963–4974.
- Ramahi, M., Rad, A., Shirzadeh, E., and Najafi, M. (2018). KIF21A Gene c.2860C>T Mutation in CFEOM1A: The First Report from Iran. Avicenna J Med Biotechnol 10, 273–276.
- Ramos, R.L., Bai, J., and LoTurco, J.J. (2006). Heterotopia Formation in Rat but Not Mouse Neocortex after RNA Interference Knockdown of DCX. Cereb Cortex 16, 1323–1331.
- Rash, B.G., and Richards, L.J. (2001). A role for cingulate pioneering axons in the development of the corpus callosum. Journal of Comparative Neurology 434, 147–157.
- Reed, N.A., Cai, D., Blasius, T.L., Jih, G.T., Meyhofer, E., Gaertig, J., and Verhey, K.J. (2006). Microtubule Acetylation Promotes Kinesin-1 Binding and Transport. Current Biology 16, 2166–2172.
- Reillo, I., and Borrell, V. (2012). Germinal zones in the developing cerebral cortex of ferret: ontogeny, cell cycle kinetics, and diversity of progenitors. Cereb. Cortex 22, 2039–2054.
- Reilly, M.L., Stokman, M.F., Magry, V., Jeanpierre, C., Alves, M., Paydar, M., Hellinga, J., Delous, M., Pouly, D., Failler, M., et al. (2018). Loss of function mutations in KIF14 cause severe microcephaly and kidney development defects in humans and zebrafish. Hum. Mol. Genet.
- Ren, J., Wang, S., Chen, H., Wang, W., Huo, L., and Feng, W. (2018). Coiled-coil 1-mediated fastening of the neck and motor domains for kinesin-3 autoinhibition. PNAS 115, E11933–E11942.
- Richards, L.J. (2002). Axonal pathfinding mechanisms at the cortical midline and in the development of the corpus callosum. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 35, 1431–1439.
- van Riel, W.E., Rai, A., Bianchi, S., Katrukha, E.A., Liu, Q., Heck, A.J., Hoogenraad, C.C., Steinmetz, M.O., Kapitein, L.C., and Akhmanova, A. (2017). Kinesin-4 KIF21B is a potent microtubule pausing factor. Elife 6.
- del Río, J.A., Martínez, 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.
- Robitaille, J.M., Gillett, R.M., LeBlanc, M.A., Gaston, D., Nightingale, M., Mackley, M.P., Parkash, S., Hathaway, J., Thomas, A., Ells, A., et al. (2014). Phenotypic overlap between familial exudative vitreoretinopathy and microcephaly, lymphedema, and chorioretinal dysplasia caused by KIF11 mutations. JAMA Ophthalmol 132, 1393–1399.
- Rodríguez-Tornos, F.M., Briz, C.G., Weiss, L.A., Sebastián-Serrano, A., Ares, S., Navarrete, M., Frangeul, L., Galazo, M., Jabaudon, D., Esteban, J.A., et al. (2016). Cux1 Enables Interhemispheric Connections of Layer II/III Neurons by Regulating Kv1-Dependent Firing. Neuron 89, 494–506.
- Roger, B., Al-Bassam, J., Dehmelt, L., Milligan, R.A., and Halpain, S. (2004). MAP2c, but not tau, binds and bundles F-actin via its microtubule binding domain. Curr. Biol. 14, 363–371.
- Roostalu, J., and Surrey, T. (2017). Microtubule nucleation: beyond the template. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 18, 702–710.
- Rudy, B., Fishell, G., Lee, S., and Hjerling-Leffler, J. (2011). Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. Dev Neurobiol 71, 45–61.
- Saadaoui, M., Konno, D., Loulier, K., Goiame, R., Jadhav, V., Mapelli, M., Matsuzaki, F., and Morin, X. (2017). Loss of the canonical spindle orientation function in the Pins/LGN homolog AGS3. EMBO Reports 18, 1509–1520.
- Sahasrabudhe, A., Ghate, K., Mutalik, S., Jacob, A., and Ghose, A. (2016). Formin 2 regulates the stabilization of filopodial tip adhesions in growth cones and affects neuronal outgrowth and pathfinding in vivo. Development 143, 449–460.
- 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.
- Sakakibara, A., Sato, T., Ando, R., Noguchi, N., Masaoka, M., and Miyata, T. (2014). Dynamics of Centrosome Translocation and Microtubule Organization in Neocortical Neurons during Distinct Modes of Polarization. Cereb Cortex 24, 1301–1310.
- 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.

- San Miguel-Ruiz, J.E., and Letourneau, P.C. (2014). The role of Arp2/3 in growth cone actin dynamics and guidance is substrate dependent. J. Neurosci. 34, 5895–5908.
- Sánchez-Huertas, C., Freixo, F., Viais, R., Lacasa, C., Soriano, E., and Lüders, J. (2016). Non-centrosomal nucleation mediated by augmin organizes microtubules in post-mitotic neurons and controls axonal microtubule polarity. Nat Commun 7, 12187.
- 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, e1000511.
- Sapir, T., Levy, T., Sakakibara, A., Rabinkov, A., Miyata, T., and Reiner, O. (2013). Shootin1 acts in concert with KIF20B to promote polarization of migrating neurons. J. Neurosci. 33, 11932–11948.
- Sasaki, S., Shionoya, A., Ishida, M., Gambello, M.J., Yingling, J., Wynshaw-Boris, A., and Hirotsune, S. (2000). A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system. Neuron 28, 681–696.
- 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. Molecular and Cellular Biology 25, 7812–7827.
- Sattilaro, R.F. (1986). Interaction of microtubule-associated protein 2 with actin filaments. Biochemistry 25, 2003–2009.
- Sauerland, C., Menzies, B.R., Glatzle, M., Seeger, J., Renfree, M.B., and Fietz, S.A. (2018). The Basal Radial Glia Occurs in Marsupials and Underlies the Evolution of an Expanded Neocortex in Therian Mammals. Cereb. Cortex 28, 145–157.
- Sayas, C.L., Basu, S., van der Reijden, M., Bustos-Morán, E., Liz, M., Sousa, M., van IJcken, W.F.J., Avila, J., and Galjart, N. (2019). Distinct Functions for Mammalian CLASP1 and -2 During Neurite and Axon Elongation. Front Cell Neurosci 13, 5.
- Schaar, B.T., and McConnell, S.K. (2005). Cytoskeletal coordination during neuronal migration. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102, 13652–13657.
- Schaffer, A.E., Breuss, M.W., Caglayan, A.O., Al-Sanaa, N., Al-Abdulwahed, H.Y., Kaymakçalan, H., Yılmaz, C., Zaki, M.S., Rosti, R.O., Copeland, B., et al. (2018). Biallelic loss of human CTNNA2, encoding αN-catenin, leads to ARP2/3 complex overactivity and disordered cortical neuronal migration. Nature Genetics 50, 1093–1101.
- Schenk, J., Wilsch-Bräuninger, M., Calegari, F., and Huttner, W.B. (2009). Myosin II is required for interkinetic nuclear migration of neural progenitors. PNAS 106, 16487–16492.
- Schinder, A.F., and Lanuza, G.M. (2018). Whispering neurons fuel cortical highways. Science 360, 265–266.
- Schmechel, D.E., and Rakic, P. (1979). Arrested proliferation of radial glial cells during midgestation in rhesus monkey. Nature 277, 303.
- Schmid, M.-T., Weinandy, F., Wilsch-Bräuninger, M., Huttner, W.B., Cappello, S., and Götz, M. (2014). The role of α-E-catenin in cerebral cortex development: radial glia specific effect on neuronal migration. Front Cell Neurosci 8, 215.
- 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.
- Seeley, E.S., and Nachury, M.V. (2010). The perennial organelle: assembly and disassembly of the primary cilium. J. Cell. Sci. 123, 511–518.
- Seitz, A., Kojima, H., Oiwa, K., Mandelkow, E.-M., Song, Y.-H., and Mandelkow, E. (2002). Single-molecule investigation of the interference between kinesin, tau and MAP2c. EMBO J. 21, 4896–4905.
- Sekine, K., Honda, T., Kawauchi, T., Kubo, K., and Nakajima, K. (2011). The Outermost Region of the Developing Cortical Plate Is Crucial for Both the Switch of the Radial Migration Mode and the Dab1-Dependent “Inside-Out” Lamination in the Neocortex. J. Neurosci. 31, 9426–9439.
- 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 α5β1. Neuron 76, 353–369.
- Selden, S.C., and Pollard, T.D. (1986). Interaction of Actin Filaments with Microtubules Is Mediated by Microtubule-Associated Proteins and Regulated by Phosphorylationa. Annals of the New York Academy of Sciences 466, 803–812.
- Sessa, A., Mao, C.-A., Hadjantonakis, A.-K., Klein, W.H., and Broccoli, V. (2008). Tbr2 directs conversion of radial glia into basal precursors and guides neuronal amplification by indirect neurogenesis in the developing neocortex. Neuron 60, 56–69.
- Sharp, D.J., and Ross, J.L. (2012). Microtubule-severing enzymes at the cutting edge. J. Cell. Sci. 125, 2561–2569.
- She, Z.-Y., and Yang, W.-X. (2017). Molecular mechanisms of kinesin-14 motors in spindle assembly and chromosome segregation. J Cell Sci 130, 2097–2110.
- Sheen, V.L., Feng, Y., Graham, D., Takafuta, T., Shapiro, S.S., and Walsh, C.A. (2002). Filamin A and Filamin B are co-expressed within neurons during periods of neuronal migration and can physically interact. Hum. Mol. Genet. 11, 2845–2854.
- Shelly, M., Cancedda, L., Heilshorn, S., Sumbre, G., and Poo, M.-M. (2007). LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization. Cell 129, 565–577.
- Shen, Q., Wang, Y., Dimos, J.T., Fasano, C.A., Phoenix, T.N., Lemischka, I.R., Ivanova, N.B., Stifani, S., Morrisey, E.E., and Temple, S. (2006). The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. Nat. Neurosci. 9, 743–751.
- Shikanai, M., Nakajima, K., and Kawauchi, T. (2011). N-Cadherin regulates radial glial fiber-dependent migration of cortical locomoting neurons. Communicative & Integrative Biology 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.
- 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., and Richards, L.J. (2001). Cortical Axon Guidance by the Glial Wedge during the Development of the Corpus Callosum. J. Neurosci. 21, 2749–2758.
- Shu, T., Puche, A.C., and Richards, L.J. (2003). Development of midline glial populations at the corticoseptal boundary. Journal of Neurobiology 57, 81–94.
- 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.
- Siddiqui, N., Zwetsloot, A.J., Bachmann, A., Roth, D., Hussain, H., Brandt, J., Kaverina, I., and Straube, A. (2019). PTPN21 and Hook3 relieve KIF1C autoinhibition and activate intracellular transport. Nat Commun 10, 2693.
- Silva, C.G., Peyre, E., Adhikari, M.H., Tielens, S., Tanco, S., Van Damme, P., Magno, L., Krusy, N., Agirman, G., Magiera, M.M., et al. (2018). Cell-Intrinsic Control of Interneuron Migration Drives Cortical Morphogenesis. Cell 172, 1063-1078.e19.
- Sirajuddin, M., Rice, L.M., and Vale, R.D. (2014). Regulation of microtubule motors by tubulin isotypes and post-translational modifications. Nat. Cell Biol. 16, 335–344.
- Sjöström, P.J., and Häusser, M. (2006). A Cooperative Switch Determines the Sign of Synaptic Plasticity in Distal Dendrites of Neocortical Pyramidal Neurons. Neuron 51, 227–238.
- Slep, K.C., Rogers, S.L., Elliott, S.L., Ohkura, H., Kolodziej, P.A., and Vale, R.D. (2005). Structural determinants for EB1-mediated recruitment of APC and spectraplakins to the microtubule plus end. The Journal of Cell Biology 168, 587–598.
- Smart, I.H.M., Dehay, C., Giroud, P., Berland, M., and Kennedy, H. (2002). Unique morphological features of the proliferative zones and postmitotic compartments of the neural epithelium giving rise to striate and extrastriate cortex in the monkey. Cereb. Cortex 12, 37–53.
- Snow, J.J., Ou, G., Gunnarson, A.L., Walker, M.R.S., Zhou, H.M., Brust-Mascher, I., and Scholey, J.M. (2004). Two anterograde intraflagellar transport motors cooperate to build sensory cilia on C. elegans neurons. Nature Cell Biology 6, 1109.
- Song, Y., and Brady, S.T. (2015). Post-translational modifications of tubulin: pathways to functional diversity of microtubules. Trends Cell Biol. 25, 125–136.
- Soppina, V., Norris, S.R., Dizaji, A.S., Kortus, M., Veatch, S., Peckham, M., and Verhey, K.J. (2014). Dimerization of mammalian kinesin-3 motors results in superprocessive motion. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111, 5562–5567.
- Sousa, A.M.M., Meyer, K.A., Santpere, G., Gulden, F.O., and Sestan, N. (2017). Evolution of the Human Nervous System Function, Structure, and Development. Cell 170, 226–247.
- Sowell, E.R., Mattson, S.N., Thompson, P.M., Jernigan, T.L., Riley, E.P., and Toga, A.W. (2001). Mapping callosal morphology and cognitive correlates: effects of heavy prenatal alcohol exposure. Neurology 57, 235–244.
- Spillane, M., Ketschek, A., Jones, S.L., Korobova, F., Marsick, B., Lanier, L., Svitkina, T., and Gallo, G. (2011). The actin nucleating Arp2/3 complex contributes to the formation of axonal filopodia and branches through the regulation of actin patch precursors to filopodia. Developmental Neurobiology 71, 747–758.
- Spillane, M., Ketschek, A., Donnelly, C.J., Pacheco, A., Twiss, J.L., and Gallo, G. (2012). Nerve growth factor-induced formation of axonal filopodia and collateral branches involves the intra-axonal synthesis of regulators of the actin-nucleating Arp2/3 complex. J. Neurosci. 32, 17671–17689.
- Spillane, M., Ketschek, A., Merianda, T.T., Twiss, J.L., and Gallo, G. (2013). Mitochondria coordinate sites of axon branching through localized intra-axonal protein synthesis. Cell Rep 5, 1564–1575.
- van Spronsen, M., Mikhaylova, M., Lipka, J., Schlager, M.A., van den Heuvel, D.J., Kuijpers, M., Wulf, P.S., Keijzer, N., Demmers, J., Kapitein, L.C., et al. (2013). TRAK/Milton motor-adaptor proteins steer mitochondrial trafficking to axons and dendrites. Neuron 77, 485–502.
- Srivatsa, S., Parthasarathy, S., Molnár, Z., and Tarabykin, V. (2015). Sip1 downstream Effector ninein controls neocortical axonal growth, ipsilateral branching, and microtubule growth and stability. Neuron 85, 998–1012.
- Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., Mandelkow, E., and Mandelkow, E.-M. (2002). Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. J. Cell Biol. 156, 1051–1063.
- 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.
- Stiess, M., Maghelli, N., Kapitein, L.C., Gomis-Rüth, S., Wilsch-Bräuninger, M., Hoogenraad, C.C., Tolić-Nørrelykke, I.M., and Bradke, F. (2010). Axon Extension Occurs Independently of Centrosomal Microtubule Nucleation. Science 327, 704–707.
- Stowers, R.S., Megeath, L.J., Górska-Andrzejak, J., Meinertzhagen, I.A., and Schwarz, T.L. (2002). Axonal Transport of Mitochondria to Synapses Depends on Milton, a Novel Drosophila Protein. Neuron 36, 1063–1077.
- Stoykova, A., Götz, M., Gruss, P., and Price, J. (1997). Pax6-dependent regulation of adhesive patterning, R-cadherin expression and boundary formation in developing forebrain. Development 124, 3765–3777.
- Subramanian, L., Bershteyn, M., Paredes, M.F., and Kriegstein, A.R. (2017). Dynamic behaviour of human neuroepithelial cells in the developing forebrain. Nat Commun 8, 14167.
- Sun, D., Zhou, X., Yu, H.-L., He, X.-X., Guo, W.-X., Xiong, W.-C., and Zhu, X.-J. (2017a). Regulation of neural stem cell proliferation and differentiation by Kinesin family member 2a. PLoS ONE 12, e0179047.
- Sun, T., Li, Y., Li, T., Ma, H., Guo, Y., Jiang, X., Hou, M., Huang, S., and Chen, Z. (2017b). JIP1 and JIP3 cooperate to mediate TrkB anterograde axonal transport by activating kinesin-1. Cell. Mol. Life Sci. 74, 4027–4044.

- 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.
- Svoboda, K., Schmidt, C.F., Schnapp, B.J., and Block, S.M. (1993). Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. Nature 365, 721–727.
- Swarnkar, S., Avchalumov, Y., Raveendra, B.L., Grinman, E., and Puthanveettil, S.V. (2018). Kinesin Family of Proteins Kif11 and Kif21B Act as Inhibitory Constraints of Excitatory Synaptic Transmission Through Distinct Mechanisms. Sci Rep 8, 17419.
- Swiech, L., Blazejczyk, M., Urbanska, M., Pietruszka, P., Dortland, B.R., Malik, A.R., Wulf, P.S., Hoogenraad, C.C., and Jaworski, J. (2011). CLIP-170 and IQGAP1 cooperatively regulate dendrite morphology. J. Neurosci. 31, 4555–4568.
- 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.
- Tahirovic, S., Hellal, F., Neukirchen, D., Hindges, R., Garvalov, B.K., Flynn, K.C., Stradal, T.E., Chrostek-Grashoff, A., Brakebusch, C., and Bradke, F. (2010). Rac1 regulates neuronal polarization through the WAVE complex. J. Neurosci. 30, 6930–6943.
- Takahashi, T., Nowakowski, R.S., and Caviness, V.S. (1995). The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. J. Neurosci. 15, 6046–6057.
- Takahashi, T., Nowakowski, R.S., and Caviness, V.S. (1996). The Leaving or Q Fraction of the Murine Cerebral Proliferative Epithelium: A General Model of Neocortical Neuronogenesis. J. Neurosci. 16, 6183–6196.
- Takei, Y., Teng, J., Harada, A., and Hirokawa, N. (2000). Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. J. Cell Biol. 150, 989–1000.
- Takiguchi-Hayashi, K., Sekiguchi, M., Ashigaki, S., Takamatsu, M., Hasegawa, H., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Nakanishi, S., and Tanabe, Y. (2004). Generation of reelin-positive marginal zone cells from the caudomedial wall of telencephalic vesicles. J. Neurosci. 24, 2286–2295.
- Tan, X., Liu, W.A., Zhang, X.-J., Shi, W., Ren, S.-Q., Li, Z., Brown, K.N., and Shi, S.-H. (2016). Vascular Influence on Ventral Telencephalic Progenitors and Neocortical Interneuron Production. Dev. Cell 36, 624–638.
- Tanaka, D.H., and Nakajima, K. (2012). Migratory pathways of GABAergic interneurons when they enter the neocortex. Eur. J. Neurosci. 35, 1655–1660.
- 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.
- Tao, K., Matsuki, N., and Koyama, R. (2014). AMP-activated protein kinase mediates activity-dependent axon branching by recruiting mitochondria to axon. Dev Neurobiol 74, 557–573.
- 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.
- Tas, R.P., Chazeau, A., Cloin, B.M.C., Lambers, M.L.A., Hoogenraad, C.C., and Kapitein, L.C. (2017). Differentiation between Oppositely Oriented Microtubules Controls Polarized Neuronal Transport. Neuron 96, 1264-1271.e5.
- Taverna, E., and Huttner, W.B. (2010). Neural Progenitor Nuclei IN Motion. Neuron 67, 906–914.
- Teixidó-Travesa, N., Villén, J., Lacasa, C., Bertran, M.T., Archinti, M., Gygi, S.P., Caelles, C., Roig, J., and Lüders, J. (2010). The gammaTuRC revisited: a comparative analysis of interphase and mitotic human gammaTuRC redefines the set of core components and identifies the novel subunit GCP8. Mol. Biol. Cell 21, 3963–3972.
- Telley, L., Govindan, S., Prados, J., Stevant, I., Nef, S., Dermitzakis, E., Dayer, A., and Jabaudon, D. (2016). Sequential transcriptional waves direct the differentiation of newborn neurons in the mouse neocortex. Science 351, 1443–1446.
- Telley, L., Agirman, G., Prados, J., Amberg, N., Fièvre, S., Oberst, P., Bartolini, G., Vitali, I., Cadilhac, C., Hippenmeyer, S., et al. (2019). Temporal patterning of apical progenitors and their daughter neurons in the developing neocortex. Science 364.
- Teng, J., Takei, Y., Harada, A., Nakata, T., Chen, J., and Hirokawa, N. (2001). Synergistic effects of MAP2 and MAP1B knockout in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization. J. Cell Biol. 155, 65–76.
- Terada, S. (2003). Where does slow axonal transport go? Neurosci. Res. 47, 367–372.
- Tessier-Lavigne, M., and Goodman, C.S. (1996). The molecular biology of axon guidance. Science 274, 1123–1133.
- Thorn, K.S., Ubersax, J.A., and Vale, R.D. (2000). Engineering the processive run length of the kinesin motor. J. Cell Biol. 151, 1093–1100.
- Tian, G., Cristancho, A.G., Dubbs, H.A., Liu, G.T., Cowan, N.J., and Goldberg, E.M. (2016). A patient with lissencephaly, developmental delay, and infantile spasms, due to de novo heterozygous mutation of KIF2A. Mol Genet Genomic Med 4, 599–603.
- Tielens, S., Huysseune, S., Godin, J.D., Chariot, A., Malgrange, B., and Nguyen, L. (2016). Elongator controls cortical interneuron migration by regulating actomyosin dynamics. Cell Res. 26, 1131–1148.
- 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. Nature Reviews Neuroscience 4, 496.
- Tiveron, M.-C., Rossel, M., Moepps, B., Zhang, Y.L., Seidenfaden, R., Favor, J., König, N., and Cremer, H. (2006). Molecular Interaction between Projection Neuron Precursors and Invading Interneurons via Stromal-Derived Factor 1 (CXCL12)/CXCR4 Signaling in the Cortical Subventricular Zone/Intermediate Zone. J. Neurosci. 26, 13273–13278.

- Tivodar, S., Kalemaki, K., Kounoupa, Z., Vidaki, M., Theodorakis, K., Denaxa, M., Kessaris, N., de Curtis, I., Pachnis, V., and Karagogeos, D. (2015). Rac-GTPases Regulate Microtubule Stability and Axon Growth of Cortical GABAergic Interneurons. Cereb. Cortex 25, 2370–2382.
- Tomaselli, P.J., Rossor, A.M., Horga, A., Laura, M., Blake, J.C., Houlden, H., and Reilly, M.M. (2017). A de novo dominant mutation in KIF1A associated with axonal neuropathy, spasticity and autism spectrum disorder. J. Peripher. Nerv. Syst. 22, 460–463.
- Toriyama, M., Kozawa, S., Sakumura, Y., and Inagaki, N. (2013). Conversion of a signal into forces for axon outgrowth through Pak1-mediated shootin1 phosphorylation. Curr. Biol. 23, 529–534.
- Tortosa, E., Adolfs, Y., Fukata, M., Pasterkamp, R.J., Kapitein, L.C., and Hoogenraad, C.C. (2017). Dynamic Palmitoylation Targets MAP6 to the Axon to Promote Microtubule Stabilization during Neuronal Polarization. Neuron 94, 809-825.e7.
- Tovar-Moll, F., Monteiro, M., Andrade, J., Bramati, I.E., Vianna-Barbosa, R., Marins, T., Rodrigues, E., Dantas, N., Behrens, T.E.J., Oliveira-Souza, R. de, et al. (2014). Structural and functional brain rewiring clarifies preserved interhemispheric transfer in humans born without the corpus callosum. PNAS 111, 7843–7848.
- 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.
- Trivedi, N., Marsh, P., Goold, R.G., Wood-Kaczmar, A., and Gordon-Weeks, P.R. (2005). Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylation of MAP1B at Ser1260 and Thr1265 is spatially restricted to growing axons. J. Cell. Sci. 118, 993–1005.
- 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. Nature Neuroscience 13, 1463–1471.
- 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.
- Tsutsumi, M., Yokoi, S., Miya, F., Miyata, M., Kato, M., Okamoto, N., Tsunoda, T., Yamasaki, M., Kanemura, Y., Kosaki, K., et al. (2016). Novel compound heterozygous variants in PLK4 identified in a patient with autosomal recessive microcephaly and chorioretinopathy. Eur. J. Hum. Genet. 24, 1702–1706.
- Tsvetkov, A.S., Samsonov, A., Akhmanova, A., Galjart, N., and Popov, S.V. (2007). Microtubule-binding proteins CLASP1 and CLASP2 interact with actin filaments. Cell Motil. Cytoskeleton 64, 519–530.
- 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.
- Tunovic, S., Barañano, K.W., Barkovich, J.A., Strober, J.B., Jamal, L., and Slavotinek, A.M. (2015). Novel KIF7 missense substitutions in two patients presenting with multiple malformations and features of acrocallosal syndrome. Am. J. Med. Genet. A 167A, 2767–2776.
- Tymanskyj, S.R., Scales, T.M.E., and Gordon-Weeks, P.R. (2012). MAP1B enhances microtubule assembly rates and axon extension rates in developing neurons. Mol. Cell. Neurosci. 49, 110–119.
- Tymanskyj, S.R., Yang, B., Falnikar, A., Lepore, A.C., and Ma, L. (2017). MAP7 Regulates Axon Collateral Branch Development in Dorsal Root Ganglion Neurons. J. Neurosci. 37, 1648–1661.
- Tymanskyj, S.R., Yang, B.H., Verhey, K.J., and Ma, L. (2018). MAP7 regulates axon morphogenesis by recruiting kinesin-1 to microtubules and modulating organelle transport. Elife 7.
- Tynan, S.H., Purohit, A., Doxsey, S.J., and Vallee, R.B. (2000). Light Intermediate Chain 1 Defines a Functional Subfraction of Cytoplasmic Dynein Which Binds to Pericentrin. J. Biol. Chem. 275, 32763–32768.
- Umeshima, H., Hirano, T., and Kengaku, M. (2007). Microtubule-based nuclear movement occurs independently of centrosome positioning in migrating neurons. PNAS 104, 16182–16187.
- Unni, D.K., Piper, M., Moldrich, R.X., Gobius, I., Liu, S., Fothergill, T., Donahoo, A.-L.S., Baisden, J.M., Cooper, H.M., and Richards, L.J. (2012). Multiple Slits regulate the development of midline glial populations and the corpus callosum. Developmental Biology 365, 36–49.
- van der Vaart, B., van Riel, W.E., Doodhi, H., Kevenaar, J.T., Katrukha, E.A., Gumy, L., Bouchet, B.P., Grigoriev, I., Spangler, S.A., Yu, K.L., et al. (2013). CFEOM1-associated kinesin KIF21A is a cortical microtubule growth inhibitor. Dev. Cell 27, 145–160.
- Vaccarino, F.M., Schwartz, M.L., Raballo, R., Nilsen, J., Rhee, J., Zhou, M., Doetschman, T., Coffin, J.D., Wyland, J.J., and Hung, Y.T. (1999). Changes in cerebral cortex size are governed by fibroblast growth factor during embryogenesis. Nat. Neurosci. 2, 246–253.
- Vale, R.D., Reese, T.S., and Sheetz, M.P. (1985). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. Cell 42, 39–50.
- Valiente, M., and Marín, O. (2010). Neuronal migration mechanisms in development and disease. Curr. Opin. Neurobiol. 20, 68–78.
- 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.
- Verhey, K.J., and Hammond, J.W. (2009). Traffic control: regulation of kinesin motors. Nature Reviews Molecular Cell Biology 10, 765–777.

- Visscher, K., Schnitzer, M.J., and Block, S.M. (1999). Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp. Nature 400, 184–189.
- Vogt, D., Hunt, R.F., Mandal, S., Sandberg, M., Silberberg, S.N., Nagasawa, T., Yang, Z., Baraban, S.C., and Rubenstein, J.L.R. (2014). Lhx6 directly regulates Arx and CXCR7 to determine cortical interneuron fate and laminar position. Neuron 82, 350–364.
- Volle, J., Brocard, J., Saoud, M., Gory-Faure, S., Brunelin, J., Andrieux, A., and Suaud-Chagny, M.-F. (2013). Reduced expression of STOP/MAP6 in mice leads to cognitive deficits. Schizophr Bull 39, 969–978.
- Wahl, S., Barth, H., Ciossek, T., Aktories, K., and Mueller, B.K. (2000). Ephrin-A5 Induces Collapse of Growth Cones by Activating Rho and Rho Kinase. The Journal of Cell Biology 149, 263–270.
- Walters, G.B., Gustafsson, O., Sveinbjornsson, G., Eiriksdottir, V.K., Agustsdottir, A.B., Jonsdottir, G.A., Steinberg, S., Gunnarsson, A.F., Magnusson, M.I., Unnsteinsdottir, U., et al. (2018). MAP1B mutations cause intellectual disability and extensive white matter deficit. Nat Commun 9, 3456.
- Wamsley, B., and Fishell, G. (2017). Genetic and activity-dependent mechanisms underlying interneuron diversity. Nature Reviews Neuroscience 18, 299–309.
- Wang, X., and Schwarz, T.L. (2009). The Mechanism of Ca2+-Dependent Regulation of Kinesin-Mediated Mitochondrial Motility. Cell 136, 163–174.
- Wang, C.-L., Zhang, L., Zhou, Y., Zhou, J., Yang, X.-J., Duan, S., Xiong, Z.-Q., and Ding, Y.-Q. (2007). Activity-dependent development of callosal projections in the somatosensory cortex. J. Neurosci. 27, 11334–11342.
- 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, P.-S., Chou, F.-S., Ramachandran, S., Xia, S., Chen, H.-Y., Guo, F., Suraneni, P., Maher, B.J., and Li, R. (2016b). Crucial roles of the Arp2/3 complex during mammalian corticogenesis. Development 143, 2741–2752.
- Wang, X., Tsai, J.-W., Imai, J.H., Lian, W.-N., Vallee, R.B., and Shi, S.-H. (2009). Asymmetric centrosome inheritance maintains neural progenitors in the neocortex. Nature 461, 947–955.
- Wang, X., Tsai, J.-W., LaMonica, B., and Kriegstein, A.R. (2011). A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex. Nature Neuroscience 14, 555–561.
- Watanabe, T., Wang, S., Noritake, J., Sato, K., Fukata, M., Takefuji, M., Nakagawa, M., Izumi, N., Akiyama, T., and Kaibuchi, K. (2004). Interaction with IQGAP1 Links APC to Rac1, Cdc42, and Actin Filaments during Cell Polarization and Migration. Developmental Cell 7, 871–883.
- Welagen, J., and Anderson, S. (2011). Origins of neocortical interneurons in mice. Developmental Neurobiology 71, 10–17.
- Weng, Z., Shang, Y., Yao, D., Zhu, J., and Zhang, R. (2018). Structural analyses of key features in the KANK1·KIF21A complex yield mechanistic insights into the cross-talk between microtubules and the cell cortex. J. Biol. Chem. 293, 215–225.
- Wilkie, A.O. (1994). The molecular basis of genetic dominance. J. Med. Genet. 31, 89–98.
- Willemsen, M.H., Vissers, L.E.L., Willemsen, M.A.A.P., van Bon, B.W.M., Kroes, T., de Ligt, J., de Vries, B.B., Schoots, J., Lugtenberg, D., Hamel, B.C.J., et al. (2012). Mutations in DYNC1H1 cause severe intellectual disability with neuronal migration defects. J. Med. Genet. 49, 179–183.
- Willemsen, M.H., Ba, W., Wissink-Lindhout, W.M., Brouwer, A.P.M. de, Haas, S.A., Bienek, M., Hu, H., Vissers, L.E.L.M., Bokhoven, H. van, Kalscheuer, V., et al. (2014). Involvement of the kinesin family members KIF4A and KIF5C in intellectual disability and synaptic function. Journal of Medical Genetics 51, 487–494.
- Wilsch-Bräuninger, 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.
- Wonders, C.P., and Anderson, S.A. (2006). The origin and specification of cortical interneurons. Nat. Rev. Neurosci. 7, 687–696.
- Woods, C.G., and Parker, A. (2013). Investigating microcephaly. Arch. Dis. Child. 98, 707–713.
- Woods, C.G., Bond, J., and Enard, W. (2005). Autosomal Recessive Primary Microcephaly (MCPH): A Review of Clinical, Molecular, and Evolutionary Findings. Am J Hum Genet 76, 717–728.
- Worth, D.C., Daly, C.N., Geraldo, S., Oozeer, F., and Gordon-Weeks, P.R. (2013). Drebrin contains a cryptic F-actin-bundling activity regulated by Cdk5 phosphorylation. J. Cell Biol. 202, 793–806.
- Wozniak, M.J., Melzer, M., Dorner, C., Haring, H.-U., and Lammers, R. (2005). The novel protein KBP regulates mitochondria localization by interaction with a kinesin-like protein. BMC Cell Biology 6, 35.
- Xie, M.-J., Yagi, H., Kuroda, K., Wang, C.-C., Komada, M., Zhao, H., Sakakibara, A., Miyata, T., Nagata, K., Oka, Y., et al. (2013). WAVE2–Abi2 Complex Controls Growth Cone Activity and Regulates the Multipolar–Bipolar Transition as well as the Initiation of Glia-Guided Migration. Cereb Cortex 23, 1410–1423.
- Xu, Q., Cobos, I., Cruz, E.D.L., Rubenstein, J.L., and Anderson, S.A. (2004). Origins of Cortical Interneuron Subtypes. J. Neurosci. 24, 2612–2622.
- Xu, Q., Tam, M., and Anderson, S.A. (2008). Fate mapping Nkx2.1-lineage cells in the mouse telencephalon. J. Comp. Neurol. 506, 16–29.
- Xu, Q., Guo, L., Moore, H., Waclaw, R.R., Campbell, K., and Anderson, S.A. (2010). Sonic hedgehog signaling confers ventral telencephalic progenitors with distinct cortical interneuron fates. Neuron 65, 328–340.
- Yabut, O., Renfro, A., Niu, S., Swann, J.W., Marín, O., and D'Arcangelo, G. (2007). Abnormal laminar position and dendrite development of interneurons in the reeler forebrain. Brain Res. 1140, 75–83.
- Yalgin, C., Ebrahimi, S., Delandre, C., Yoong, L.F., Akimoto, S., Tran, H., Amikura, R., Spokony, R., Torben-Nielsen, B., White, K.P., et al. (2015). Centrosomin represses dendrite branching by orienting microtubule nucleation. Nature Neuroscience 18, 1437–1445.

- Yamada, K., Andrews, C., Chan, W.-M., McKeown, C.A., Magli, A., de Berardinis, T., Loewenstein, A., Lazar, M., O'Keefe, M., Letson, R., et al. (2003). Heterozygous mutations of the kinesin KIF21A in congenital fibrosis of the extraocular muscles type 1 (CFEOM1). Nat. Genet. 35, 318–321.
- Yamada, K.H., Hanada, T., and Chishti, A.H. (2007). The effector domain of human Dlg tumor suppressor acts as a switch that relieves autoinhibition of kinesin-3 motor GAKIN/KIF13B. Biochemistry 46, 10039–10045.
- Yang, T., Sun, Y., Zhang, F., Zhu, Y., Shi, L., Li, H., and Xu, Z. (2012a). POSH Localizes Activated Rac1 to Control the Formation of Cytoplasmic Dilation of the Leading Process and Neuronal Migration. Cell Reports 2, 640–651.
- Yang, Y.J., Baltus, A.E., Mathew, R.S., Murphy, E.A., Evrony, G.D., Gonzalez, D.M., Wang, E.P., Marshall-Walker, C.A., Barry, B.J., Murn, J., et al. (2012b). Microcephaly gene links trithorax and REST/NRSF to control neural stem cell proliferation and differentiation. Cell 151, 1097–1112.
- Yau, K.W., van Beuningen, S.F.B., Cunha-Ferreira, I., Cloin, B.M.C., van Battum, E.Y., Will, L., Schätzle, P., Tas, R.P., van Krugten, J., Katrukha, E.A., et al. (2014). Microtubule minus-end binding protein CAMSAP2 controls axon specification and dendrite development. Neuron 82, 1058–1073.
- 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.
- Yokota, Y., Kim, W.-Y., Chen, Y., Wang, X., Stanco, A., Komuro, Y., Snider, W., and Anton, E.S. (2009). The Adenomatous Polyposis Coli Protein Is an Essential Regulator of Radial Glial Polarity and Construction of the Cerebral Cortex. Neuron 61, 42–56.
- Yokota, Y., Eom, T.-Y., Stanco, A., Kim, W.-Y., Rao, S., Snider, W.D., and Anton, E.S. (2010). Cdc42 and Gsk3 modulate the dynamics of radial glial growth, inter-radial glial interactions and polarity in the developing cerebral cortex. Development 137, 4101–4110.
- 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.
- Yozu, M., Tabata, H., and Nakajima, K. (2004). Birth-date dependent alignment of GABAergic neurons occurs in a different pattern from that of non-GABAergic neurons in the developing mouse visual cortex. Neurosci. Res. 49, 395–403.
- 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.
- Yu, W., Solowska, J.M., Qiang, L., Karabay, A., Baird, D., and Baas, P.W. (2005). Regulation of Microtubule Severing by Katanin Subunits during Neuronal Development. J. Neurosci. 25, 5573–5583.
- Yu, W., Qiang, L., Solowska, J.M., Karabay, A., Korulu, S., and Baas, P.W. (2008). The microtubule-severing proteins spastin and katanin participate differently in the formation of axonal branches. Mol. Biol. Cell 19, 1485–1498.
- Yuan, A., Kumar, A., Peterhoff, C., Duff, K., and Nixon, R.A. (2008). Axonal transport rates in vivo are unaffected by tau deletion or overexpression in mice. J. Neurosci. 28, 1682–1687.
- Zaqout, S., Morris-Rosendahl, D., and Kaindl, A.M. (2017). Autosomal Recessive Primary Microcephaly (MCPH): An Update. Neuropediatrics 48, 135–142.
- Zhang, X., Zhu, J., Yang, G.-Y., Wang, Q.-J., Qian, L., Chen, Y.-M., Chen, F., Tao, Y., Hu, H.-S., Wang, T., et al. (2007). Dishevelled promotes axon differentiation by regulating atypical protein kinase C. Nat. Cell Biol. 9, 743–754.
- 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.
- Zhao, Y., Flandin, P., Long, J.E., Cuesta, M.D., Westphal, H., and Rubenstein, J.L.R. (2008). Distinct molecular pathways for development of telencephalic interneuron subtypes revealed through analysis of Lhx6 mutants. J. Comp. Neurol. 510, 79–99.
- 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-3beta and functions of the microtubule plus end binding protein APC. Neuron 42, 897–912.
- Zhou, J., Wen, Y., She, L., Sui, Y., Liu, L., Richards, L.J., and Poo, M. (2013). Axon position within the corpus callosum determines contralateral cortical projection. PNAS 110, E2714–E2723.
- Zimmer, C., Tiveron, M.-C., Bodmer, R., and Cremer, H. (2004). Dynamics of Cux2 expression suggests that an early pool of SVZ precursors is fated to become upper cortical layer neurons. Cereb. Cortex 14, 1408–1420.
- Zimmer, G., Garcez, P., Rudolph, J., Niehage, R., Weth, F., Lent, R., and Bolz, J. (2008). Ephrin-A5 acts as a repulsive cue for migrating cortical interneurons. European Journal of Neuroscience 28, 62–73.

Publications annexes

1. Broix L, **Asselin L**, Silva CG, Ivanova EL, Tilly P, Gilet JG, Lebrun N, Jagline H, Muraca G, Saillour Y, Drouot N, Reilly ML, Francis F, Benmerah A, Bahi-Buisson N, Belvindrah R, Nguyen L, Godin JD, Chelly J and Hickelmann MV. *Ciliogenesis and cell cycle alterations contribute to KIF2A-related malformations of cortical development*. **Human Molecular Genetics** (2017) 27 (2): 224-238

J'ai participé à l'étude du phénotype de migration radiaire induit par les variants humains de *KIF2A* : j'ai effectué et analysé les expériences de vidéo-microscopie en temps réel sur les coupes corticales éléctroporées (Figure 2).

2. Ivanova EL, Gilet JG, Sulimenko V, Duchon A, Rudolf G, Runge K, Collins SC, **Asselin L**, Broix L, Drouot N, Tilly P, Nusbaum P, Vincent A, Magnant W, Skory V, Birling MC, Pavlovic G, Godin JD, Yalcin B, Hérault Y, Dráber P, Chelly J, Hinckelmann MV. TUBG1 missense variants underlying cortical malformations disrupt neuronal locomotion and microtubule dynamics but not neurogenesis. **Nature Communications** (2019) 13;10(1):2129.

J'ai participé à l'étude du phénotype de migration radiaire induit par les variants humains de *TUBG1* : j'ai apporté un support technique aux expériences de vidéo-microscopie en temps réel sur les coupes corticales éléctroporées (Figure 3).

OXFORD

Human Molecular Genetics, 2018, Vol. 27, No. 2 224–238

doi: 10.1093/hmg/ddx384
Advance Access Publication Date: 25 October 2017
Original Article

ORIGINAL ARTICLE

Ciliogenesis and cell cycle alterations contribute to *KIF2A*-related malformations of cortical development

Loïc Broix[1,2,3,4,5], Laure Asselin[1,2,3,4], Carla G. Silva[6], Ekaterina L. Ivanova[1,2,3,4], Peggy Tilly[1,2,3,4], Johan G. Gilet[1,2,3,4], Nicolas Lebrun[5], Hélène Jagline[1,2,3,4], Giuseppe Muraca[5], Yoann Saillour[5], Nathalie Drouot[1,2,3,4], Madeline Louise Reilly[7,8,9], Fiona Francis[10,11,12], Alexandre Benmerah[8,9], Nadia Bahi-Buisson[7,8], Richard Belvindrah[10,11,12], Laurent Nguyen[6], Juliette D. Godin[1,2,3,4], Jamel Chelly[1,2,3,4,13,†] and Maria-Victoria Hinckelmann[1,2,3,4,*,†]

[1]Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch 67400, France, [2]CNRS U7104, [3]INSERM U964, [4]Université de Strasbourg, Illkirch 67400, France, [5]Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS U8104, Paris Descartes University, Paris 75000, France, [6]GIGA-Neurosciences, University of Liège, C.H.U. Sart Tilman, Liège 4000, Belgium, [7]Paris Diderot University, Paris 75013, France, [8]INSERM UMR 1163, [9]Paris Descartes – Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute, Paris 75015, France, [10]Inserm UMR-S 839, Paris 75005, France, [11]Sorbonne Université, Université Pierre et Marie Curie, [12]Institut du Fer à Moulin, Paris 75000, France and [13]Service de Diagnostic Génétique, Hôpital Civil de Strasbourg, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg 67000, France

*To whom correspondence should be addressed at: Department of Translational Medicine and Neurogenetics, 1, rue Laurent Fries, BP 10142, 67404 Illkirch Cedex, France. Tel: +33 3 88655624; Fax: +33 3 88 65 32 01; Email: hinckelm@igbmc.fr

Abstract

Genetic findings reported by our group and others showed that *de novo* missense variants in the *KIF2A* gene underlie malformations of brain development called pachygyria and microcephaly. Though KIF2A is known as member of the Kinesin-13 family involved in the regulation of microtubule end dynamics through its ATP dependent MT-depolymerase activity, how KIF2A variants lead to brain malformations is still largely unknown. Using cellular and *in utero* electroporation approaches, we show here that *KIF2A* disease-causing variants disrupts projection neuron positioning and interneuron migration, as well as progenitors proliferation. Interestingly, further dissection of this latter process revealed that ciliogenesis regulation is also altered during progenitors cell cycle. Altogether, our data suggest that deregulation of the coupling between ciliogenesis and cell cycle might contribute to the pathogenesis of KIF2A-related brain malformations. They also raise the issue whether ciliogenesis defects are a hallmark of other brain malformations, such as those related to tubulins and MT-motor proteins variants.

[†]These authors contributed equally.

Received: July 31, 2017. **Revised:** October 13, 2017. **Accepted:** October 17, 2017

© The Author 2017. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by CNRS user on 03 July 2019

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). Following this initial phase, 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 subventricular zone (SVZ) and migrate radially along the radial glia fibers throughout the cortical wall to reach their final destination forming the laminar cortex. Neurons finally differentiate and acquire identities to establish cortical connectivity by axonal and dendritic extensions.

In humans, alterations in one of these processes can lead to neurodevelopmental disorders including malformations of cortical development (MCD) that represent frequent causes of intellectual disability, psychomotor delay and severe epilepsy (1).

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 (2–5). In addition to *DCX* and *LIS1* genes, the importance of MTs in the development of the cortex is reflected in 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 (6–11). These tubulin-related cortical dysgeneses are thought to involve a combination of abnormal neuronal proliferation, migration, differentiation and axonal growth (7,9,10,12–14). 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 (10).

As far as *KIF2A* is concerned, several missense variants (c.950G > A, p.Ser317Asn; c.959C > T, p.Thr320Ile; c.961C > G, p.His321Asp and c.962A > C, p.His321Pro) located in the motor domain of KIF2A were identified as being causative of MCD (Supplementary Material, Fig. S2A). Individuals presented with cortical gyration abnormalities and microcephaly (10,15,16), highlighting the crucial role of *KIF2A* during cortical development.

KIF2A belongs to the Kinesin-13 family which regulates MT end dynamics through its ATP dependent MT-depolymerase activity (17,18). Kinesin-13 proteins are largely described for their critical roles during the cell cycle (19). KIF2A was shown to be localized at spindle poles to control bipolar spindle assembly and anaphase chromosome movements by destabilizing minus-end MTs (20–24). In addition to its role in regulation of the mitotic process, KIF2A is also implicated in various functions 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, as well as playing a role in axonal pruning (25–27). 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 (28).

In order to better understand pathophysiological mechanisms underlying MCD resulting from KIF2A dysfunction, we investigated the consequences of KIF2A pathogenic variants on cortical development. Here we provide evidence revealing that KIF2A mutants lead to neurodevelopmental defects that combine deregulation of neurogenesis and neuronal migration. Importantly, we showed that *KIF2A* variants disrupt ciliogenesis and the cell cycle of neuronal progenitors, suggesting the involvement of these two cellular processes in KIF2A-related MCD.

Results

KIF2A is expressed in the developing cerebral cortex

In view of previous observations showing that mutations in *KIF2A* result in MCD in humans (10,15,16), and keeping in mind that these pathologies are tightly associated with alterations in cortical development (29), we first examined the expression pattern of the 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 (Supplementary Material, Fig. S1A), and in agreement with previous observations (30). This expression remained ubiquitous but became more homogeneous at postnatal day 2 (P2) where a uniform staining throughout the cortex was observed.

We then focused on embryonic day 16, a developmental stage in which there is active cell proliferation and neuronal migration. At this developmental stage, endogenous KIF2A is expressed both in proliferating cells as well as in postmitotic neurons, as shown by its localization in Pax6 positive radial glia in the VZ (Supplementary Material, Fig. S1B) and β-III tubulin (Tuj1) in the CP and intermediate zone (IZ) (Supplementary Material, Fig. S1B). Taken together, MCD caused by *KIF2A* variant as well as KIF2A expression profile in developing mouse cortex suggest a role in different stages of corticogenesis.

Mutant KIF2A alters cortical neuronal positioning

To investigate the consequences of MCD-related *KIF2A* variants p.Ser317Asn and p.His321Asp reported by our group (10) (Supplementary Material, Fig. S2A), we used *in utero* electroporation to induce the expression of different human *KIF2A* constructs combined with a Tomato reporter into cortical progenitors of embryonic day 14.5 (E14.5) mouse embryos. First, in line with previously reported data (10), we showed that *in utero* electroporation of mutant *KIF2A* constructs leads to an abnormal distribution of mutant proteins in migrating projection neurons (Supplementary Material, Fig. S2B). Whereas the overexpressed wild type (WT) protein is mainly diffusely dispersed within the cytoplasm, mutant KIF2A localization resembles that of MTs. This mislocalization was also observed in Cos7 cells overexpressing the p.His321Asp variant. While WT KIF2A is dispersed within the cell, without any specific association to MTs, the pathogenic form of KIF2A appears to be sequestered to MTs. The mutant protein heavily co-localizes with tyrosinated-tubulin, and is almost devoided from acetylated-tubulin, suggesting a strong association with dynamic MTs (Supplementary Material, Fig. S2C and D).

We then studied the consequences of the MCD-related KIF2A mutants initially identified (p.Ser317Asn and p.His321Asp) on

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by CNRS user on 03 July 2019

neuronal positioning. For this, we analysed the distribution of electroporated projection neurons within the E18.5 cortical wall, four days after *in utero* electroporation. At this stage, Tomato-positive neurons expressing either of the two KIF2A mutants were mainly clustered in the IZ, with very few neurons migrating towards or reaching the cortical plate (Fig. 1A). On the other hand, neurons expressing the wild type form of KIF2A were dispersed throughout the cortical wall. Indeed, compared with the control empty vector, the overexpression of wild type KIF2A leads to an accumulation of neurons in the IZ. However, this effect is less severe compared with the mutants which show an almost complete absence of electroporated cells in superficial layers of the developing cortex (Fig. 1A).

To explore whether the embryonic phenotype persists after birth, we studied the positioning of E14.5 electroporated neurons at P2. As shown in Figure 1B, most of the neurons electroporated with the control empty vector reach the most superficial cortical layers (IV-II, Cux1-positive). As in the control situation, the overexpression of the WT form of KIF2A, leads to an almost complete absence of electroporated 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 WT KIF2A phenotype is mostly transient as, with time, there is a recovery of the phenotype observed in early stages. In the case of cells expressing mutant KIF2A, abnormally positioned neurons at E18.5 remained arrested in the white matter (WM) at P2 (Fig. 1B). In this case, over 40% of electroporated neurons accumulate in the WM compared with less than 5% observed in the control. Consistent with this, only 30% of mutant-expressing neurons are located in the Cux1 positive layers. Taken together, these results indicate that *KIF2A* has a key role in determining neuronal positioning during cortical development, and that both pathogenic *KIF2A* variants result in a similar phenotype consisting

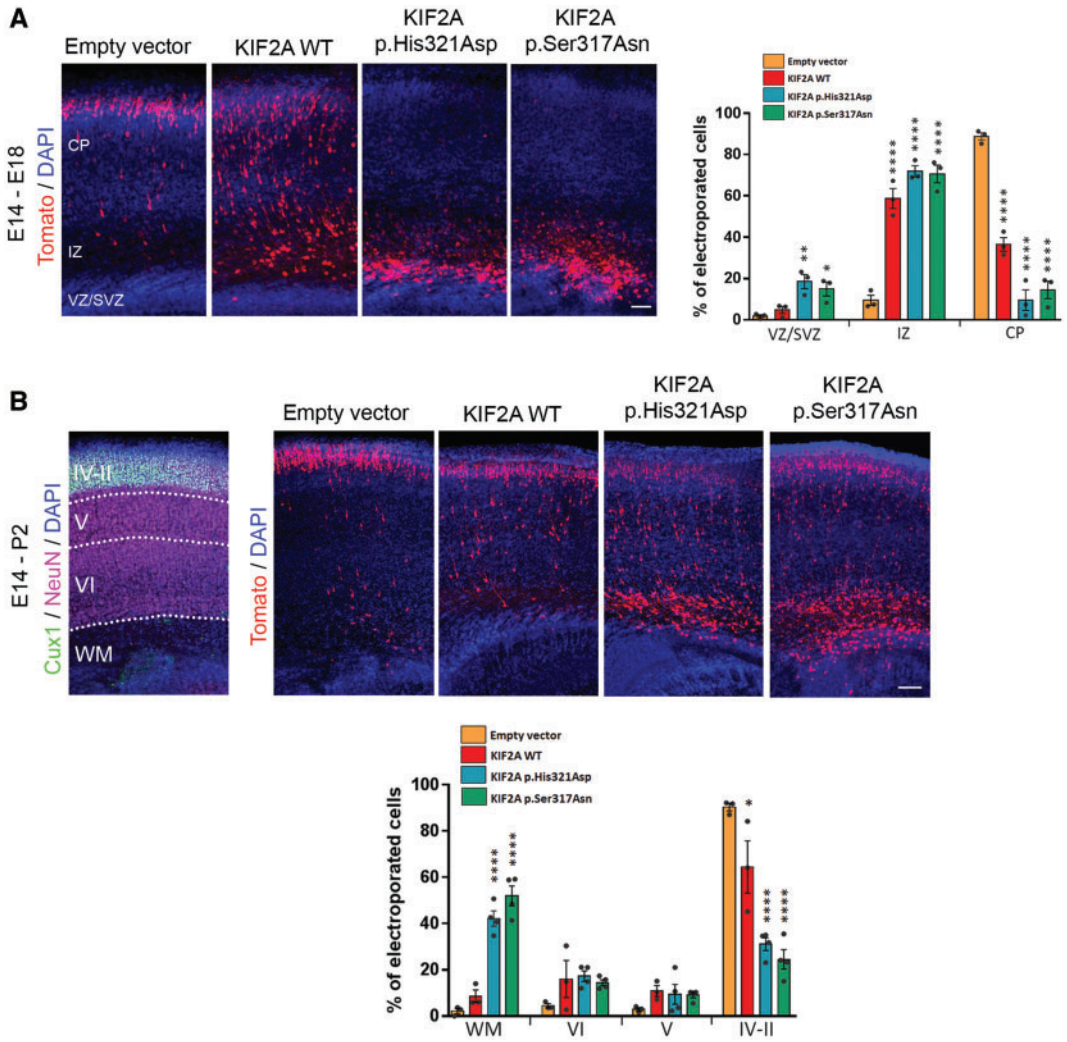


Figure 1. KIF2A mutations and overexpression affects neuronal positioning. (**A**) Coronal sections of the cerebral cortex electroporated at E14.5 and analysed at E18.5. Histograms show the distribution of Tomato-positive cells expressing different constructs in the ventricular/subventricular zone (VZ/SVZ), intermediate zone (IZ) and the cortical plate (CP). One-way ANOVA with Dunnett's post hoc test used to compare conditions ($n = 3$ embryonic brains for each condition). Scale bar, 50 μm. (**B**) Representative images of brain cortices electroporated at E14.5 and analysed at P2. Sections were stained for a neuronal marker, NeuN, and an upper-layer marker, 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). One-way ANOVA with Dunnett's post hoc test used to compare conditions ($n = 3$ embryonic brains for Empty vector and KIF2A WT conditions and $n = 4$ for KIF2A p.His321Asp and KIF2A p.Ser317Asn). Scale bar, 100 μm. Dots on top of bar graph represent individual data points for each condition. Error bars are mean +/- s.e.m. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$.

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by CNRS user on 03 July 2019

of an accumulation of ectopic neurons in the deep layers and WM.

Implication of postmitotic processes in the positioning defects

To further understand the mechanisms underlying the ectopic localization of neurons expressing *KIF2A* constructs, we first focused on the migration of pyramidal neurons. As a strong and consistent phenotype was found for the two mutants, we specifically focused our study on the p.His321Asp variant. We initially controlled the integrity of radial glia, which acts as the scaffold along which post-mitotic neurons migrate, being essential for proper migration (31). We co-electroporated *KIF2A* constructs and GFP construct driven by the radial glia specific promoter BLBP (BLBP-GFP), and we observed no evident alteration of glial scaffolding (Supplementary Material, Fig. S3). We then focused on the postmitotic effect of the p.His321Asp variant on neuronal positioning. For this, we *in utero* electroporated at E14.5 constructs that express GFP and the different versions of *KIF2A* under the neuron-specific Doublecortin (*DCX*) promoter. 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 (Fig. 2A). It is worth mentioning that the postmitotic effect of the wild type construct in the distribution of electroporated cells highly resembles that of the overexpression of the protein starting at progenitor stages (Fig. 1A). However, the mutant construct leads to a less severe phenotype (Fig. 1A).

In view of the similar phenotype observed for the wild type and mutant overexpression, we focused on the dynamics of the different steps of radial migration to further search for differentially regulated processes between the WT and mutant conditions. For this, we performed time-lapse videomicroscopy acquisitions of *DCX-KIF2A* expressing neurons in organotypic cultures. Time-lapse acquisitions showed that expression of both WT and mutant constructs affect the initial multipolar to bipolar transition required to start locomotion (Fig. 2B), the velocity of locomotion of bipolar pyramidal neurons (Fig. 2C and D) as well as the total duration and number of pauses were significantly affected (Fig. 2E and F), leading to an overall delay of radial migration (Fig. 2G). Though these data suggest that level of expression of KIF2A is critical and migration defects could contribute to the phenotype resulting from KIF2A mutants expression, they do not allow to differentiate between dosage effect and the suspected dominant negative (or gain of function) effect of the MCD-related KIF2A variants.

Mutant KIF2A expression leads to interneuron migration defects

The correct formation of a fully functional cortex requires the timed migration and insertion of interneurons in cortical networks. Cortical interneurons initially migrate through tangential routes, adopting later on a radial mode of migration. Both types of migration depend on cytoskeleton remodeling. To examine the consequences of *KIF2A* pathogenic variant on interneuron migration and therefore assess the potential contribution of this process in the pathogenicity of KIF2A-related MCD, we performed real-time imaging of electroporated medial ganglionic eminence (MGE) explants cultured on wild type cortical feeders. This *in vitro* system allowed us to study the effect of KIF2A overexpression in the migration of interneurons, independently from defects in pyramidal neurons. These experiments revealed that, although interneurons were able to migrate out of the explant, cells expressing the mutant form of KIF2A moved significantly slower than the control empty vector or those overexpressing the wild type construct (Fig. 3A and B). Additionally, KIF2A variant affected the directionality of this displacement. In the control situation interneurons migrated with a higher persistence of movement, whereas those expressing the pathogenic form of KIF2A frequently changed directions (Fig. 3A and C). Interneurons use a saltatory mode of migration consisting of nuclear displacements (nucleokinesis) and pauses (32). During nucleokinesis, cells acquire a higher instantaneous speed. We thus, analysed in more detail the kinematics of these cells. As expected, KIF2A pathogenic variant decreased the frequency and amplitude of the nucleokinesis (Fig. 3D–F). Conversely, interneurons overexpressing the wild type version of the protein moved faster by performing a higher number of nuclear translocations. Together, these data show that MCD-related KIF2A variant delays interneuron migration.

Mutant KIF2A alters neural progenitor proliferation and cell cycle exit

In view of the high expression of KIF2A in proliferative zones of the developing cortex (Supplementary Material, Fig. S1) we investigated whether proliferation defects could contribute to the pathophysiology of *KIF2A*-related MCD. To explore this, we electroporated *KIF2A* constructs in E14.5 embryos and analysed the expression of PH3, Pax6 and Tbr2 in electroporated cells two days later. First, we focused on the regulation of progenitor proliferation and we observed that mutant KIF2A overexpression induced an increased proportion of VZ progenitors undergoing mitosis, reflected by a higher mitotic index (Fig. 4A). We further estimated the balance between proliferative and neurogenic divisions of radial glia. Although the mutant did not affect the amount of apical progenitors (APs) (Pax6+/Tbr2-), we observed an increased percentage of newborn intermediate progenitors (IPs) (Pax6+/Tbr2+) in the mutant condition, with a concomitant reduction of neurons (Pax6-/Tbr2-) in the VZ/SVZ (Fig. 4B). This suggests a decreased generation of neurons in favor of the production of progenitors. We also examined the apical junctions of radial precursors, known to be involved in symmetric versus asymmetric divisions in these cells (33,34), and observed no apparent change in β-catenin distribution, indicating that apical junction integrity was not altered (Supplementary Material, Fig. S4). These data show that mutant KIF2A, but not the overexpression of the wild type protein, interferes with the process of neurogenesis by favoring the generation of progenitors at the expense of neurons.

To further study the basis of this increase in proliferative cells, we analysed the consequences of *KIF2A* variant on cell cycle regulation. To investigate this, the electroporation of the different constructs at E14.5 was 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 for the proliferative marker Ki67 at E16.5. Although there were no significant differences in the percentage of electroporated cells undergoing S-phase (EdU+), we observed a significantly larger population of Ki67+ cells in the mutant condition. This resulted from a reduced number of cells exiting the cell cycle in the pathogenic condition (Fig. 4C). These results suggest that progenitors expressing the *KIF2A* variant remain longer as cycling progenitors. These proliferation

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by CNRS user on 03 July 2019

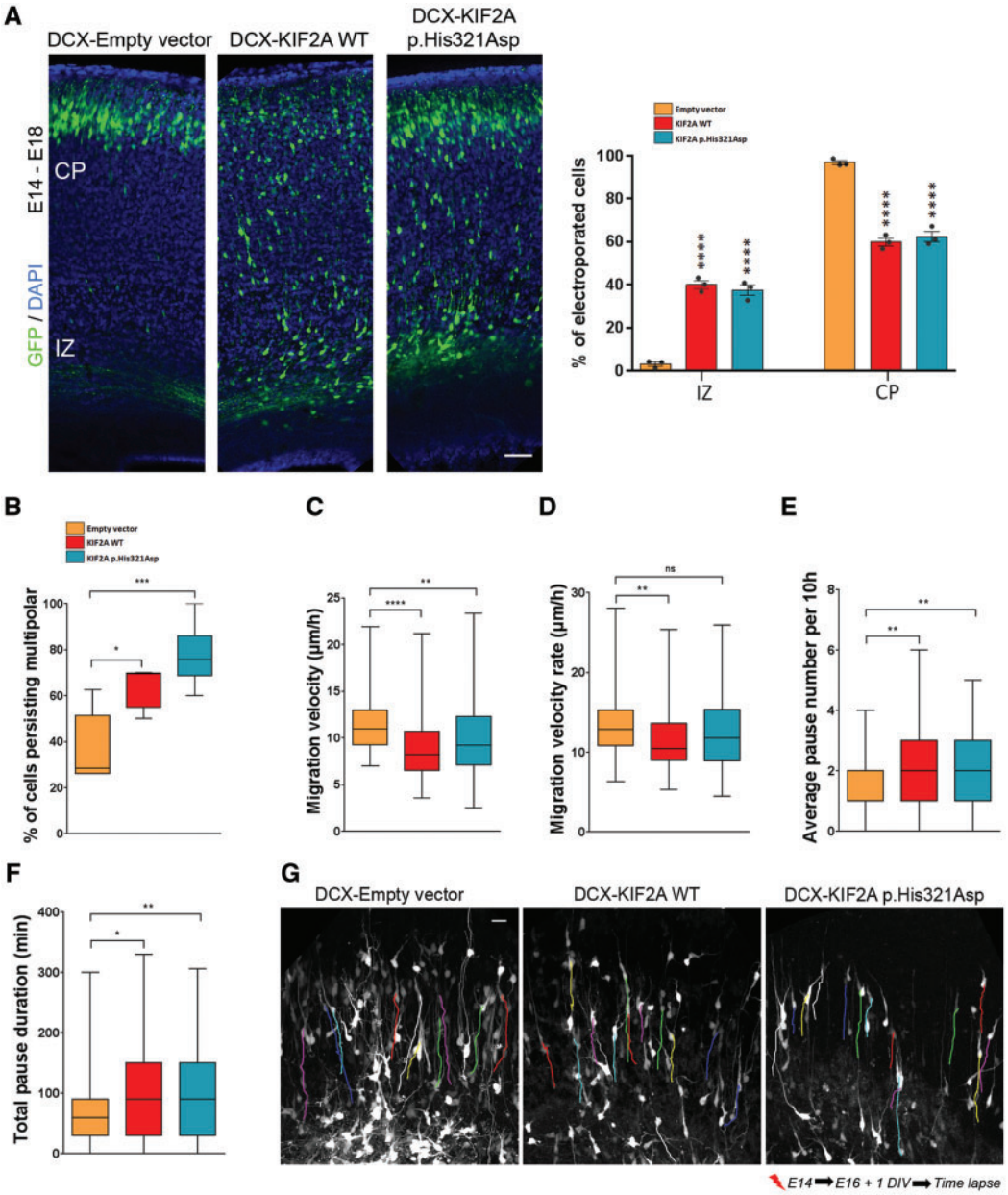


Figure 2. Postmitotic effects of mutant KIF2A (**A**) Distribution of postmitotic GFP-positive neurons expressing different *KIF2A* constructs under the DCX promoter in mouse cortex. Brains were electroporated at E14.5 and analysed at E18.5. Histograms represent the percentage of electroporated neurons that reside in the IZ and CP of the developing cortex. Dots on top of the bar graph represent individual data points for each condition. Error bars are mean +/- s.e.m. Scale bar, 50 µm. One-way ANOVA with Dunnett's post hoc test used to compare conditions ($n = 3$ embryonic brains for each conditions). (**B–G**) Real-time imaging of DCX-empty vector, DCX-KIF2A-WT or DCX-KIF2A p.His321Asp electroporated neurons at E14 in E16 brain slices cultured for a day. (B) Percentage of electroporated cells persisting with a multipolar morphology in the IZ during 10 h recording ($n = 5$ (Empty vector), $n = 5$ (WT), $n = 8$ (p.His321Asp), mean per explant). Quantification of (C) migration velocity ($n = 76$ cells (Empty vector), $n = 79$ (WT), $n = 114$ (p.His321Asp) from at least 3 explants), (D) migration velocity rate (e.g. migration velocity without the pauses) ($n = 76$ cells (Empty vector), $n = 79$ (WT), $n = 114$ (p.His321Asp) from at least 3 explants), (E) average pause number ($n = 56$ cells (Empty vector), $n = 64$ (WT), $n = 61$ (p.His321Asp) from at least 3 explants) and (F) total pause duration during 10 hr of recording ($n = 56$ cells (Empty vector), $n = 64$ (WT), $n = 105$ (p.His321Asp) from at least 3 explants). (G) Locomotory paths (colored lines) of electroporated neurons recorded during time-lapse imaging for 10 hr. From (*B*) to (F), the central line represents the median, the box limits the interquartile range, and the whiskers the minimum and maximum. One-way ANOVA with Tukey's post hoc test used to compare conditions. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$.

defects are specific to the mutation and hence potentially relevant for the pathophysiology of MCD.

Mutant KIF2A alters mitotic spindle integrity and impairs mitotic progression

To better understand the cellular mechanisms underlying mitotic division impairments upon expression of mutant KIF2A, we used the available fibroblasts derived from a female subject bearing the heterozygous *KIF2A* p.His321Asp variant and that presented with frontal band heterotopia, posterior predominant pachygyria and microcephaly. We first investigated the distribution of KIF2A in metaphasis cells. As previously described (35), KIF2A mainly localizes to spindle poles as seen by its co-localization with γ-tubulin, and is present at the mitotic spindle (Fig. 5A), while the mutated version of the protein is

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by CNRS user on 03 July 2019

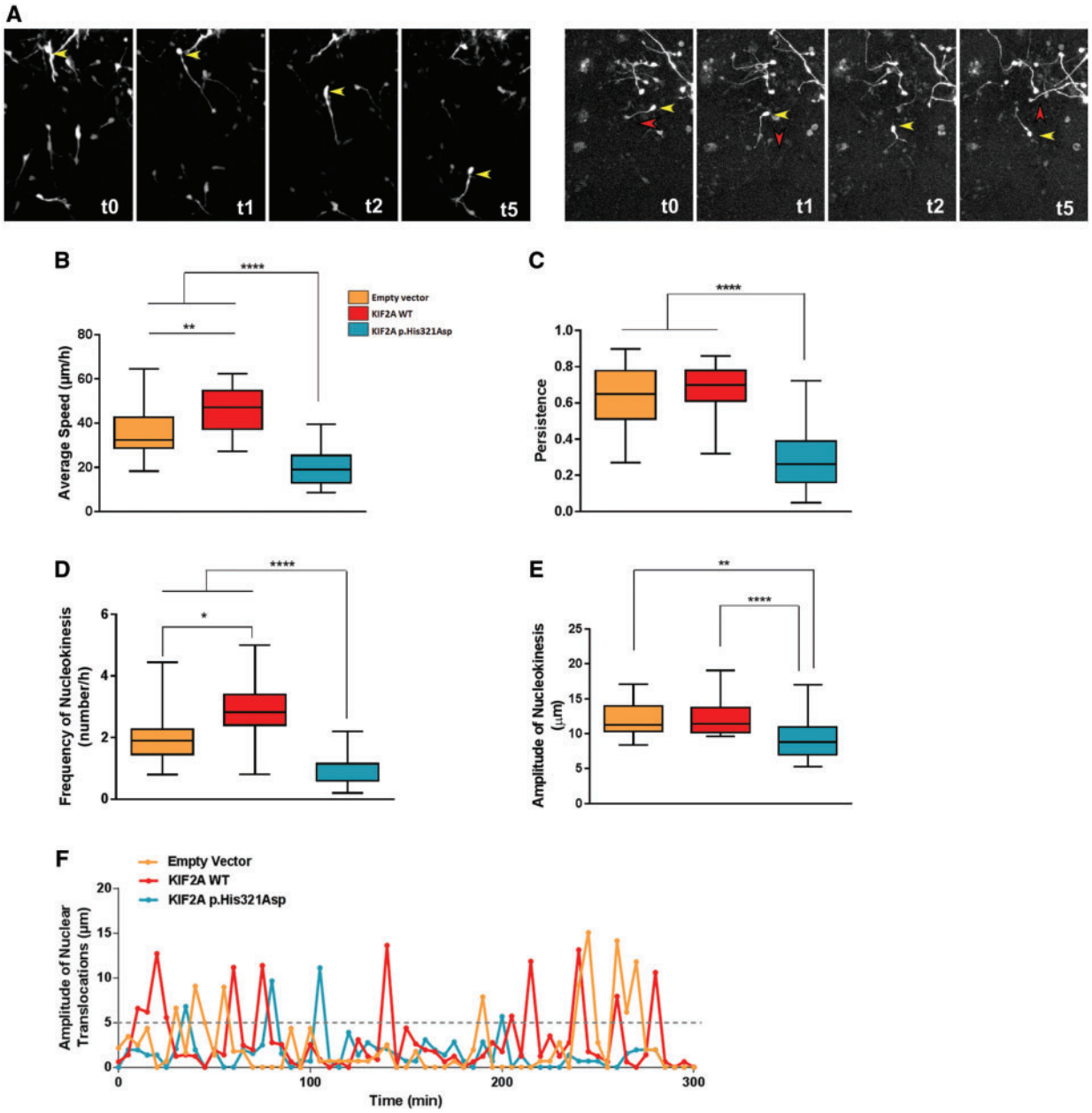


Figure 3. Mutant KIF2A alters interneuron migration dynamics (**A**) depicting the displacement of an interneuron (indicated by the yellow arrow) overexpressing WT KIF2A (left) or mutated KIF2A (right). The red arrows show the orientation of this interneuron during the recording time. Time corresponds to hours. (**B–E**) Quantification of migration parameters such as average speed, persistence, frequency and amplitude of nuclear translocations of interneurons electroporated with an empty vector, WT or mutated KIF2A. One-way ANOVA with Tukey's post hoc test used to compare conditions ($n = 20$ cells per conditions from 3 explants). (**F**) Kymographs describing the saltatory behavior profile of interneurons electroporated with an empty vector, WT or mutated KIF2A. The dashed line represents the threshold for nuclear translocations. From data (B) to (E), the central line represents the median, the box limits the interquartile range, and the whiskers the minimum and maximum. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{****}P < 0.0001$.

mislocalized and predominantly accumulated at the spindle poles, surrounding this structure. We first sought to analyse spindle orientation during mitosis, which is generally 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) and was further confirmed in *in utero* electroporated brains, as no differences were observed in the orientation of the cleavage plane during anaphase (Supplementary Material, Fig. S5). We then characterized the morphology of mitotic spindles in fibroblasts by measuring their length, which is the distance from spindle pole to spindle pole, and 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 displayed shorter spindles with a reduction in the spindle width. To sum up, mutant KIF2A is abnormally localized during mitosis and is associated with an alteration of mitotic spindle integrity.

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by CNRS user on 03 July 2019

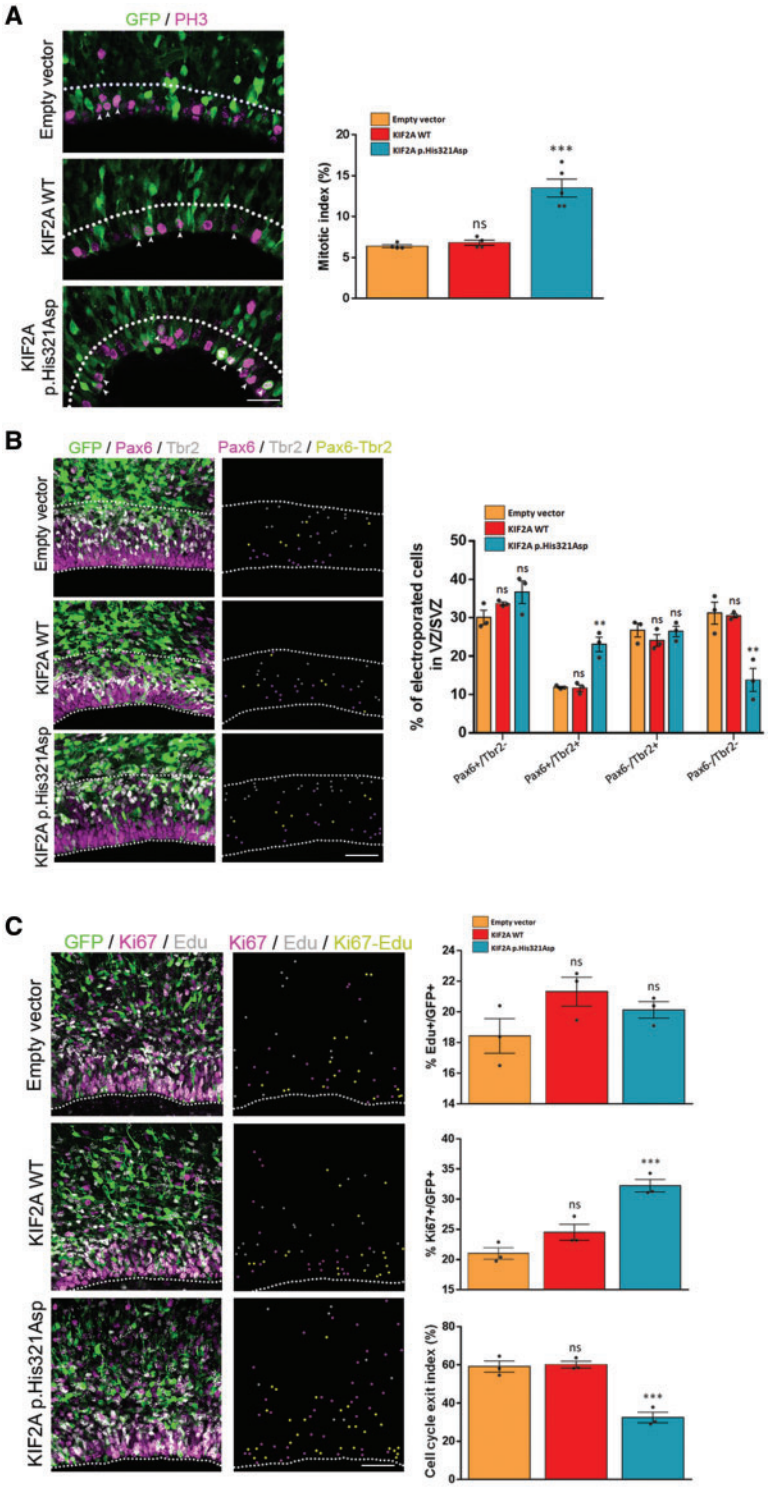


Figure 4. Effect of pathogenic KIF2A mutation on progenitor proliferation (**A**) Confocal images of E16.5 brain cortices electroporated two days before, showing electroporated cells (GFP+) and co-labeled with PH3. Quantifications represent the percentage of electroporated cells that co-express PH3 (Mitotic index). The dotted line delimits the area of quantification. Scale bar, 30 μm. (**B**) Distribution of Pax6+ and Tbr2+ in 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 Pax6 (magenta dots), Tbr2 (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. Scale bar, 50 μm. (**C**) Coronal sections of E16.5 cortices, *in utero* electroporated at E14.5, followed by EdU injection at E15.5 and immunolabeled for Ki67 and EdU (left panels). Right panels represent the distribution of electroporated cells expressing Ki67 (magenta dots), EdU (gray dots) or both (yellow dots). Quantifications represent the percentage of electroporated cells that incorporated EdU (upper right), that were positive for Ki67 (middle right) and that exit the cell cycle (GFP + EdU + Ki67-/GFP + EdU+) (bottom right). Scale bar, 50 μm. Dots on top of bar graph represent individual data points for each condition. Error bars are mean +/- s.e.m. One-way ANOVA with Dunnett's post hoc test used to compare conditions ($n = 3$ embryonic brains for each condition). *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$, ns: non significant.

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by CNRS user on 03 July 2019

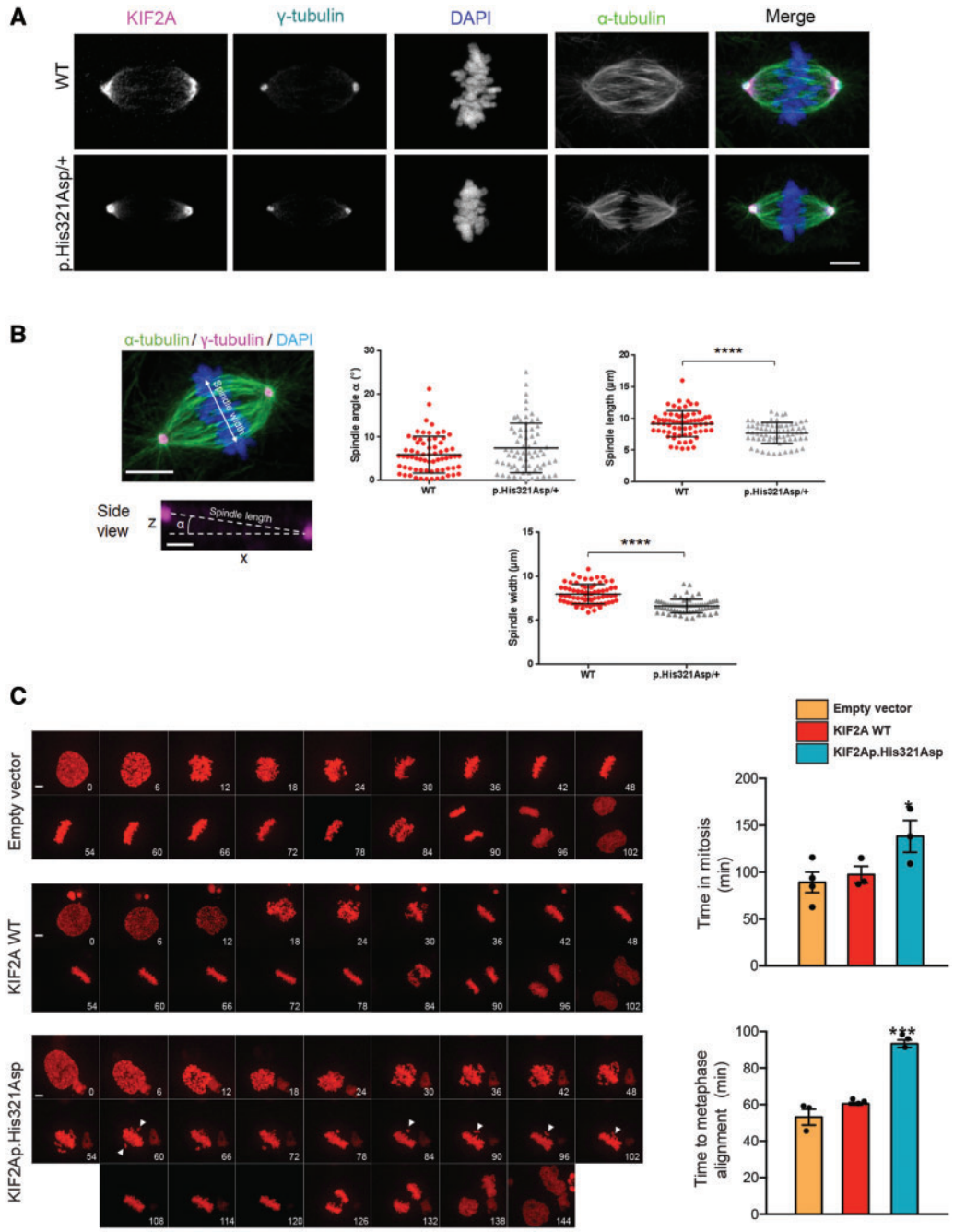


Figure 5. Mutant KIF2A alters mitotic spindles and mitotic progression in mutant fibroblasts (**A**) Immunofluorescent images of metaphasic fibroblasts expressing wild type or mutant KIF2A and stained for KIF2A (magenta), γ-tubulin (cyan) and α-tubulin (green). Scale bar, 5 μm. (**B**) Representative image depicting spindle width, length (upper panel) and spindle angle measurements (lower panel). Scale bar, 5 μm (upper view), Scale bar, 2 μm (side view). Quantification of spindle orientation (upper left, $n = 69$ cells from 4 experiments), length (upper right, $n = 69$ cells from 4 experiments) and width [bottom, $n = 70$ cells (WT) and 68 cells (KIF2A p.His321Asp)] from 4 experiments in metaphasic fibroblasts. Data are represented as mean +/- SD. Unpaired t-test used to compare conditions. (**C**) Representative time-lapse sequence of HeLa cells expressing H2B-RFP and transfected with empty vector, WT KIF2A or mutant KIF2A construct. Arrows indicate unaligned chromosomes. Quantifications of time spent in mitosis and time to metaphase alignment. One-way ANOVA with Dunnett's post-hoc test used to compare conditions ($n = 3$, mean from 3 independent experiments). Scale bar, 5 μm. Data are represented as means +/- s.e.m. Dots represent individual data points. $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$.

To further investigate the functional consequences resulting from these morphological defects, we focused on mitotic progression. In order to assess this, we used HeLa cells which stably express Histone2B tagged with RFP, and perform time-lapse live imaging to study the dynamics of mitosis. Cells were either transfected with a control empty vector, the wild type or the mutant version of *KIF2A*, and were imaged for 12 h. Cells expressing the mutant KIF2A protein, exhibit a delay in mitotic progression, with a particular impact in metaphase alignment of chromosomes (Fig. 5C). This delay in mitosis progression could therefore explain the increased percentage of *in utero* electroporated PH3+ cells in the mutant condition.

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by CNRS user on 03 July 2019

Mutant KIF2A alters ciliogenesis in apical progenitors

It has been well established that KIF2A localizes to the basal body, where it acts as a negative regulator of ciliogenesis controlling axonemal MT disassembly (28). On the other hand, defects in primary cilia structure and function have been associated to numerous genetic diseases with neurodevelopmental consequences (36). We therefore analysed the localization of endogenous KIF2A on primary cilia in mutant fibroblasts. As previously described, we found that wild type KIF2A is enriched in the basal body 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 within the primary cilia, as shown by its colocalization with acetylated-tubulin (Fig. 6A).

Since KIF2A is abnormally localized in mutant fibroblasts, and its MT-depolymerizing activity at the basal body is essential for cilia disassembly in proliferating cells (28), we assessed the impact of *KIF2A* variant on ciliogenesis. For this, we analysed cilia number and morphology in fibroblasts derived from affected individuals 24h after serum stimulation. In order to assess specifically cilia disassembly, we focused on cells in S-G2 phase of cell cycle, which is when primary cilia are reabsorbed. We observed no difference between the proportion of cells in S/G2 as shown by the percentage of geminin+ cells (Supplementary Material, Fig. S6A), and no variation in the percentage of ciliated cells in this phase (Supplementary Material, Fig. S6B). However, when we examined the length of cilia in re-stimulated fibroblasts in S/G2, we observed that the mutant fibroblasts had longer cilia than those in the control fibroblasts (Fig. 6B). During cortical development, proper ciliogenesis is essential for the correct progression of cell cycle in APs. To further explore the *in vivo* consequences of KIF2A mutant on ciliogenesis and the potential implication in cortical development, cilia length and frequency were determined in APs of *in utero* electroporated brain slices. E14.5 embryos were electroporated with KIF2A constructs, BLBP-GFP and V5-tagged Arl13b. Co-immunostaining of brain at E15.5 for V5 and the S/G2 marker geminin in the ventricular zone revealed cilia alterations. In line with our cellular observations, the proportion of electroporated cells in S/G2 phase was not altered *in vivo* (Supplementary Material, Fig. S6C). Furthermore, geminin+ neurons overexpressing mutant *KIF2A* have longer cilia compared with those electroporated with the empty vector or wild type construct (Fig. 6C and D). Additionally, we observed an increase of 20% in the percentage of ciliated APs in the mutant condition (Fig. 6C and E), which strengthens the idea of a possible defect in the disassembly of cilia during these phases. However, the apparent absence of accumulation of electroported S/G2 APs was intriguing. As geminin marker does not allow to distinguish cells in G2 and S phases, we sought to assess the distribution with respect to the ventricular surface of ciliated geminin+ APs nuclei that had been electroporated. For this we divided the VZ in equal-sized bins parallel to the ventricle and quantified the number of nuclei present in each bin. We observed that the dispersion of the nuclei was significantly different between mutant expressing cells than in those expressing either the WT form of KIF2A or the empty vector (Fig. 6F). Indeed, the percentage of cells expressing the mutated form of the protein are clearly enriched in lower half of the VZ compared with the controls (Fig. 6G) consistent with an enrichment of electroporated cells in G2-phase (37,38). Together, these findings suggest a defective regulation of ciliogenesis in APs during cortical development that could contribute to the pathophysiology of KIF2A-associated MCD.

Discussion

KIF2A is an MT-associated motor protein which has been well described for its MT-depolymerizing activity (18). Currently, all of the identified variants in this gene associated to MCDs are located in or in close vicinity of the nucleotide binding pocket within the motor domain of the protein (Supplementary Material, Fig. S2A). Here, we performed a combination of *in vivo* and *in cellulo* studies, to better understand the pathophysiological mechanisms underlying MCD associated with p.His321Asp and p.Ser317Asn variants, thought to be different from *KIF2A* loss-of-function related cortical development defects previously reported in the mouse (25). Indeed, *Kif2a* knock-out mice (*kif2a-/-*) are viable only until one day after birth, and presented multiple brain alterations including cortical lamination defects as a result of a faulty migration of newborn neurons, emphasizing the importance of KIF2A during brain development. In fact, *KIF2A* seems to be relatively intolerant to loss-of-function variants according to ExAC database (pLi = 1) though the number of synonymous variations are similar to the expected, standing against a loss-of-function mechanism. Our work demonstrates that KIF2A pathogenic mutants are stable and lead to an abnormal localization of neurons within the deep layers of neocortex during development and that persists in the white matter after birth. Although the developmental phenotype observed due to the expression of the mutant protein resembles that of the downregulation (Figs 1 and 3, Supplementary Material, Fig. S7) and the knock-out animal model, the molecular mechanisms involved may be different. First, it is worth mentioning that most pathogenic variants identified so far in genes related to MCD correspond to heterozygous missense variants but not loss-of-function variants. Additionally, clinical data argue against an haploinsufficiency, as individuals with proximal 5q12 deletions that contain *KIF2A* presented neurocognitive defects but without any evidence of MCDs in the brain MRI (39). Second, and consistent with a dominant negative effect, previous data showed that in heterozygous fibroblasts bearing *KIF2A* pathogenic variants, endogenous KIF2A is mainly mislocalized along microtubules (10,16). The present study expands this phenotype to migrating neurons overexpressing a KIF2A mutant. Given that KIF2A functions as a dimer (40), these observations suggest that in interphase mutant KIF2A could sequester the wild type protein to MTs, probably blocking its function. Altogether, these data indicate that MCD-related KIF2A mutants act through a potential dominant negative effect in dividing cells, post-mitotic migrating neurons and primary cilia, and could therefore disrupt neuronal processes during cortical development (Fig. 7).

Here, we provide evidence showing that expression of mutant KIF2A leads to a mislocalization of pyramidal neurons, likely resulting from the combination of migration and proliferation defects. We found that mutant KIF2A engenders a locomotion defect 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 (41–44). 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 (45,46). More rarely studied, but nevertheless as important as projection neurons, are interneurons and their contributions in pathophysiological processes underlying MCD. In this study, we showed that KIF2A variants not only alter migration of pyramidal neurons, but also interneuron migration dynamics. During cortical development,

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by CNRS user on 03 July 2019

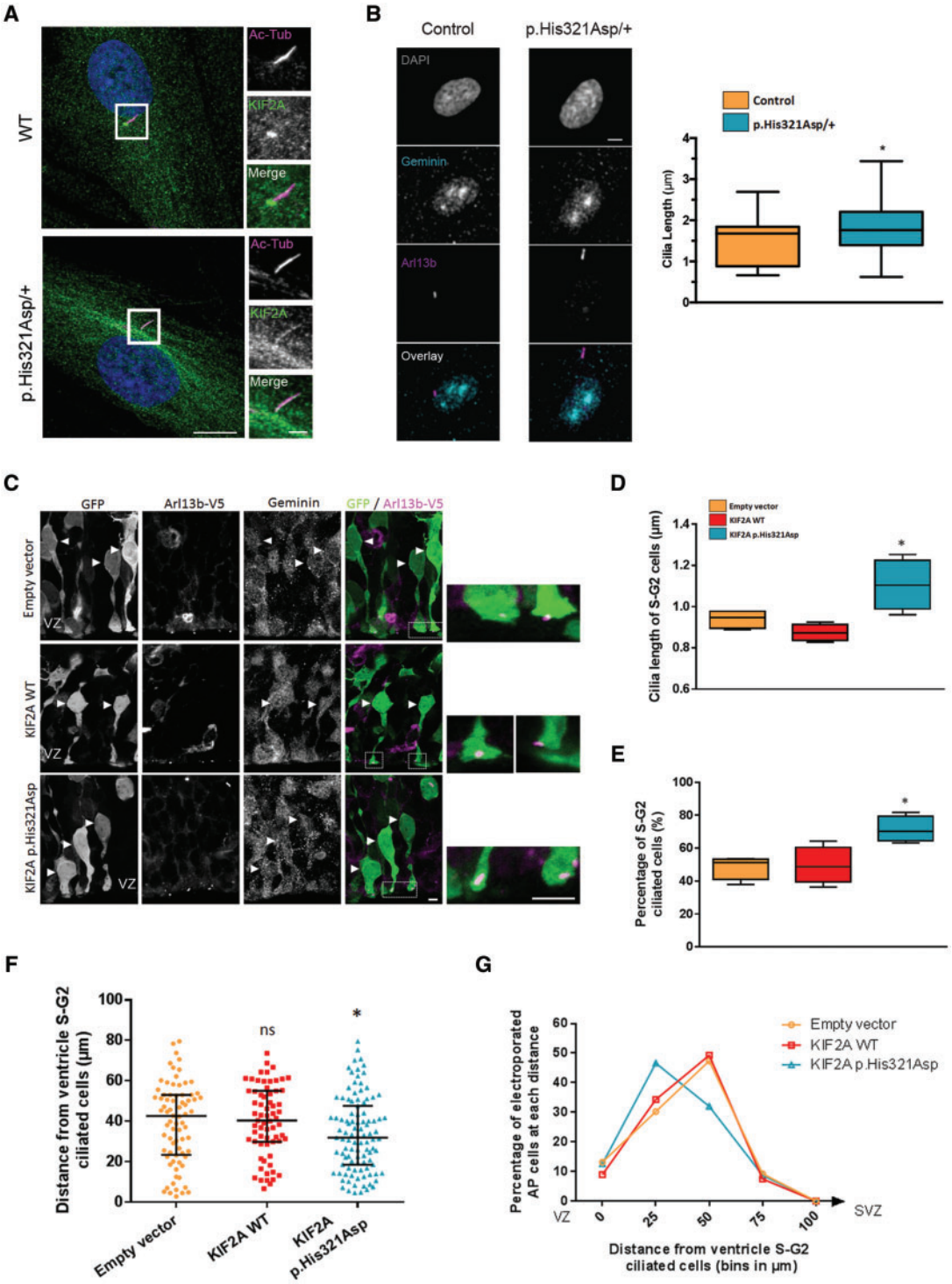


Figure 6. KIF2A mutation alters ciliogenesis. (**A**) Immunofluorescent staining of KIF2A (green) and acetylated-tubulin labeling primary cilia (magenta) in *KIF2A* p.His321Asp and control human fibroblasts. Scale bar, 10 µm. (**B**) Representative images showing primary cilia (purple) in geminin positive (cyan) fibroblasts. Quantification represents the percentage of ciliated cells and cilia length in control and patient fibroblasts that are geminin+. Unpaired *t*-test used to compare conditions [$n = 29$ cells (Control)] and $n = 39$ cells (p.His321Asp/+) from 4 experiments). Scale bar, 5 µm (**C**) Confocal images of E15.5 brain cortices electroporated one day before with either control empty vector, KIF2A WT or KIF2A p.His321Asp constructs in combination with BLBP-GFP and V5-tagged Arl13b expressing vectors. Brain sections were immunolabeled against GFP (green), V5 (magenta) and geminin. White arrows indicate the geminin positive and ciliated cells. Right panels show high magnification of the dotted boxes. VZ: ventricular zone. Scale bar, 5 µm. (**D**) Quantification of cilia length and (**E**) percentage of ciliated cells in GFP+ progenitors that contact the ventricular surface and are geminin+ (S/G2). One-way ANOVA with Dunnett's post hoc test used to compare conditions ($n = 4$ embryonic brains for each condition). (**F**) Measurements correspond to the distance between the surface of ventricle to the center of the nucleus of S/G2 ciliated AP cells in E15.5 brains electroporated at E14.5. Kolmogorov-Smirnov test used for non-parametric distributions [$n = 76$ cells (Empty vector)], $n = 67$ (WT), $n = 103$ (p.His321Asp) from 4 brains). (**G**) Data in (F) are represented as the frequency of electroporated S/G2 ciliated AP cells in each bin of distances. In (B) and from (D) to (E), the central line represents the median, the box limits the interquartile range, and the whiskers the minimum and maximum. In (F), error bars represent the median +/- the interquartile range. *$P < 0.05$.

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by CNRS user on 03 July 2019

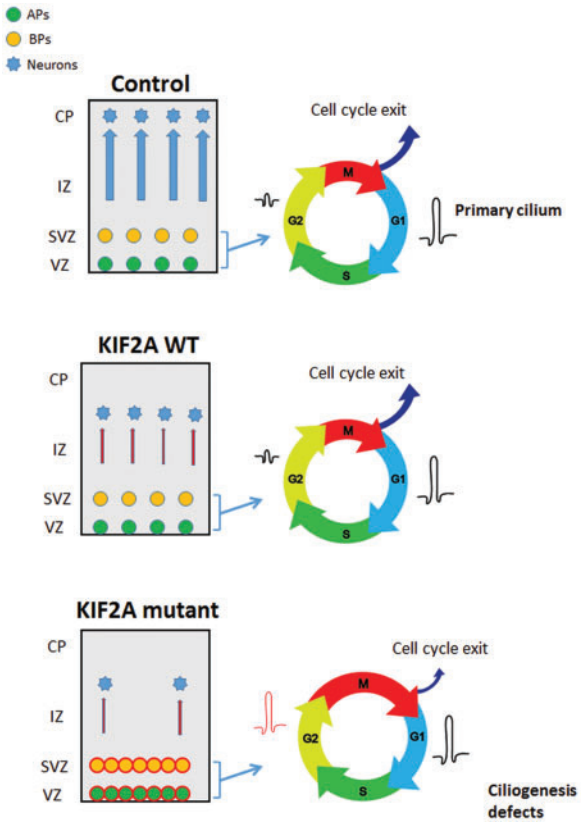


Figure 7. Model depicting the consequences of MCD-related KIF2A mutations on neurogenesis and neuronal migration during cortical development. The left panel shows that expression of mutant KIF2A alters progenitor pool, favoring the generation of basal progenitors (BPs: yellow circles) at the expense of neurons (blue symbols) and the neuronal migration velocity (blue arrows in control condition and red arrows in KIF2A WT and KIF2A mutant conditions), leading to abnormal localization of neurons within the deep layers of the cortex. The right panel summarizes cell cycle and ciliogenesis defects resulting from KIF2A mutant expression including a delay in mitotic progression, a reduced number of cells exiting the cell cycle and a longer cilia in S/G2 phase of the cell cycle. APs: apical progenitors, VZ: ventricular zone, SVZ: Subventricular zone, IZ: intermediate zone, CP: cortical plate.

interneurons migrate tangentially from the ganglionic eminences to reach their appropriate location in the cerebral cortex. We observed a reduction in migration velocity with defective nucleokinesis, all of this highly dependent on MT remodeling. This suggests a possible contribution of tangential migration in the pathogenesis of these MCDs.

Interestingly, we found that mutant KIF2A is associated with cell cycle defects (Fig. 7). Indeed, we observe a higher mitotic index and an increase in the number of newborn intermediate progenitors. We then showed 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 the higher percentage of PH3 positive cells observed *in vivo*. This idea is supported by several sets of data. 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 the consequences of KIF2A downregulation is consistent with our observations (20). 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 or *in vivo* (Fig. 5B, Supplementary Material, Fig. S5), implying that the increase in the progenitor 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 (47). The delay in cell cycle exit observed in the mutant condition could therefore modify the fate of newly formed neurons as well as influence their positioning in the cerebral cortex, which could contribute to the layering abnormalities observed in the pathology.

Our study also raises the possibility of an implication of primary cilia in the pathogenesis of the observed defects (Fig. 7). Though the cause and effect concept between the convincing observed ciliogenesis abnormalities and progenitors proliferation deregulation remains to be further reinforced (mainly because KIF2A acts also as a regulator of MT dynamics at the mitotic spindle) our study clearly raises the possibility of an implication of primary cilia in the pathogenesis of the observed defects and therefore in the pathogenicity of KIF2A-related MCD. First, convergent evidence indicates that mutant KIF2A localization in primary cilia is disrupted. Instead of being enriched at the basal body, mutant KIF2A is predominantly distributed at the axoneme. Though MT disassembly occurs mainly at the ciliary tip, it has been clearly shown that the MT-depolymerizing activity of KIF2A at the basal body is essential for its role in ciliogenesis (28). Moreover, *in vivo* and *in cellulo* data revealed that MCD-related *KIF2A* variant results in cilia reabsorption defects during S/G2 phases and an increased number of ciliated APs. Primary cilia are known to be dynamically regulated during cell cycle and seem to control the transition between different cell cycle phases (48). Indeed, it has been suggested that the initiation of cilia disassembly during late G1 is necessary for the transition to S phase (49,50). Deregulations in cilia reabsorption seem to retain cells in G1 phase and as a result alter the balance between proliferation and differentiation of AP cells (50). Yet, no study has ever assessed the role of G2 cilia disassembly prior to mitosis entry in neuronal progenitors. However, it is important to highlight that KIF2A MT-depolymerizing activity is enhanced through PLK1 phosphorylation, which is specifically expressed during S/G2 (28). In view of these data, primary cilia disassembly defect and its dependent cell cycle deregulation could be seen as coherent consequences of mutant KIF2A expression if we take into account its depletion from the basal body and the fact that MCD-related variants act very likely through a dominant negative mechanism and affect therefore the distribution of wild type KIF2A.

So far, several studies have focused on the role of centrosome-related genes encoding for centrosomal proteins in the pathogeny of microcephaly (51). Lately, it has been proposed that microcephaly could be described as a 'centriolopathy' (52). However, a recent study highlighted that disruption of primary cilia dynamics, rather than centrosome biogenesis, could also contribute to the pathogenesis underlying microcephaly (53). Moreover, it is worth mentioning that examination of primary cilia proteomics and the centrosome-cilium protein interaction landscape during ciliogenesis reveal the presence of most of the MCD-related genes, such as *LIS1*, *TUBA1A*, *TUBB2B*, *DYNC1H1*, *KIF5C*, *TUBG1* and *KIF2A* (54–56). In conclusion, in view of the findings indicating that MCD-related KIF2A variants affect progenitors ciliogenesis and possibly the interplay between

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by CNRS user on 03 July 2019

ciliogenesis and progenitors cell cycle, this strongly warrant widening investigations to assess whether mutations in other MCD-related genes are associated with primary cilia defects, and whether such defects, yet to be identified, contribute to better understand disrupted processes and pathophysiological mechanism underlying the heterogeneous group of MCD.

Materials and 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 phosphatase 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 (10) using adult Swiss mice (Janvier). Animal experimentations were performed at the IGBMC animal facilities. The light/dark cycle for animals housed was 12h and all experiments were conducted during the light cycle. 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 (2 μg/ml; Sigma) combined with 1 μg/μl of DNA constructs. Plasmids were further electroporated into the neuronal progenitors adjacent to the ventricle by discharging five electric pulses at 45V for 50 ms at 950 ms 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.

Ex vivo electroporation of medial ganglionic eminence explants (MGE)

The heads of E13.5 NMRI embryos were harvested and the cortex removed in order to expose the ganglionic eminences. Plasmids to overexpress empty vector, wild type *KIF2A*, *KIF2A* mutants, control or Kif2A shRNA were used at a concentration of 1.5 μg/μl and were directly injected in the MGE. These plasmids were co-electroporated with a Tomato red plasmid used at a concentration of 0.5 μg/μl. Electroporation conditions: 50V, 5 pulses of 50ms duration spaced by 1s interval.

Culture of MGE explants

After electroporation, the MGE was microdissected from the embryo's heads and cut into pieces of approximately 1 mm^2. These explants were placed on top of a cortical feeder layer prepared at least 24 h before. The feeder layer was prepared from homochronic cortices, dissociated and plated at high density (1–2×10^6 cells on a 35 mm glass bottom dishes (MatTek Corporation) previously coated with poly-L-ornithine and laminin (SIGMA). The explants were maintained in culture in Neurobasal medium supplemented with B27 minus vitamin A (GIBCO) and penicillin/streptomycin. The feeders were maintained in at 37 °C in humidified incubators with 5% CO_2 for at least 24h before time-lapse video recording.

Immunohistochemistry

Fixed mouse brains were placed in a solution of 4% low melting agarose (Bio-Rad) and cut in coronal sections (80 μm) 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), anti-geminin (sc-13015, rabbit, 1: 200, Santa Cruz), anti-V5 (R96025, mouse, 1: 500, Invitrogen). After washing 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 washing, 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 saline at 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-iT EdU 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. Variants (p.His321Asp and p.Ser317Asn) were introduced by site directed mutagenesis using QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). WT and mutated cDNAs 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). pDEST40-Arl13b11 expressing V5 tagged Arl13b was purchased from Addgene (#40873). For short hairpin *Kif2a* silencing constructs, a 29-mer sequence targeting the 3'UTR of the mouse

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by CNRS user on 03 July 2019

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 mutant fibroblasts carrying the *KIF2A* pHis321Asp variant were maintained in DMEM supplemented with 10% foetal bovine serum at 37 °C. Cos-7 and mouse neuroblastoma N2A cell lines were cultured in DMEM supplemented with 5% foetal bovine serum and gentamicin (40 μg/ml) at 37 °C. HeLa cells stably expressing H2B-RFP were grown in DMEM supplemented with 10% foetal bovine serum, 2 mM Glutamine, 0.5mg/ml of G418 and puromycin at 0.5 μg/ml. All the cell lines were not listed in database of commonly misidentified cell lines maintained by ICLAC. Cell lines have been tested for mycoplasma but not authenticated. Transfection of plasmids was done using Lipofectamine 2000 (Life Technologies) following manufacturer's instructions. For cilia analysis, fibroblasts at 70% confluence were serum starved for 24 h before fixation.

Immunofluorescence images were performed by fixing cells with 4% paraformaldehyde solution for 20 min. Slides were blocked by a 30 min 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), tyrosinated tubulin (ab6160, rat, 1: 1000, abcam). Following, slides were incubated with the corresponding Alexa Fluor conjugated secondary antibodies (Life Technologies) in a 1: 500 dilution in 1X PBS for 30 min 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 mitotic progression studies, HeLa cells stably expressing H2B-RFP, were cultured in 35 mm diameter bottom glass petridishes (MatTek). 48h after transfection, mitosis progression was imaged using a TCS SP8 confocal microscope kept at 37 °C with 5% CO_2. Acquisitions were every 3 min for 12 h. For slice culture, E16 brains from E14 DCX-empty vector or DCX-KIF2A-WT or DCX-KIF2A p.His321Asp electroporated embryos from Swiss mice, were embedded in 3% low-melt agarose (BioRad) diluted in HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, ThermoFisher Scientific) and sliced (300 μm) with a vibratome (Leica VT1000S, Leica Microsystems). Brain slices were cultured 16 to 24 h in semi-dry conditions (Millicell inserts, Merck Millipore), in a humidified incubator at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere in wells containing Neurobasal medium supplemented with 2% B27, 1% N2, and 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Life Technologies). Slice cultures were placed in a humidified and thermoregulated chamber maintained at 37 °C on the stage of an inverted confocal microscope. Time-lapse confocal microscopy was performed with a Leica SP8 scanning confocal microscope. Images were taken with a 25X objective and 25 successive 'z' optical plans spanning 50 μm every 30 min during 10 h. Sequences were analysed using Image J.

Spindle parameters assays

To increase the proportion of cells in mitosis, fibroblasts were synchronized by incubating cells with 9 μM RO-3306 (Roche) for 18 h. 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 distance 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). One-way ANOVA was performed for multiple comparisons (Empty vector, KIF2A WT, KIF2A p.His321Asp and KIF2A p.Ser317Asn) followed by the appropriate post hoc tests, whereas unpaired two-tailed Student's *t*-test was used for dual comparisons (Scramble vs. sh-KIF2A). $P < 0.05$ was considered significant with $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$. All the statistical tests were two-sided. No statistical methods were used to predetermine sample sizes but sample sizes were estimated on the basis of previous experiments in the laboratory and are similar to those generally employed in the field. After histological examination, only brains with comparative electroporated regions and efficiencies were conserved for quantification. For cellular experiments no data points were excluded and all data collected from each individual experiment was used for the analysis. No randomization procedure was applied in this study. Data distribution was not tested but assumed to be normal. The investigator was not blinded for data collection and analysis. All the statistical details are reported in supplemental material.

Study approval

The collection of primary cultures of fibroblasts was established from affected individuals skin biopsies at the Cochin Hospital-Cochin Institute. For the MCD affected person (female, 1 year old) included in this study, signed informed consent was obtained to collect and study biological resources, and establish primary cultures of fibroblasts at the Hospital Cell Bank-Cochin Assistance Publique Hôpitaux de Paris (APHP). This collection of fibroblasts was declared to legal and ethical authorities at the Ministry of Research (number of declaration, 701, n° of the modified declaration, 701–1) via the medical hosting institution, APHP, and to the 'Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés' (CNIL) (number of declaration, 1154515).

The study has the Animal Experimentation Research Ethics Committee approval (N° 2014–059).

Supplementary Material

Supplementary Material is available at *HMG* online.

Acknowledgements

We are grateful to the patient and their parents who have accepted the establishment of cultures of fibroblasts. We thank the imaging facility of the IGBMC for help with image acquisitions. We also want to acknowledge Frédéric Saudou for

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by CNRS user on 03 July 2019

complementary studies involving the cellular consequences of *KIF2A* variants.

Conflict of Interest statement. None declared.

Funding

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 15-CE16–0018-01, project E10107KP; ANR-13-BSV-0009–01) and European Union DESIRE (grant agreement 602531). RB and FF thank the French Agence National de la Recherche (ANR-13-BSV4–0008-01), JTC 2015 Neurodevelopmental Disorders, NEURON8-Full-815–006 STEM-MCD, Inserm, CNRS, UPMC, the Fondation Bettencourt Schueller, the Fédération pour la Recherche sur le cerveau (FRC), as well as the IFM animal house and imaging facilities, supported by the Ile de France region and the FRC Rotary. FF and RB are associated with the BioPsy Labex project and the Ecole des Neurosciences de Paris Ile-de-France network.

References

1. Desikan, R.S. and Barkovich, A.J. (2016) Malformations of cortical development. *Ann. Neurol.*, **80**, 797–810.
2. des Portes, V., Francis, F., Pinard, J.M., Desguerre, I., Moutard, M.L., Snoeck, I., Meiners, L.C., Capron, F., Cusmai, R. and Ricci, S. (1998) doublecortin is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia (SCLH). *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 1063–1070.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Jaglin, X.H. and Chelly, J. (2009) Tubulin-related cortical dysgeneses: microtubule dysfunction underlying neuronal migration defects. *Trends Genet.*, **25**, 555–566.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Cavallin, M., Bijlsma, E.K., El Morjani, A., Moutton, S., Peeters, E.A.J., Maillard, C., Pedespan, J.M., Guerrot, A.-M., Drouin-Garaud, V., Coubes, C. *et al.* (2017) Recurrent KIF2A mutations are responsible for classic lissencephaly. *Neurogenetics*, **18**, 73–79.
16. Tian, G., Cristancho, A.G., Dubbs, H.A., Liu, G.T., Cowan, N.J. and Goldberg, E.M. (2016) A patient with lissencephaly, developmental delay, and infantile spasms, due to de novo heterozygous mutation of *KIF2A*. *Mol. Genet. Genomic Med.*, **4**, 599–603.
17. Desai, A., Verma, S., Mitchison, T.J. and Walczak, C.E. (1999) Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes. *Cell*, **96**, 69–78.
18. Walczak, C.E., Gayek, S. and Ohi, R. (2013) Microtubule-depolymerizing kinesins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **29**, 417–441.
19. 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.
20. 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.
21. Ganem, N.J., Upton, K. and Compton, D.A. (2005) Efficient mitosis in human cells lacking poleward microtubule flux. *Curr. Biol.*, **15**, 1827–1832.
22. 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.
23. 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.

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by CNRS user on 03 July 2019

24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.*, **10**, 664–673.
29. Bilgüvar, K., Öztürk, A.K., Louvi, A., Kwan, K.Y., Choi, M., Tatlı, B., Yalnızoğlu, D., Tüysüz, B., Çağlayan, A.O., Gökben, S. *et al.* (2010) Whole-exome sequencing identifies recessive WDR62 mutations in severe brain malformations. *Nature*, **467**, 207–210.
30. Santos, D.V.M. dos (2012) Regulation of neural stem cell proliferation and differentiation by apoptosis-relevant factors. **5**, 1–17.
31. 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.
32. Marín, O., Valiente, M., Ge, X. and Tsai, L.-H. (2010) Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**, a001834.
33. Fietz, S.A. and Huttner, W.B. (2011) Cortical progenitor expansion, self-renewal and neurogenesis-a polarized perspective. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **21**, 23–35.
34. Shitamukai, A. and Matsuzaki, F. (2012) Control of asymmetric cell division of mammalian neural progenitors. *Dev. Growth Differ.*, **54**, 277–286.
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.
36. Valente, E.M., Rosti, R.O., Gibbs, E. and Gleeson, J.G. (2014) Primary cilia in neurodevelopmental disorders. *Nat. Rev. Neurol.*, **10**, 27–36.
37. Yang, Y.-T., Wang, C.-L. and Van Aelst, L. (2012) DOCK7 interacts with TACC3 to regulate interkinetic nuclear migration and cortical neurogenesis. *Nat. Neurosci.*, **15**, 1201–1210.
38. Schenk, J., Wilsch-Brauninger, M., Calegari, F. and Huttner, W.B. (2009) Myosin II is required for interkinetic nuclear migration of neural progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **106**, 16487–16492.
39. Jaillard, S., Andrieux, J., Plessis, G., Krepischi, A.C.V., Lucas, J., David, V., Le Brun, M., Bertola, D.R., David, A., Belaud-Rotureau, M.-A. *et al.* (2011) 5q12.1 deletion: Delineation of a phenotype including mental retardation and ocular defects. *Am. J. Med. Genet., Part A*, **155**, 725–731.
40. Moores, C.A. and Milligan, R.A. (2006) Lucky 13-microtubule depolymerisation by kinesin-13 motors. *J. Cell Sci.*, **119**, 3905–3913.
41. Jiang, X. and Nardelli, J. (2016) Cellular and molecular introduction to brain development. *Neurobiol. Dis.*, **92**, 3–17.
42. Kriegstein, A.R. and Noctor, S.C. (2004) Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci.*, **27**, 392–399.
43. Tsai, L.-H. and Gleeson, J.G. (2005) Minireview Nucleokinesis in Neuronal Migration. *Neuron*, **46**, 383–388.
44. Heng, J.I.-T., Chariot, A. and Nguyen, L. (2010) Molecular layers underlying cytoskeletal remodelling during cortical development. *Trends Neurosci.*, **33**, 38–47.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. 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**, 1–14.
50. 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.
51. Alcantara, D. and O'Driscoll, M. (2014) Congenital microcephaly. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.*, **166C**, 124–139.
52. Jayaraman, D., Kodani, A., Gonzalez, D.M., Mancias, J.D., Mochida, G.H., Vagnoni, C., Johnson, J., Krogan, N., Harper, J.W., Reiter, J.F. *et al.* (2016) Microcephaly Proteins Wdr62 and Aspm Define a Mother Centriole Complex Regulating Centriole Biogenesis, Apical Complex, and Cell Fate. *Neuron*, **92**, 813–828.
53. Gabriel, E., Wason, A., Ramani, A., Gooi, L.M., Keller, P., Pozniakovsky, A., Poser, I., Noack, F., Telugu, N.S., Calegari, F. *et al.* (2016) CPAP promotes timely cilium disassembly to maintain neural progenitor pool. *embo J.*, **35**, 803–819.
54. Mick, D.U., Rodrigues, R.B., Leib, R.D., Adams, C.M., Chien, A.S., Gygi, S.P. and Nachury, M.V. (2015) Proteomics of Primary Cilia by Proximity Labeling. *Dev. Cell*, **35**, 497–512.
55. Gupta, G.D., Coyaud, É., Gonçalves, J., Mojarad, B.A., Liu, Y., Wu, Q., Gheiratmand, L., Comartin, D., Tkach, J.M., Cheung, S.W.T. *et al.* (2015) A Dynamic Protein Interaction Landscape of the Human Centrosome-Cilium Interface. *Cell*, **163**, 1484–1499.
56. Boldt, K., van Reeuwijk, J., Lu, Q., Koutroumpas, K., Nguyen, T.-M.T., Texier, Y., van Beersum, S.E.C., Horn, N., Willer, J.R., Mans, D.A. *et al.* (2016) An organelle-specific protein landscape identifies novel diseases and molecular mechanisms. *Nat. Commun.*, **7**, 11491.

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by CNRS user on 03 July 2019

nature COMMUNICATIONS

ARTICLE

https://doi.org/10.1038/s41467-019-10081-8 OPEN

TUBG1 missense variants underlying cortical malformations disrupt neuronal locomotion and microtubule dynamics but not neurogenesis

Ekaterina L. Ivanova[1,2,3,4], Johan G. Gilet[1,2,3,4], Vadym Sulimenko[5], Arnaud Duchon[1,2,3,4], Gabrielle Rudolf[1,2,3,4], Karen Runge[1,2,3,4], Stephan C. Collins[1,2,3,4,6], Laure Asselin[1,2,3,4], Loic Broix[1,2,3,4], Nathalie Drouot[1,2,3,4], Peggy Tilly[1,2,3,4], Patrick Nusbaum[7], Alexandre Vincent[1,2,4], William Magnant[1,2,4], Valerie Skory[1,2,3,4], Marie-Christine Birling[8], Guillaume Pavlovic[8], Juliette D. Godin[1,2,3,4], Binnaz Yalcin[1,2,3,4], Yann Hérault[1,2,3,4], Pavel Dráber[5], Jamel Chelly[1,2,3,4,9,10,11] & Maria-Victoria Hinckelmann[1,2,3,4,11]

De novo heterozygous missense variants in the γ-tubulin gene *TUBG1* have been linked to human malformations of cortical development associated with intellectual disability and epilepsy. Here, we investigated through in-utero electroporation and in-vivo studies, how four of these variants affect cortical development. We show that *TUBG1* mutants affect neuronal positioning, disrupting the locomotion of new-born neurons but without affecting progenitors' proliferation. We further demonstrate that pathogenic *TUBG1* variants are linked to reduced microtubule dynamics but without major structural nor functional centrosome defects in subject-derived fibroblasts. Additionally, we developed a knock-in *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mouse model and assessed consequences of the mutation. Although centrosomal positioning in bipolar neurons is correct, they fail to initiate locomotion. Furthermore, *Tubg1*$^{Y92C/+}$ animals show neuroanatomical and behavioral defects and increased epileptic cortical activity. We show that *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice partially mimic the human phenotype and therefore represent a relevant model for further investigations of the physiopathology of cortical malformations.

[1] Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 67400 Illkirch, France. [2] Centre National de la Recherche Scientifique, UMR7104, 67400 Illkirch, France. [3] Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1258, 67400 Illkirch, France. [4] Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France. [5] Institute of Molecular Genetics of the Czech Academy of Sciences, Vídeňská 1083, 142 20 Prague, Czech Republic. [6] Université de Bourgogne, SVTE, Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France. [7] Service de Biochimie et de Génétique Moléculaire, Hôpital Cochin, AP-HP, Paris 75014, France. [8] CELPHEDIA, PHENOMIN, Institut Clinique de la Souris (ICS), 1 rue Laurent Fries, F-67404 Illkirch-Graffenstaden, France. [9] Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France. [10] Laboratoire de Diagnostic Génétique, Hôpitaux Universitaire de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France. [11] These authors jointly supervised this work: Jamel Chelly, Maria-Victoria Hinckelmann. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.-V.H. (email: hinckelm@igbmc.fr)

The proper formation of the six-layered structure of the mammalian cortex depends on three highly regulated processes: proliferation of progenitor cells, migration of post-mitotic neurons and their maturation. Two main proliferative zones generate the majority of cortical neurons: the dorsal ventricular zone, where projection neurons are born, and the medial and caudal ganglionic eminences, where interneurons are generated. Projection neurons will then migrate radially along radial glial fibers[1], while interneurons will migrate tangentially over longer distances and independently of radial glial cells[2]. Alterations in these finely coordinated processes can lead to neurodevelopmental disorders including malformations of cortical development (MCDs), recognized as a frequent cause of epilepsy and intellectual delay[3].

Over the past decades, genetic studies have identified numerous causative mutations in subjects with MCDs and have greatly advanced our knowledge about the mechanisms and biological pathways involved in cortical formation and the pathophysiological mechanisms of MCDs[4,5]. These studies have outlined the importance of microtubules in every step of cortical development. Mutations in tubulins (TUBA1A, TUBB2B, TUBB3) and microtubule-associated proteins (LIS1, DCX, KIF2A, KIF5C, DYNC1H1) have been linked to a large spectrum of cortical malformations[6,7]. Moreover, microtubule organizing centers (MTOCs) such as the centrosome are highly implicated in the proper cerebral development, since multiple MCD-causing variants have been identified in proteins localizing at this organelle. Pathogenic variants in the pericentriolar and centrosomal proteins *CDK5RAP2*, *CENPJ*, *CEP135*, *WDR62*, *CEP152*, *ASPM*, and *STIL* have been discovered in subjects with primary microcephaly[8–13].

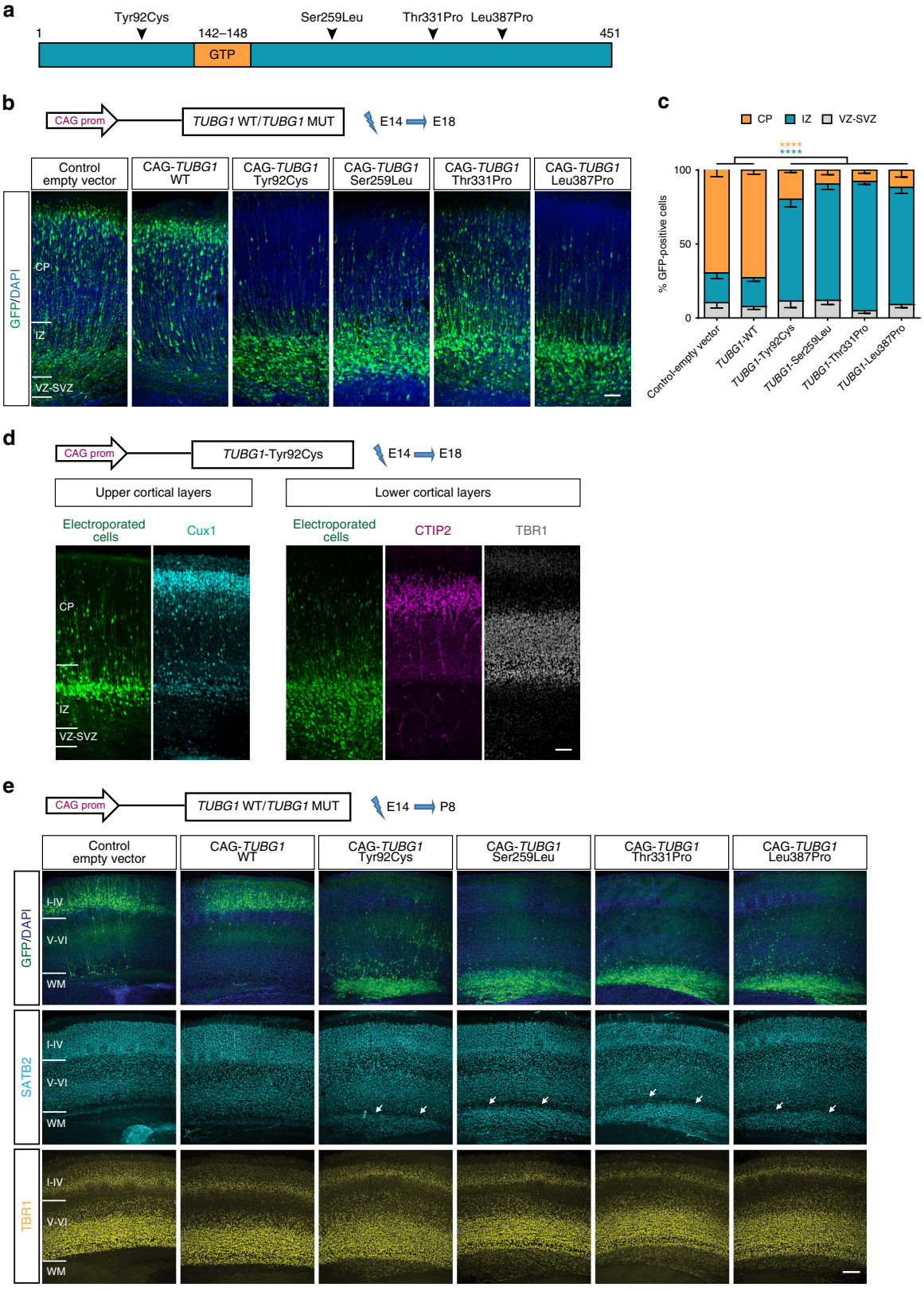
As far as centrosomal proteins are concerned, we have previously reported three missense variants in the γ-tubulin gene *TUBG1*, in subjects with posterior predominant pachygyria, corpus callosum abnormalities and microcephaly for two of the patients, associated with epilepsy and developmental delay[14]. A recent study reports four additional heterozygous pathogenic *TUBG1* variants in subjects with similar clinical features and posterior cortical malformations[15]. In mammalian cells, γ-tubulin is highly conserved and often encoded by two genes. For instance, human γ-tubulin 1 and γ-tubulin 2 (TUBG1 and TUBG2) show, respectively, 98.9 and 97.6% amino acid sequence identity with the corresponding mouse isoforms[16]. *TUBG1* is thought to be ubiquitously expressed while expression of *TUBG2* appears to be restricted to the brain[16,17]. Both isoforms are concentrated at the centrosome[18–20]. Gamma-tubulin is a component of two characterized complexes γ-TuCs: the γ-tubulin small complex (γTuSC) and the γ-tubulin ring complex (γTuRC)[21]. γTuSC consists of a γ-tubulin dimer associated with one molecule of each GCP2 and GCP3. Multiple γTuSCs associate with other proteins (GCP4, GCP5, and GCP6) to form γTuRCs, which are recruited to MTOCs where they serve as template for microtubule nucleation[22–24]. Both γ-tubulin 1 and γ-tubulin 2 are found in γ-TuCs[20] and reportedly shown to nucleate microtubules[19]. However, the degree of their functional redundancy remains to be elucidated.

Here, we investigated the consequences of four human MCDs-related *TUBG1* variants (Tyr92Cys, Ser259Leu, Thr331Pro, and Leu387Pro) on cortical development by using in utero electroporation and a knock-in *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mouse model. We show that pathogenic *TUBG1* variants affect neuronal positioning by disrupting neuronal migration without a major effect on progenitor proliferation. Our results suggest that disease-related *TUBG1* variants exert their pathogenicity by affecting microtubule dynamics rather than centrosomal positioning or nucleation ability. Additionally, we report cortical and hippocampal neuroanatomical anomalies in our *Tubg1*$^{Y92C/+}$ animals, associated with behavioral alterations and susceptibility to epilepsy.

Results

***TUBG1* pathogenic variants alter neuronal positioning**. Subjects with *TUBG1* pathogenic variants present with abnormal cortical thickness and layering, suggesting neuronal mispositioning arising from alterations during cortical development. To investigate the effect of pathogenic *TUBG1* variants on neuronal positioning in vivo, we used in utero electroporation to induce overexpression of the four pathogenic variants (Fig. 1a) under the control of a CAG promoter, together with a GFP-encoding reporter in progenitors. We confirmed co-expression of the fluorescent reporter with all *TUBG1* pathogenic variants and their stable overexpression, by immunohistochemistry in electroporated neurons and immunoblot in Neuro2a cells (Supplementary Fig. 1a–d). Mice cortices were electroporated at E14.5 and the distribution of electroporated cells was analyzed after 4 days. In brain sections expressing the control-empty vector, the majority of the electroporated neurons were positioned within the upper layers of the cortical plate (CP). Overexpression of human WT-*TUBG1* showed a normal pattern of distribution. On the contrary, cells expressing any disease-related variant were mainly localized in the intermediate zone (IZ), with almost no electroporated cells reaching the CP (Fig. 1b, c). Arrested neurons express Cux1, an upper cortical layer marker, while they are negative for deep layer markers (CTIP2, TBR1) (Fig. 1d), suggesting they are committed to upper-layers cortical projection neurons. Default in positioning persists at both early (P8) and relatively mature postnatal stages (P20). Similarly to our data at E18.5, abnormally localized cells in the white matter express only upper-layer markers (Fig. 1e and Supplementary Fig. 1e). This indicates that the phenotype is not a transient phenomenon and is probably due to an arrest rather than a delay in neuronal migration.

Given the similarity between *TUBG1* and *TUBG2*, we characterized their expression profile during cortical development. *Tubg1* mRNA levels in mouse cortices remain relatively constant throughout embryonic development, whereas *TUBG2* mRNA levels are low during early embryonic stages and progressively increase starting from E16.5 (Supplementary Fig. 2a). Additionally, we investigated a possible functional redundancy of the two isoforms during cortical development. First, we tested whether TUBG1 and TUBG2 can recover the phenotype shown to be associated to TUBG1 knock-down[14] by co-electroporating sh-*Tubg1* with either *TUBG1*, *TUBG2* or pathogenic *TUBG1*. Overexpression of *TUBG1* or *TUBG2* alone did not induce a particular phenotype in neuronal positioning (Supplementary Fig. 2b). Inversely, downregulation of *Tubg1* leads to misplacement of neurons, which at E18.5 are mainly localized in the IZ. This phenotype was significantly recovered when WT-*TUBG1* was expressed but barely modified by *TUBG2* co-expression, and even accentuated by co-electroporation of TUBG1-Tyr92Cys (Supplementary Fig. 2c). We then performed a series of complementation experiments by co-electroporating the Tyr92Cys *TUBG1* variant with increasing concentrations of either *TUBG1* or *TUBG2*. Co-electroporation of either isoforms leads to a rescue in the neuronal positioning defect, nonetheless, while a significant restauration of the phenotype was obtained with *TUBG1*, rescue with TUBG2 was only partial and dose-dependent (Supplementary Fig. 2d). However, *TUBG2* rescue was significant for other mutants (Supplementary Fig. 2e). Altogether, these results suggest limited functional overlap between the two isoforms during cortical development.



Post-mitotic processes underlie abnormal positioning. To better understand mechanisms underlying the observed positioning defects, we studied the effects on progenitor cells and on post-mitotic neurons. We first analyzed whether *TUBG1* pathogenic variants affect proliferation by evaluating the percentage of mitotic progenitors. For three of the variants, no difference in mitotic index was observed. However, the Thr331Pro variant increased in the number of VZ progenitors in mitosis (Supplementary Fig. 3a). To determine whether this is due to an increased number of cells entering mitosis or a decreased number of cells exiting the cell cycle, we performed a cell cycle exit assay (Supplementary Fig. 3b), focusing on two of the variants,

Fig. 1 Pathogenic variants in *TUBG1* alter neuronal positioning. **a** Linear representation of TUBG1 polypeptide. Black arrows indicate relative position of the four investigated mutations. **b** Coronal sections of E18.5 brains electroporated at E14.5 with either a control-empty vector, the WT form or one of the four *TUBG1* mutated forms and co-electroporated with a GFP-encoding reporter (green), stained with DAPI (blue) Scale bar 50 µm. **c** Percentage of fluorescent cells in three different regions: CP, IZ, VZ/SVZ. Data from at least three embryos per condition were analyzed with Two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test, $^{****}p < 0.0001$, compared to control-empty vector or TUBG1 wild type overexpression. **d** Coronal sections of E18.5 brains electroporated at E14.5 with the Tyr92Cys variant and stained for the upper-layer marker Cux1 (cyan), deep layers markers CTIP2 (magenta), TBR1 (gray) and DAPI (blue). Scale bar 50 µm. **e** Coronal sections of P8 brains electroporated at E14.5 with either a control-empty vector or one of the four mutant *TUBG1* forms. Sections were stained for the upper-layer marker SATB2 (cyan), lower layer marker TBR1 (yellow) and with DAPI (blue). White arrows show ectopic $SATB2^+$ cells in the white matter (WM). Scale bar 250 µm. CP, cortical plate; IZ, intermediate zone; VZ/SVZ, ventricular zone/subventricular zone. Data are represented as mean ± s.e.m. Source data are provided in the Source Data file

Tyr92Cys presenting no proliferation alteration and Thr331Pro, with an increased mitotic index. We observed that the Thr331Pro variant induced a decrease in the number of progenitors exiting the cell cycle with a tendency of increasing the progenitors having undergone S-phase (Edu+), suggesting a prolonged cell cycle, while no significant alterations were observed for the Tyr92Cys variant (Supplementary Fig. 3b–e). Also, we performed Pax6/Tbr2 immunolabelling and observed no alteration in the percentage of apical ($Pax6^+/Tbr2^-$) and intermediate ($Pax6^-/Tbr2^+$) progenitors, nor in the percentage of generated neurons ($Pax6^-/Tbr2^-$) (Supplementary Fig. 3f), suggesting that *TUBG1* variants do not affect the balance between proliferative and neurogenic divisions of progenitor cells. Finally, we analyzed the structure of radial glial fibers and confirmed for all conditions, they are correctly formed and attached to the pial surface (Supplementary Fig. 3g). Altogether, these data indicate no major effect of three out of the four studied variants on progenitor cells.

In view of these results, we studied the pathogenicity of *TUBG1* variants specifically in post-mitotic neurons. We electroporated WT or *TUBG1* human pathogenic variants under the control of the weak neuron-specific promoter Doublecortin (DCX)[25] to avoid overexpression (Supplementary Fig. 4a), with a strong NeuroD-GFP reporter, and studied neuronal positioning at E18.5. Brain sections expressing either control-empty vector or *TUBG1*-WT showed normal distribution of electroporated cells (Fig. 2a, b). However, for pathogenic variants, a large proportion of electroporated cells was accumulated in the IZ, and this accumulation was less severe for Thr331Pro variant. Interestingly, for all mutant forms, many electroporated cells were abnormally located in the lower layers of the CP (Fig. 2c). We also confirmed persistence of the phenotype at early (P3 and P8) and at relatively mature postnatal stages (P21). Yet again, mispositioned neurons express upper rather than deep cortical layer markers (Supplementary Fig. 4c–e). Together, these data support the idea of a disrupted neuronal migration, possibly due to defects in post-mitotic processes.

We also assessed neuronal positioning in the hippocampus by in utero electroporation of the ammonic neuroepithelium at E14.5. Neurons electroporated with WT-*TUBG1* were found exclusively within the pyramidal layer at P8 (Fig. 2d). Neurons electroporated with *TUBG1*-Tyr92Cys were however partially located within the stratum oriens. NeuN and CTIP2 staining revealed they were differentiated into mature pyramidal neurons (Fig. 2d and Supplementary Fig. 4f). Thus, *TUBG1* variants affect migration of pyramidal neurons both in the neocortex and the hippocampus.

Disease-causing variants affect neuronal migration dynamics. To further understand disrupted neuronal positioning, we studied neuronal migration using time-lapse videomicroscopy to follow the dynamics in morphology and locomotion of migrating neurons exiting the ventricular zone. We focused our studies on the Tyr92Cys and the Thr331Pro variants. For both, we observed a strikingly reduced number of neurons in the locomotion phase compared to control-empty vector and WT-*TUBG1*, with the majority of neurons remaining immobilized at the edge of the IZ (Fig. 3a, b and Supplementary movies 1–4). We measured the speed and pausing for migrating neurons and observed no major differences for average locomotion velocity compared to WT (Fig. 3c). Nonetheless, expression of the Tyr92Cys variant increased pausing and time spend in pause (Fig. 3d, e). We observed that the majority of arrested neurons presented a bipolar morphology which was maintained throughout the 10 h of recording. However, we did not detect any defects in morphology transition preceding the migration process (Fig. 3f, g).

Given the importance of TUBG1 in the organization of the centrosome and the key role of this organelle for neuronal migration, we examined centrosome dynamics in both migrating and non-migrating neurons in mouse cortices by co-electroporation with the PACT-mKO1 construct allowing labelling of the centrosome (Fig. 3h). No differences in centrosome positioning were observed for migrating neurons between the control and pathogenic *TUBG1*. Most of these migrating neurons display the centrosome ahead of the nucleus within the leading process followed by a forward displacement of the soma (Fig. 3i). On the other hand, centrosome localization in non-migrating neurons differs between control and *TUBG1*-Tyr92Cys conditions. While control neurons' centrosome is mainly localized randomly or behind the nucleus, for the Tyr92Cys variant there was an abrupt increase in cells with centrosome located ahead of the nucleus (from 10.4% in the control to 42.8% in Tyr92Cys condition) (Fig. 3j). Further analysis showed that these cells are mainly bipolar. Indeed, this configuration (non-migrating bipolar neurons with centrosome ahead of the nucleus) was only observed in 5% of control neurons but in over 50% of the Tyr92Cys neurons (Fig. 3k). Together, these results highlight a population of immobilized neurons that although adopting the correct bipolar morphology and correctly positioning their centrosome, fail to initiate glial-guided locomotion.

Disrupted locomotion linked to altered microtubule dynamics. We performed series of in cellulo experiments aiming to investigate a potential effect of *TUBG1* pathogenic variants on microtubule organization and dynamics. First, we analyzed the subcellular localization of recombinant TUBG1 using a *TUBG1*-RFP fusion construct. As shown in Supplementary Fig. 5a, all four variants are concentrated at the centrosome of differentiated Neuro2a cells and are also diffusely found in the cytosol, similarly to the WT.

We then analyzed microtubule organization in fibroblasts derived from a skin biopsy from two of the subjects (bearing the Tyr92Cys and the Thr331Pro variants) and compared them with three different unrelated control fibroblasts. We observed normal microtubule network with microtubule arrays emerging from

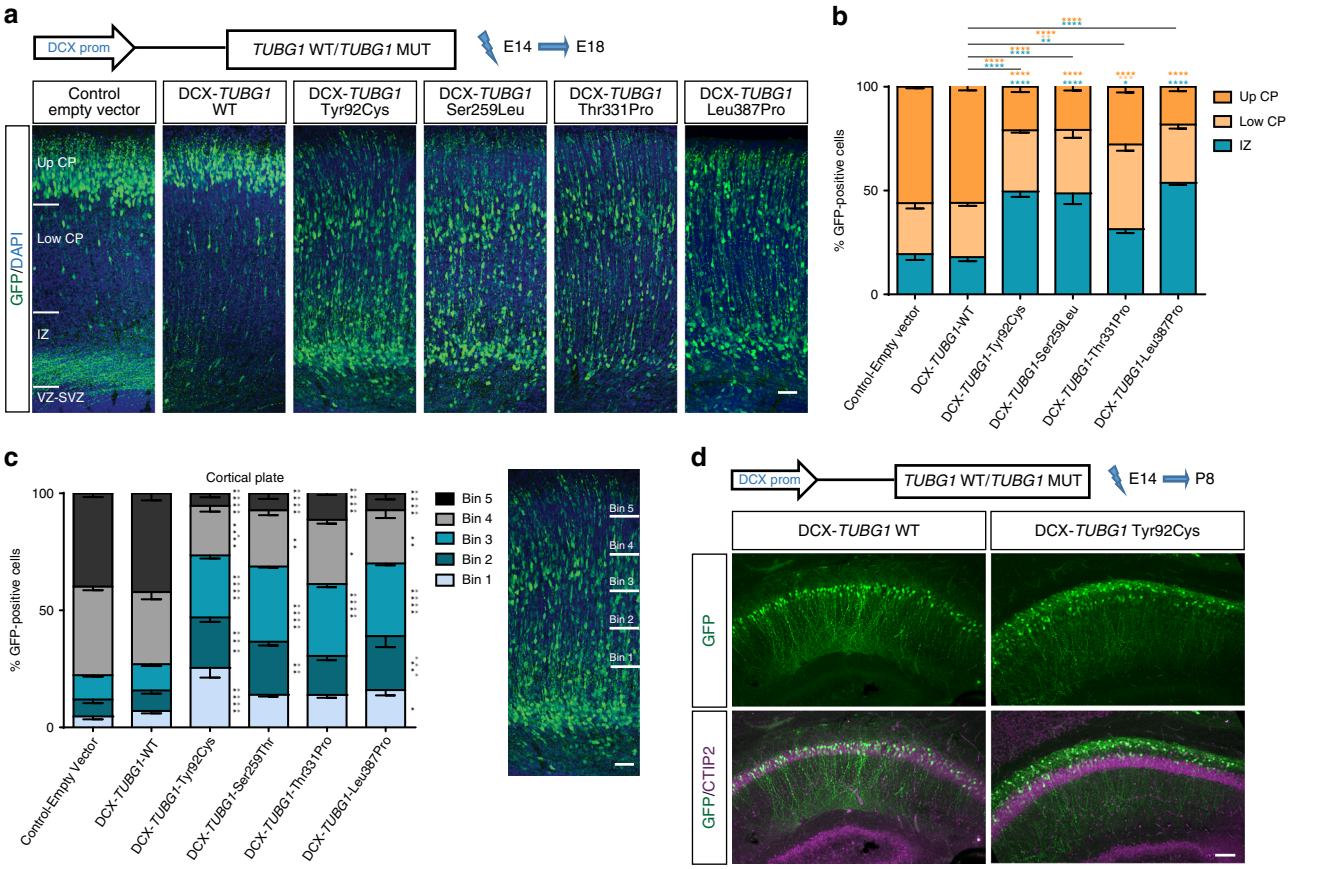
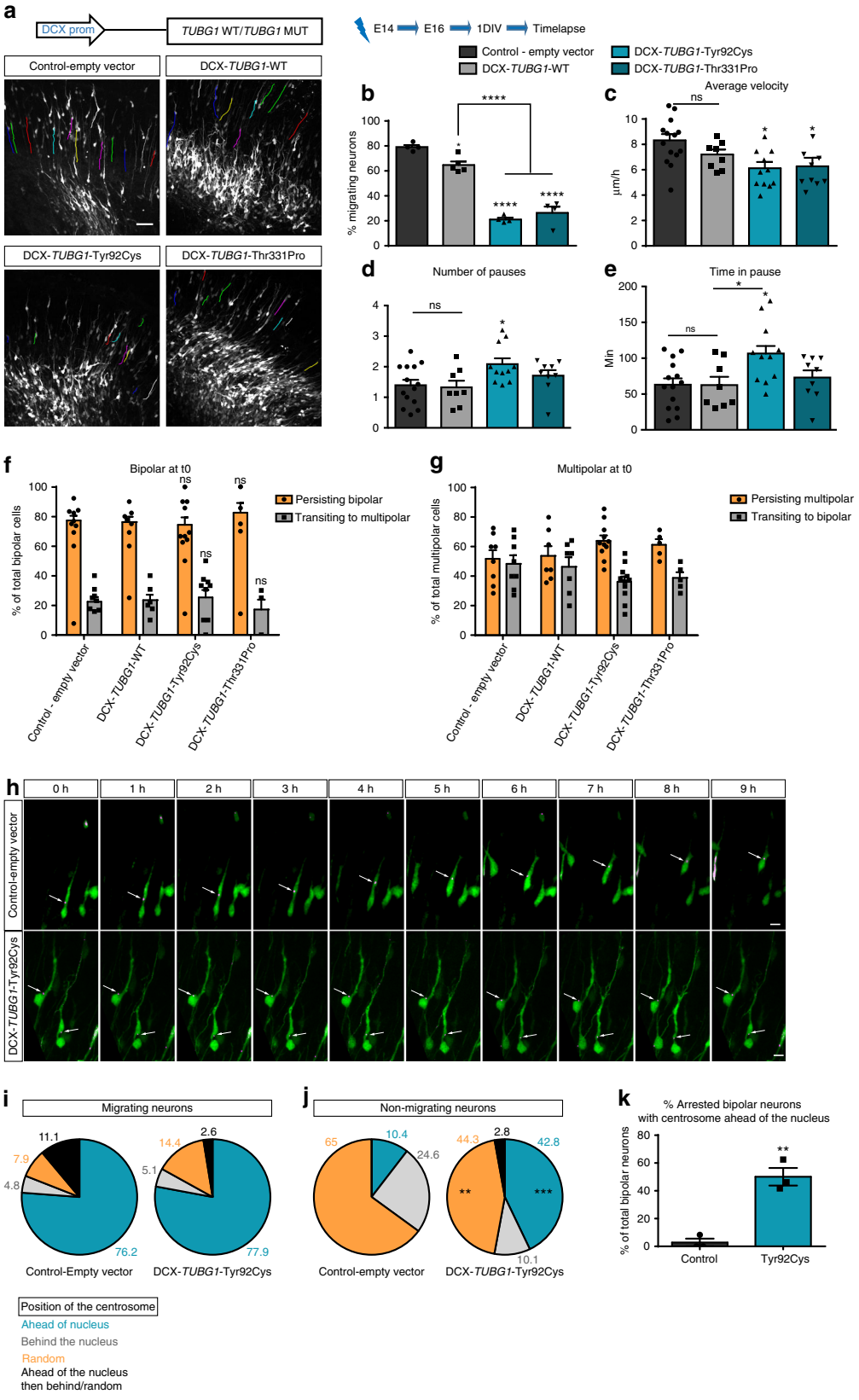


Fig. 2 Neuron-specific expression of *TUBG1* mutations affects neuronal positioning **a** Coronal sections of E18.5 brains electroporated at E14.5 with either a control-empty vector, WT-*TUBG1* or one of the four mutated forms of *TUBG1* under the control of a neuron-specific DCX promoter and co-electroporated with a reporter construction encoding for GFP under the control of a neuron-specific NeuroD promoter (green). Sections were stained with DAPI (blue). CP, cortical plate; IZ, intermediate zone; VZ/SVZ, ventricular zone/subventricular zone. Scale bar 50 µm. **b** Quantification of fluorescent neurons in three different regions: up CP, down CP, and IZ for at least four electroporated embryos per group, Two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$, compared to control-empty vector or wild type TUBG1 overexpression. **c** Quantification of fluorescent neurons in the cortical plate. The image on the right shows the cortical plate divided in five equal sections (bins). Scale bar 50 µm. GFP-positive cells were counted in each bin for at least four embryos per condition, Two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$, black asterisks compared to control-empty vector and gray asterisks compared to TUBG1 wild type overexpression. **d** In utero electroporation of DCX-*TUBG1*-Y92C or WT together with GFP (green) in the ammonic neuroepithelium at E14.5. Images show coronal sections of the CA1 region of the hippocampus at P8 counterstained with CTIP2 marker (magenta). Scale bar 150 µm. Data are represented as mean ± s.e.m. Source data are provided in the Source Data file

centrosomes (Fig. 4a). Fibroblasts did not present any shape or morphology abnormalities. However, after induced depolymerization, we saw that newly nucleated microtubules were shorter and with less organized structure in affected subjects' fibroblasts, compared to longer and straight control microtubules (Fig. 4b, c). Furthermore, we used these cells to analyze the centrosomal structure and organization by electron microscopy. We observed no significant difference in patients' fibroblasts compared to control ones (Supplementary Fig. 5b).

We then investigated the effect of *TUBG1* variants on microtubule dynamics using videomicroscopy after transfecting plus end-binding protein EB3-GFP in HeLa cells[26]. Though overexpression of WT-*TUBG1* led to a slight decrease in microtubule dynamics, we observed a more drastic decrease in microtubule polymerization rate for the three variants Tyr92Cys, Ser259Leu and Thr331Pro (Fig. 4d, e and Supplementary movies 5–10) significantly different from both control-empty vector and wild type overexpression. Similar results were obtained with subject-derived fibroblasts bearing the Tyr92Cys and the Thr331Pro variants (Fig. 4f, g and Supplementary movies 11–15). These data show that *TUBG1* mutations decrease microtubule dynamics which could pave the way to better explain the altered locomotion phenotype.

Finally, we investigated the capacity of mutant mouse Tubg1 (mTubg1) to form γ-tubulin complexes by performing immunoprecipitations with anti-TagRFP antibody from extracts of Neuro2A cells expressing either mTubg1-TagRFP (WT control) or its pathogenic variants. Western blots were immunostained for RFP, GCP2 (marker for γTuSC), GCP4 (marker for γTuRC) and total γ-tubulin. Results revealed quantitative differences in proteins co-precipitated with mTubg1-TagRFP. When compared with WT, lower amounts of GCP2, GCP4, and γ-tubulin were associated with mutated variants of mTubg1-TagRFP, while similar amounts of TagRFP-tagged γ-tubulins were detected in all samples (Fig. 4h, Supplementary Fig. 5c, d). Reciprocal immunoprecipitation with anti-GCP2 antibody confirmed reduced association of mutated variants with GCP2 (Fig. 4i). Similar amounts of co-precipitated GCP2, GCP4, and endogenous γ-tubulin were detected in all samples. Altogether, these results suggest that mutant recombinant TUBG1 has a decreased ability to dimerize and to form γ-tubulin complexes.



Knock-in *Tubg1*$^{Y92C/+}$ embryos show abnormal cortical layering. To further study the effects of *Tubg1* variants in vivo, we generated a constitutive knock-in mouse model (*Tubg1*$^{Y92C/+}$) bearing the first identified disease-causing mutation Tyr92Cys. In this model, the Tyr92Cys variant is constitutively expressed at a heterozygous state on the C57 black 6 (C57BL/6 N) genetic background (Supplementary Fig. 6a). To validate our model, we performed RT-PCR, and subsequent qPCR and Sanger sequencing, as well as immunoblots. We confirmed heterozygous presence of the mutation and comparable mRNA levels between

Fig. 3 Real-time recordings of migrating cortical neurons. **a** Locomotory paths (colored lines) of electroporated neurons recorded during time-lapse imaging. Scale bar 50 µm. **b**–**e** Percentage of migrating neurons ($n = 4$ independent time-lapse experiments per group) (**b**), average migration velocity ($n \geq 8$ independent time-lapse experiments per group) (**c**), average number of pauses ($n \geq 8$ independent time-lapse experiments per group) (**d**), and total time spent in pause ($n \geq 8$ independent time-lapse experiments per group) (**e**) during the 10 h of recording. Data were analyzed with One-way ANOVA with Tukey's post hoc test, $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{****}p < 0.0001$ compared to control-empty vector; $^{****}p < 0.0001$ compared to DCX-*TUBG1*-WT. **f** Percentage of electroporated bipolar cells persisting bipolar or transitioning to multipolar morphology in 10 h recordings ($n = 4$ independent experiments per group). Comparisons were made to control-empty vector and TUBG1 wild type overexpression. **g** Percentage of electroporated multipolar cells persisting multipolar or transitioning to bipolar morphology in 10 h recordings ($n = 5$ independent experiments per group). Comparisons were made to control-empty vector and TUBG1 wild type overexpression, Two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. **h**–**k**. Centrosome positioning in migrating and non-migrating neurons. **h** Sequences of images during time-lapse recording of bipolar neurons co-electroporated with GFP (green) and the centrosomal marker PACT-mKO1 (magenta) together with either control or *TUBG1*-Tyr92Cys. Centrosome is indicated by white arrows. Scale bar 10 µm. Quantification of centrosome positioning in migrating (**i**) and non-migrating (**j**) neurons. Neurons were divided in four different categories according the position of their centrosome during the time-lapse recording: ahead of the nucleus, behind the nucleus, random relative to the nucleus, ahead of the nucleus in the beginning of the recording and then behind it or random. Data are represented as pie charts for either migrating or non-migrating neurons. Two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$. **k** Percentage of arrested electroporated bipolar neurons with the centrosome ahead of nucleus, $n \geq 3$ independent time-lapse experiments per group, Unpaired *t*-test, $p = 0.0024$, compared to control-empty vector. Histograms represent mean ± s.e.m. Source data are provided in the Source Data file

mutant and WT allele, as well as stability of the protein (Supplementary Fig. 6b–e). *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice were born in the expected Mendelian ratios and developed normally with a usual lifespan. Interestingly, both male and female mice exhibited subfertility.

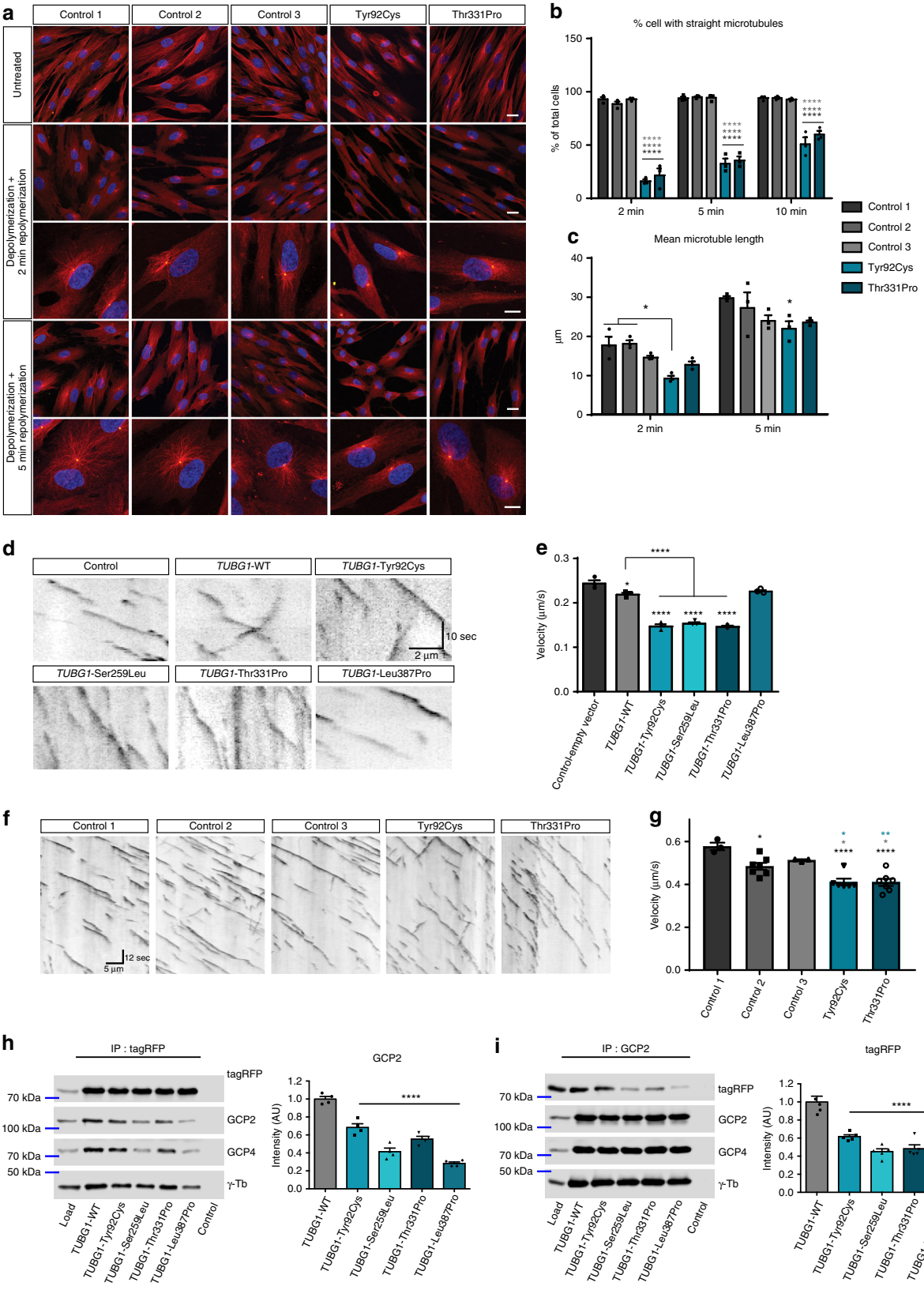
Since in utero electroporation results showed a major effect of disease-causing *TUBG1* variants on neuronal migration, we first investigated whether *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice display layering anomalies at embryonic stages. We analyzed thickness of the CP and different layers by immunohistochemistry on E18.5 brains (Fig. 5a). While we observed no difference in total CP thickness between the WT and *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice, a more detailed analysis revealed an increase in layer V thickness with a concomitant reduction of layer VI in *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice. Additionally, CTIP2 staining showed that *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice present with visibly abnormal organization of layer V, which is larger and with lower cell density, while it presents with a more compact organization in control mice. On the other hand, we also observed a small population of heterotopic SATB2^{+} cells at the interphase of the IZ and the CP of mutant embryos (Fig. 5b). Given this observation, we assessed neuronal migration by labelling a cohort of progenitors with EdU at E14.5 and examining their localization four days after in the SVZ/VZ, the IZ and in the six layers of the CP that we divided in five equal bins (Fig. 5c). We observed a higher percentage of EdU-positive cells in the IZ at the limit with layer VI with a corresponding depletion of cells in bins 3, 4, and 5 of the CP (Fig. 5d). Arrested cells appeared as a visible band in section images and were positive for SATB2 (Fig. 5e), consistent with our previous observations.

We then analyzed cell proliferation in WT and mutant embryonic brains. We found no significant differences in progenitors' proliferation in any of the studied developmental stages (E12, E14, E16) (Supplementary Fig. 7a). Quantification of the pool of apical and intermediate progenitors as well as newborn neurons in the VZ/SVZ at E14 and E16 revealed no differences between the wild type and knock-in mice (Supplementary Fig. 7b, c).

Finally, we studied the dynamics of radial migration by time-lapse recordings in WT and *Tubg1*$^{Y92C/+}$ organotypic brain cultures. We observed that the pathogenic variant leads to a significant reduction in the percentage of migrating neurons exiting the IZ (Fig. 5f, g and Supplementary movies 16–17). Moreover, while there were no defects in the velocity of migration, neurons from *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice paused more often and for longer periods of time (Fig. 5h–j). We could not observe any defects in neuronal polarity transition before migration (Fig. 5k, l). Arrested neurons mainly exhibit the bipolar morphology required to initiate radial migration, with a significantly increased number of them containing the centrosome ahead of the nucleus (Fig. 5m). In line with our in utero electroporation data, together these results suggest that cortical layering defects related to TUBG1 mutations result from altered neuronal migration. Neurons bearing Tyr92Cys mutation adopt the correct morphology and centrosome localization, but appear unable to initiate locomotion.

***Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice exhibit neuroanatomical defects**. Using a recently developed robust approach for the assessment of 166 brain parameters across 22 distinct brain regions[27] (Supplementary Dataset 1), we analyzed neuroanatomy in 16-weeks-old male *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice by systematically quantifying the same sagittal brain region at Lateral + 0.60 mm. Overall size anomalies were identified in mutant mice with a reduction in size of all assessed parameters when compared to WT littermates (Fig. 6a). Total brain area was significantly reduced by 14.8%, concomitantly with smaller cortices (−14.1%, Fig. 6b). Importantly, area and thickness of the secondary motor cortex decreased by 10 and 9%, respectively (Fig. 6c). Additional assessment of the thickness of cortical layers revealed a significant decrease of 23% in the width of layer I and a decrease of 20% in layer VI. By contrast, thickness of layer V increased by 11% but did not reach the level of statistical significance ($P = 0.1$). Noteworthy, we were unable to delineate the boundary between layers II-III and V in two knock-in mice, possibly due to abnormal laminar disorganization. White matter structures were also decreased and included for example the fimbria of the hippocampus (−18%, $P = 0.0052$) and the anterior commissure (−26%, $P = 0.017$). The cerebellum was one of the most severely affected structures exhibiting a decreased size of 27% (Fig. 6b). Interestingly, our analysis additionally showed an abnormal organization of the hippocampal CA1 region with presence of heterotopic neurons in the stratum oriens region positioned above the pyramidal layer. Positive staining for the neuronal marker NeuN, suggested they are differentiated hippocampal pyramidal neurons (Fig. 6d). No defects in interneurons number nor distribution were found in *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice (Supplementary Fig. 8).

The time scale of *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mouse microcephaly was further investigated through a similar morphological screen at postnatal day 0 (P0). Relying on the adult brain screen, we performed morphometric analysis for 11 distinct brain regions (Supplementary Dataset 2). However, we were unable to detect a global microcephaly, and observed no visible heterotopia in the



hippocampus (Supplementary Fig. 9a). Further analysis showed that this hippocampal anomaly only becomes apparent at early post-natal stages but not before birth of pups (Supplementary Fig. 9b) consistent with the previously described slower, post-natal neuronal migration in the hippocampus[28].

***Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice show behavioral and epileptic anomalies.** Given the neuroanatomical abnormalities observed in the *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice, and the fact that cognitive function is impaired in subjects with MCDs, we tested whether this correlates with behavioral abnormalities by performing a battery of tests allowing

Fig. 4 *TUBG1* mutations alter microtubule dynamics and γ-tubulin complexes **a** Microtubules (red) and TUBG1 (yellow) staining in subject-derived fibroblasts, without treatment and after microtubule depolymerization and subsequent repolymerization. Scale bars 20 µm (upper panels) and 10 µm (lower panels). **b**, **c** Quantification of the percentage of cells presenting with straight and organized microtubules (**b**) and microtubule mean length (**c**), Two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test, $*p < 0.05$, **** < 0.0001, compared to controls. **d**, **e** Microtubule dynamics in HeLa cells transfected with EB3 and different *TUBG1* constructs. **d** Kymographs show EB3 trajectories in time (*y*, sec) and space (*x*, µm). Scale bar $Y = 10$ s, $X = 2$ µm. **e** Histograms represent mean velocity of EB3 comets, $n = 3$ independent experiments, one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test, $*p < 0.05$, $****p < 0.0001$ compared to control-empty vector or wild type overexpression. **f**, **g** Microtubule dynamics in subject-derived fibroblasts. **f** Representative Kymographs of dynamic EB3 comets in different controls and mutant fibroblasts. Kymographs are calibrated in time (*y*, sec) and space (*x*, µm). Scale bar $Y = 12$ s, $X = 10$ µm. **g** Quantification of EB3 mean velocity, $n \geq 3$ independent experiments, one-way ANOVA with Dennett's post hoc test, $*p < 0.05$ compared to control fibroblasts. **h**, **i**. Immunoprecipitations in Neuro2a cells expressing tagRFP-tagged mouse *Tubg1* (WT control) or its mutated variants. **h** Left: representative immunoblot after immunoprecipitation with anti-tagRFP antibody. Right: densitometric quantification of immunoblots stained against GCP2. Relative intensities of samples with mutated Tubg1-TagRFP normalized to WT control and to tagRFP levels in individual samples. **i** Left: representative immunoblot for immunoprecipitation with anti-GCP2 antibody. Right: densitometric quantification of immunoblots stained against RFP. Relative intensities of samples with mutated Tubg1-TagRFP normalized to WT control and to GCP2 levels in individual samples. Controls in left panels contained proteins A without antibodies incubated with the cell extracts, $n = 5$ independent experiments, one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test, $****p < 0.0001$. All data are presented as mean ± s.e.m. Source data are provided in the Source Data file

to evaluate locomotor activity, repetitive behaviors, learning and memory and epileptic susceptibility. We observed a hyperlocomotion for *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice compared to WT littermates, with an increase in both travelled distance and rearing, in the repetitive behaviours (Fig. 7a, b) and in the circadian activity paradigms (Supplementary Fig. 10a–h). This finding was supported by an increased distance travelled in the open field (OF) assay (Supplementary Fig. 10i–k). Additionally, we performed a novel object recognition (NOR) task, based on the innate exploratory behaviour of mice[29], to assess their long-term memory capacity. *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice presented significantly impaired NOR performance, spent more time sniffing the two familiar objects (FO) during the training session and their recognition index (RI) was around zero, consistent with lack of preference for the novel object (NO) (Fig. 7c, d). Next, to challenge hippocampus mediated cognitive behaviours, we tested mice in a fear conditioning (FC) assay, exploring their associative memory[30]. When tested for either contextual or cued fear, *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice displayed significantly reduced immobility time suggesting impaired fear expression (Fig. 7e). No phenotype was observed for digging and grooming behaviors (Supplementary Fig. 10l, m), nor when we assessed short-term memory of KI mice in the Y-maze paradigm (Supplementary Fig. 10n, o).

Finally, we assessed epileptic activity in *Tubg1*$^{Y92C/+}$ animals. Superficial cortical EEG recordings were visually inspected to detect epileptiform discharge events. Spontaneous cortical spike-waves were observed in all *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice but not in WT controls. No spontaneous seizure was recorded in both strains. We therefore challenged animals with the seizure-provoking agent PTZ to determine their susceptibility to seizure. PTZ, an inhibitor of the γ-aminobutyric acid type 1 (GABAA) receptor, is the most widely used model of acute chemical induced seizures[31]. We administrated intraperitoneally a pro-convulsive dose of 30 mg kg^{-1} and recorded EEG during 30 min after drug administration. One minute after injection, generalized tonico-clonic seizure was recorded in all analyzed *Tubg1*$^{Y92C/+}$ but not in WT mice (Fig. 7f).

Overall, our behavioral analysis highlight reduced neurodevelopmental performances illustrated by an increased locomotor and rearing activities with impaired object recognition and associative learning. These results suggest that *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice exhibit common features of mouse models of intellectual disability. In addition, *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice showed abnormal epileptic activity. Altogether these findings are in agreement with the observed cortical and hippocampal abnormal structures and propose that *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice represent a relevant model that partially mimics human phenotype of MCDs.

Discussion

Gamma-tubulin is a major component of the centrosome in mammalian cells[32,33]. In mammals, two genes code for γ-tubulin —*TUBG1* and *TUBG2*, both localizing at centrosomes and nucleation competent[19]. Identification of *TUBG1* pathogenic variants in subjects with cortical malformations[14,34] led us to study the underlying mechanisms by performing a combination of in utero and in vivo functional studies. All 7 MCD-related identified variants in *TUBG1* are heterozygous missense variants, occurring de novo, suggesting that they exert their pathogenicity through a dominant mechanism, rather than through a loss of function. Up to date no truncating variants have been identified in *TUBG1*. This is in contrast with the other described variants in centrosomal proteins in subjects with primary microcephaly which are majorly at a homozygous state[35]. Furthermore, homozygous *Tubg1* knock-out mice present defects in mitosis during early embryogenesis and die at the morula/blastocyst stages, while heterozygous *Tubg1*$^{+/-}$ mice develop normally and present with no histological defects[16]. In agreement with this, our studies of *Tubg1*$^{+/-}$ mice showed no major neuroanatomical nor behavioral abnormalities (Supplementary Figs 6f, g and 11). Finally, our data from in utero electroporation suggest that WT-TUBG1 is able to partially rescue the mutation-induced defect, suggesting a possible dominant-negative mechanism of the variants. Altogether, these observations suggest that haploinsufficiency is not associated with neurodevelopmental pathologies in mice and therefore a knock-out model is not representative of disease-causing missense variants in *TUBG1*.

We have developed a knock-in *Tubg1* mouse model with the aim to better mimic the human MCD phenotype. Our *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice present with altered cortical layering during embryonic stages in agreement with our in utero electroporation data showing an accumulation in the IZ of E14.5 born neurons expressing *TUBG1* pathogenic variants. At adult stage *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice present with a global microcephaly, abnormal cortical layering and defects in hippocampal organization. Correlating with these observations, *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice exhibit memory deficits in the NOR and the FC paradigms.

It is worth mentioning that several mouse models of MCDs related to abnormal neuronal migration present with anomalies in the hippocampal structure[36–38]. For example, heterozygous *Tubb2b* mice with a point variant, present with disorganized CA3 area, associated with cognitive defects and long-term potentiation deficits[39]. Similarly, the CA3 region of hemizygous *Dcx* mice showed heterotopic neurons in both the stratum radiatum and the stratum oriens with milder abnormalities in the CA2 and the CA1 regions[36]. Interestingly, neither of these mice are reported to

present major abnormalities in the neocortical architecture and lamination, even though these genes have been involved in neuronal migration in the neocortex using in utero electroporation[40,41]. Additionally, very few of MCD mouse models have been reported to have pathological epileptic seizures, although they do show cognitive deficits[42]. Our *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice exhibit increased susceptibility to PTZ-induced epileptic seizures originating in the neocortex and could therefore represent a relevant model to further investigate pathophysiological mechanisms underlying MCD-related epilepsy. It remains to be investigated whether they are due to an abnormal connectivity of the heterotopic pyramidal neurons. The ability of heterotopic

Fig. 5 *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice show abnormal cortical layering during development. **a** E18.5 cortices stained against SATB2 (gray), CTIP2 (magenta) and DAPI (blue). Vertical lines depict how cortical layers were considered for quantification, scale bar 50 µm. **b** Histograms represent the thickness of the cortical layers and CP (upper panel) and the cell density of layer V (lower panel). Data are from at least five embryos per condition, unpaired *t*-test, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$. Right image shows heterotopic SATB2^{+} cells. Scale bar 50 µm. **c** EdU staining in the cortex. Cortical plate was divided into five equal bins from the intermediate zone to the marginal zone. White arrows show EdU-positives cells accumulation in the IZ. CP, cortical plate; IZ, intermediate zone; VZ/SVZ, ventricular zone/subventricular zone. Scale bar 100 µm. **d** Quantification of EdU-positive cells in the specified regions, $n = 3$ embryos per group, Two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test, $*p < 0.05$, $***p < 0.001$. **e** Representative image of SATB2 staining in cortices of EdU injected *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice. Scale bar 50 µm. **f** Locomotory paths (colored lines) of electroporated neurons during time-lapse imaging. Scale bar 50 µm. **g** Percentage migrating neurons, $n = 3$ WT and $n = 4$ *Tubg1*$^{Y92C/+}$; **h** average migration velocity, **i** average number of pauses, and **j**. total time spent in pause, during the 10 h of recording, $n = 4$ independent experiments per group. Unpaired *t*-test, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ compared to wild type mice. **k** Percentage electroporated bipolar cells persisting bipolar or transitioning to multipolar morphology in 10 h recordings ($n = 3$ WT, $n = 4$ *Tubg1*$^{Y92C/+}$ independent experiments per group). **l** Percentage electroporated multipolar cells persisting multipolar or transitioning to bipolar morphology in 10 h recordings ($n = 3$ WT, $n = 4$ *Tubg1*$^{Y92C/+}$, independent experiments per group). **m** Percentage of arrested electroporated bipolar neurons with the centrosome ahead of nucleus, $n = 3$ WT, $n = 4$ *Tubg1*$^{Y92C/+}$ independent experiments per group. Unpaired *t*-test, $***p < 0.001$ compared to wild type mice. All data are presented as mean ± s.e.m. Source data are provided in the Source Data file

neurons to form one hand their classic afferent and efferent connections, and on the other, additional local connections has been discussed by Chevassus-au-Louis and Represa (1999)[43]. Authors point out that this could lead to dual connectivity patterns between regions that are not normally connected, inducing functional alterations such as epilepsy. Abnormal post-natal connectivity could additionally contribute to the global microcephaly, since this microcephaly appears postnatally in *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice. In line with this, for MCD patients with TUBG1 mutations, for whom HC size at birth was available, values appeared within the normal range (p.L387P, HC = 31 cm; p.Y92C, HC = 33 cm), but then progressed to severe reduction (p.L387P, HC = −5,5 SD; p.Y92C, HC = −4SD), suggesting a secondary microcephaly that mainly develops after birth. It would therefore be relevant to investigate whether the neuroanatomical abnormalities are due to additional defects in post-natal processes with the development of a conditional KI model allowing timed-regulated expression of *Tubg1*-Tyr92Cys. Overall, our *Tubg1*$^{Y92C/+}$ model presents with cortical and hippocampal malformations associated with a global microcephaly, behavioral alterations and epileptic susceptibility, all features that correlate with the phenotype of affected subjects making it an interesting model for gaining insight into the mechanisms of MCDs.

Gamma-tubulin is essential for the formation of mitotic spindle microtubules[44–48] but also for the coordination of mitotic events such as metaphase, anaphase and cytokinesis[49], so we expected to observe proliferation defects related to *TUBG1* pathogenic variants. The centrosome is known to be highly implicated in cell division where it plays a major role in organizing mitotic microtubules and variants in centrosomal components could be expected to affect primarily progenitor proliferation. Indeed, several mouse models with partial or complete loss of function of centrosomal proteins have been characterized with neurogenic defects and subsequent cell death leading to microcephaly, due to centrosome and mitotic spindle abnormalities[50,51]. Surprisingly, in our in utero electroporation experiments we saw that three of the *TUBG1* variants did not compromise proliferation of progenitor cells. Similarly, there were no disruptions in progenitor proliferation in *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice. These observations raise the question of whether the identified *TUBG1* mutations affect the overall structure or interactions within the centrosomal machinery. Interestingly, no structural defects were found in centrosomes and no subcellular mislocalization was observed for any of the four recombinant forms. Moreover, our videomicroscopy studies showed correct centrosome positioning in both migrating and non-migrating bipolar neurons, suggesting that the pathogenic phenotype is probably not related to the centrosomal function of TUBG1. Additionally, our EB3 studies showed reduced microtubule dynamics for three of the recombinant forms and a slight decrease that did not reach statistical significance for the Leu387Pro variant, probably due to a lack of sensitivity of the technique. Moreover, after complete depolymerization, newly nucleated microtubules were disorganized and shorter in human fibroblasts bearing the *TUBG1* variants. However, since no major abnormalities were observed in the overall organization of interphase microtubules without depolymerization, we hypothesize that microtubule nucleation properties of the centrosome are not affected and the observed deficiencies are rather due to altered microtubule dynamics. Immunoprecipitation assays showed that pathogenic forms co-precipitate with fewer γTuSC and γTuRC components, as well as with fewer γ-tubulin, suggesting a reduced capacity for mutant recombinant γ-tubulin to dimerize and to integrate these complexes. In addition to these observations, given the dominant mechanism of the variants, we hypothesize that mutant γ-tubulin affects the role of γ-TuCs and probably their interactions in regulating microtubule dynamics causing the pathogenic phenotype. Centrosome structure and γ-tubulin nucleating capacity do not seem to be affected by *TUBG1* variants, which could explain why mitotic processes and cell divisions are preserved. Our data suggests that disrupted neuronal migration could be related to additional non-centrosomal functions of γ-tubulin. In line with this hypothesis, centrosome-independent roles for γ-tubulin in the control of microtubule dynamics has been reported in *D. melanogaster*[52]. Authors show that γTuRCs localize along interphase microtubules and suggest they stabilize them by limiting catastrophe events at the plus tips. Similarly, in *S. pombe*, γ-tubulin has been suggested to cooperate with the kinesin-like protein *Pkl1p* to regulate the dynamics and organization of microtubules[53]. In HeLa cells, specific inhibition of γ-tubulin with gatastatin decreased the dynamics of interphase microtubules without affecting the overall microtubule network ant the number of growing microtubules[54]. In post-mitotic neurons, γTuRCs have been shown to participate in centrosome-independent microtubule nucleation mediated by Augmin complexes[55]. Finally, during cortical development, it was recently shown that acentrosomal microtubules nucleation controls neuronal morphology ensuring proper migration in vivo[56]. Altogether, this supports our results showing that pathogenic gamma-tubulin leads to reduced microtubule dynamics during interphase, and disrupts neuronal migration.

Methods

DNA constructs. Commercially available Human untagged *TUBG1* cDNA (NM_001070.3) cloned in pCMV6-XL5 vector (SC119462) was purchased from Origene. Variants (p.Tyr92Cys, p.Ser259Leu, p.Thr331Pro and p.Leu387Pro)

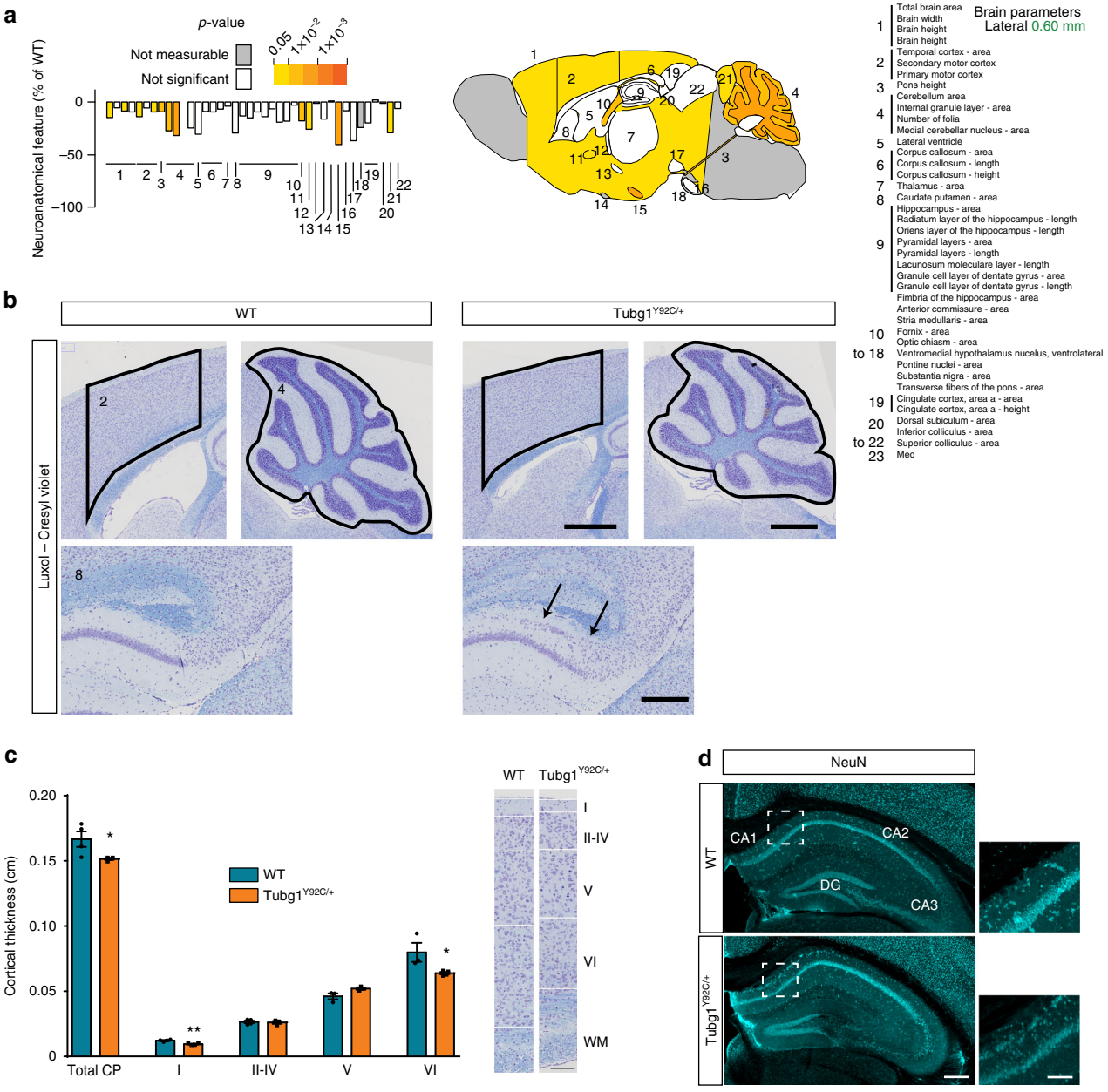
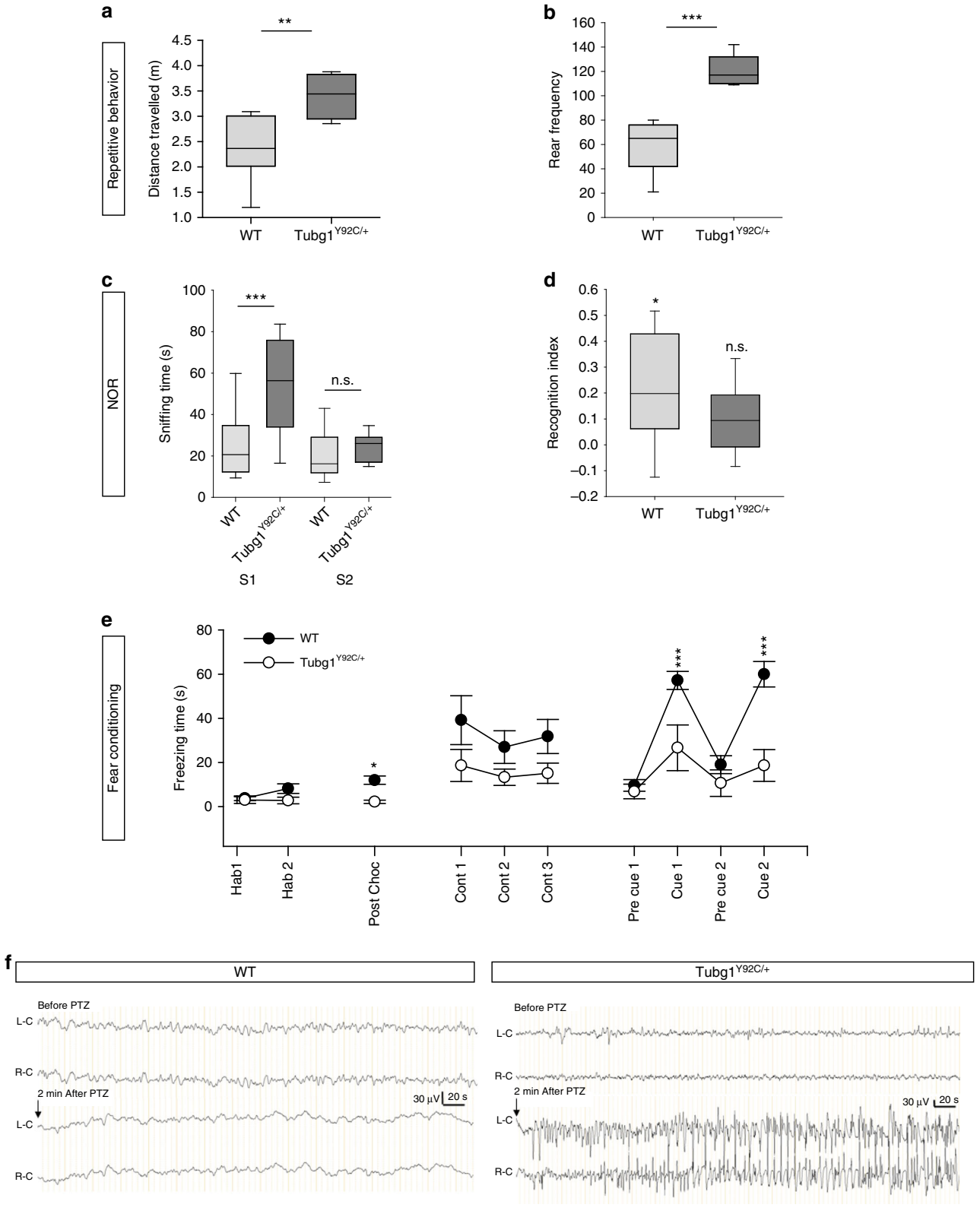


Fig. 6 Microcephaly and abnormal hippocampal organization in *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice. **a** Schematic representation of affected brain regions plotted in sagittal planes according to *p*-values. The right image represents a section at Lateral + 0.60 mm. White coloring indicates a *p*-value higher than 0.05 and gray shows not enough data to calculate a *p*-value. Histograms are showing the percentage decrease (minus scale) in size of measured brain regions as compared to the controls (100%). Numbers indicate assessed brain regions listed on the right; $n = 4$ 16-weeks-old male mice per group. **b** Sagittal sections of the hippocampus, the cortex and the cerebellum from control WT and *Tubg1*$^{Y92C/+}$ adult mice stained with cresyl violet/luxol blue. Black arrows indicate the hippocampal heterotopia. Scale bar 0.1 cm (upper panels), 200 µm (lower panel). **c** Cortical layers analysis (left panel) performed in sections of the secondary motor cortex in control WT and Tubg1$^{Y92C/+}$ adult mice stained with cresy violet/luxol blue, $n = 4$ mice per group, unpaired *t*-test, $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$. Data are presented as mean ± s.e.m. Source data are provided in the Source Data file. Representative images showing layers defects (right panel). Scale bar 150 µm. **d** Coronal sections of the hippocampus from control WT and *Tubg1*$^{Y92C/+}$ adult mice stained with NeuN, scale bar 300 µm. Higher magnification view of the region delimited with dotted square is shown on the right of each image, scale bar 100 µm

were introduced by site-directed mutagenesis using QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). WT and mutated cDNAs encoding human *TUBG1* were then inserted in the multiple cloning site of psiSTRIKE vector under the control of a CAG promoter. The DCX promoter from a DCX-IRES-GFP vector, kindly provided by U. Mueller (The Scripps Research Institute, CA, USA), was cut with SpeI and EcoRI and inserted into the psiSTRIKE vector, replacing the CAG promoter, resulting in a construct encoding the WT and mutated human *TUBG1* under a DCX promoter. Vector pmTubg1-TagRFP encoding mouse γ-tubulin 1 fused to Tag-RFP was prepared as described. Shortly, coding sequences of mouse Tubg1 were cut out from pmTubg1-FLAG vector by *Eco*RI/*Sal*I restriction enzymes and ligated into pCI-TagRFP[19] resulting in vector encoding TagRFP-tagged mouse γ-tubulin 1 (pmTubg1-TagRFP). Construct was verified by sequencing. Lentiviral vector pmTubg1-TagRF with puromycin resistance, encoding mouse γ-tubulin 1 fused to TagRFP was prepared as described[57]. Shortly, cassette encoding mouse γ-tubulin fused to TagRFP was digested out from pmTubg1-TagRFP construct[19] (see above) by *Eco*RI/*Not*I and ligated to pCDH-CMV-MCS-EF1-puro vector (System Biosciences) resulting in the lentiviral construct pmTubg1-TagRFP-puro. BLBP-GFP plasmid was kindly provided by N. Heintz (The Rockefeller University, NY, USA). The following plasmids were used as reporters for IUE experiments: a pCAGGS-IRES-Tomato (RFP) vector; a pCIG2-IRES-GFP vector, kindly provided by R.Belvindrah (INSERM, Paris, France); a NeuroD-GFP vector, kindly



provided by J. Godin (IGBMC, Strasbourg, France), a pSilencer-CAG-Venus-2 and a pCAG-mScarlet vectors, kindly provided by Julien Courchet (Institut NeuroMyoGene, Lyon). pCAG-PAKT-mKO bearing the pericentrin-AKAp450 centrosomal targeting (PACT) domain fused to Kusabira Orange was kindly provided by J. Godin (IGBMC, Strasbourg, France). All plasmid DNAs were prepared using the EndoFree plasmid purification kit (Macherey Nagel). Silencing experiments were performed using a sh-RNA sequence targeting mouse *Tubg1* mRNA (5′-TGAACCTGATAGCCACAGACCGCCTACAC-3′) that was cloned in the psiStrike vector under the control of a U6 promoter.

Antibodies. The following antibodies were used in this study: γ-tubulin (aa 38–53) GTU-88 (T6557, mouse, used at 1/10000 for WB and 1/1000 for IF/IHC, Sigma); Gamma-tubulin (434–451) TU-30 (ab27074, mouse, used at 1/1000, Abcam); GAPDH (MAB374, mouse, used at 1/1000, Chemicon); Cux1 (sc-13024, rabbit, used at 1/100, Santa Cruz); Cux1 (11733-AP, used at 1/100, Proteintech); GFP (A10262, chicken, used at 1/1000, ThermoFisher); CTIP2 (ab18465, rat, used at 1/500, Abcam); NeuN (MAB377, mouse, used at 1/500, Millipore); SATB2 (ab51502, mouse, used at 1/400, Abcam); TBR1 (ab31940, rabbit, used at 1/500, Abcam); Pax6 (PRB-278P, rabbit, used at 1/100, Eurogentec); Tbr2 (14–4875–80,

Fig. 7 *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice present with behavioral abnormalities **a**, **b** Repetitive behaviours. Distance travelled (**a**) and occurrences of rearing (**b**) numbered during 10 min of observation in a novel home-cage environment showing a significant increase for Tubg1$^{Y92C/+}$ mice. **c**, **d** Novel object recognition (NOR) task. Mice were allowed to explore an identical pair of objects, and after 24 h, they were presented with the familiar object and a new object. The sniffing time in seconds during the 14 min of the presentation and test session are represented in box plots. (TIT 24 h, nose close to the object <1 cm, L) (**c**). The recognition index (RI) (**d**) was calculated as the percentage of time sniffing time novel object (NO) minus the time sniffing the familiar object (FO) divided by the total time of sniffing. In box plots center line represents the median, end of boxes 25th and 75th percentile and whiskers 10th and 90th percentiles. **e** Fear conditioning test. Graphs plot the freezing during the different sessions of the test. The 4 min of habituation (Hab1 and 2) and the 2 min post choc. The 6-min context session (Cont 1, 2, and 3) was run 24-h after conditioning. The 8-min cue session was performed 5-hours after the context session. A sequence of 2-min with no cue (pre cue1 and 2) and 2 min with light/auditory (cue 1 and 2) conditioning stimulus were repeated twice. Data are presented as mean ± s.e.m., $n = 9$ mice per genotype. One-way ANOVA (**a**, **b**, and **d**) or Two-way ANOVA (**c**, **e**, and **f**) $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$. Source data are provided in the Source Data file. f. Representative EEG trace. Left panel: EEG recording before and after PTZ in WT mice without discharge activity. Right panel: *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice epileptiform discharge events before PTZ and generalized tonicoclonic seizure after PTZ. L-C: left cortex; R-C: right cortex. $n = 3$ adult mice from each genotype

rat, used at 1/200, eBioscience); PH3 (06–570, rabbit, used at 1/500, Millipore); Ki67 (NCL-L-Ki67-MM1, mouse, used at 1/500, Leica); Anti-tRFP (AB234, rabbit used at 1/5000 for WB, Evrogen); GCP4 (sc-271876, mouse, used at 1/1000 for WB, Santa Cruz); Anti-mouse antibody conjugated with HRP (W402B, goat, used at1/10000 for WB, Promega); Anti-rabbit antibody conjugated with HRP (W401B, goat, used at 1/100000 for WB, Promega). Anti-GCP2 antibody GCP2-01 (mouse monoclonal IgG2b) used for immunoprecipitation was described previously[58]; Anti-GCP2 antibody GCP2-02 (mouse monoclonal IgG1, in the form of hybridoma spent culture supernatant, used at 1/10 for WB) was described previously[58].

Cell culture. Mouse Neuroblastoma N2a and HeLa cells provided by the cell culture platform of the IGBMC (Strasbourg) are mycoplasma free (PCR test Venorgem) and have not been authenticated. N2a cells and subject's human fibroblasts cells were cultured in DMEM (Gibco) supplemented with 1 g L^{-1} of glucose, 5% foetal calf serum and gentamycine (DMEM-1 g L^{-1} glucose-5% FCS-gentamycine). Transfection was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and cells were then cultured for 48 h. N2a cells were used for differentiation assays 24 h after transfection by replacing the medium with DMED without serum and supplemented with 1 µM Retinoic acid. After 48 h cells were fixed in 4% PFA. For lentivirus production, HEK 293FT packaging cells (Invitrogen) were grown at 37 °C in 5% CO2 in DMEM supplemented with 10% FCS and antibiotics. The cells used for lentivirus production were at passage 4–15. For depolymerization assays, human fibroblasts were incubated with 5 µM nocodazole in DMEM for 1 h, at 4 °C. Medium was then replaced with preheated DMEM-1 g L^{-1} glucose-5% FCS-gentamycine. Cells were then fixed at different time points: 0, 5, and 5 min.

Lentiviral infection. Lentiviral infections were done as described previously[59]. Briefly, aliquots of 1.4 ml Opti-MEM medium (Invitrogen) were mixed with 21 µl of ViraPower Lentiviral Packaging Mix (Invitrogen), 14 µg lentiviral construct and 82 µl of Lipofectamine 2000. The mixture was incubated for 20 min at room temperature before it was added to semi-confluent HEK-293FT packaging cells in 150 cm^2 tissue- culture flask. After 3 days, viruses in culture supernatants were concentrated by centrifugation at 25,000 rpm for 2 h using JA-25.50 rotor (Beckman Coulter, Palo Alto, CA). The pellet was resuspended in 1 ml of culture medium and 0.2 ml aliquot was added to 7 ml of medium in 25 cm^2 tisue-culture flask with cells. The transfection mixture was replaced after 3 days with fresh complete medium containing 5 µg ml^{-1} puromycin. Stable selection was achieved by culturing cells for 1–2 weeks in the presence of puromycin.

Immunoprecipitation. To prepare extracts for immunoprecipitation, cells were rinsed twice in cold HEPES buffer (50 mM HEPES [pH 7.6], 75 mM NaCl, 1 mM MgCl2, and 1 mM EGTA) and extracted for 10 min at 4 °C with HEPES buffer supplemented with 1% Nonidet P-40 (extraction buffer), protease inhibitor mixture (Complete EDTA-free, Roche) and phosphatase inhibitors (1 mM Na_3VO_4, 1 mM NaF). The suspension was spun down (20000 × *g*, 15 min, and 4 °C) and supernatant was collected. Protein quantification in samples was assessed with a bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Thermo Scientific). Samples were diluted with TBST to the final protein concentration 0.6 mg ml^{-1}. Immunoprecipitations were performed as described elsewhere[60]. Extracts were incubated with Protein A beads (GE-Health Care) saturated with (i) rabbit antibody to TagRFP; (ii) monoclonal antibody GCP2–01 to GCP2; or (iii) immobilized protein A alone. 7.5% SDS-PAGE and immunoblotting were performed as described previously[61]. Bound primary antibodies were detected after incubation of the blots with HRP-conjugated secondary antibodies. HRP signal was detected with chemiluminescent reagents (Thermo Scientific) and the LAS 3000 imaging system (Fujifilm). AIDA image analyzer (ver.4) software (Raytest) was used for quantification of signals from immunoblots.

Western blot. 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 proteases inhibitors (Roche). Mouse cortices were lysed in RIPA buffer supplemented with proteases inhibitors (Roche) using a syringe with an 18 G needle. Protein concentrations were determined with a Bradford assay. Equal amounts of lysates were then loaded on polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked in 5% milk solution or 2% BSA in TBS-0.1% Tween and then incubated with the primary antibodies overnight at 4 °C. HRP (horseradish)-conjugated secondary antibodies (Thermo Fischer) were used at 1:10000. Uncropped and unprocessed scans of blots can be found in Supplementary Fig. 12.

Electron microscopy. Samples were immersed in glutaraldehyde (2.5%) and paraformaldehyde (2.5%) in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4) and post-fixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated through graded alcohol (50, 70, 90, and 100%) and propylene oxide for 30 min each, and embedded in Epon 812. Semithin sections were cut at 2 µm on an ultra microtome (Leica Ultracut UCT) and ultrathin sections were cut at 70 nm and contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined at 70 kv with a Morgagni 268D electron microscope (Phillips, FEI Electron Optics, Eindhoven, the Netherlands). Images were captured digitally by Mega View III camera (Soft Imaging System).

EB3 tracking analyses. Patient's fibroblasts and HeLa cells were cultured in fluorodish™ FD35-100 (World Precision Instruments) and transfected with EB3-GFP plasmid using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) following manufacturer instructions. Live video-microscopy recording was performed using a Confocal Spinning disk—NikonTi—Roper iLas FRAP system equipped with a PLAN APO VC 60x objective (Nikon Instrument, Inc., Melville, USA) and driven by Metamorph 7.0 (Molecular Devices, LLC). Samples were maintained at 37 °C and 5% CO2 during acquisition. Images were collected with Photometrics Prime 95B™ Scientific CMOS Camera (PHOTOMETRICS) every 200 ms during 2 min. Movie assembly and time projections were done using ImageJ software (http://rsb.info.nih.gov/ij/, NIH). For generation and analyses of kymographs Image J plug-in kymotoolbox (Available on demand on http://www.bic.u-bordeaux.fr) was used. Kymographs were calibrated in time (*y* in sec) and space (*x* in µm) and analyses were performed manually by following EB3 comet trajectories. Mean speed was extracted by the plug-in.

qPCR. Total RNA was prepared in three independent isolations from the cortices of mouse embryos at different time points of development with TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific), and cDNA samples were synthetized with SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Quantitative PCR was performed in a LightCycler PCR instrument (Roche) using SYBR Green Master Mix (Roche). Reaction conditions were carried out for 50 cycles (10 min Initial denaturation 95 °C, 10 s at 95 °C, 15 s at 60 °C and 20 s at 72 °C), each qRT-PCR reaction was performed in triplicate and relative mRNA expression was normalized to GAPDH for Tubg1 and Tubg2 comparisons and to Actin for mouse models.

The following gene-specific primers were used for mouse γ-tubulin 1: Forward: 5′CCCAGGGAGAAAAAATCCACGAGGA3′; Reverse: 5′GAGCCCAAGCCAGAGCCTGTCC 3′; for mouse γ-tubulin 2: Forward: 5′GACCGAGAAGCAGATGGAG3′; Reverse: 5′CGTTCAGTCGCTCTAAGAGG3′.

For mouse model validation, the following primers were used between exons 1 and 4 for KI mice: Forward 5′GAGGAGCGATGCCGAGAGAA3′, Reverse 5′CATCTGCCTCCCGATCTATG3′ and between exons 10 and 11 for KO mice: Forward: 5′TCTCCTCGCTCTTCGAACGGA3′ and Reverse: 5′TCAATCAGCTGCTGCACAAT3′. The presence of the mutation in KI mice was verified by PCR on cDNA samples using Taq DNA Polymerase (Roche) using the same primers as those used for qPCR. PCR products were sent to GATC biotech for Sanger sequencing.

Immunohistochemistry and immunofluorescence. Free floating sections were blocked in 2% donkey serum in PBS-0.3% Triton-X and then incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies. Alexa-coupled secondary antibodies (Thermo Fischer) were used at 1/500. Nuclei were stained with a Hoechst solution (H3570, Life Technologies) for 20 min, used at 1/2000.

Neuro2a cells grown on glass coverslips were fixed in 4% PFA, blocked in 5% donkey serum in PBS-0.3% Triton-X and then incubated for 1 h with the primary antibodies. Alexa-coupled secondary antibodies (Thermo Fischer) were used at 1/500.

Human fibroblasts grown on glass coverslips were fixed in 3% PFA-PHEM buffer (60 mM Pipes, 25 mM Hepes, 5 mM EGTA, 1 mM MgCl, pH 7), post-permeabilized in 0.5% Triton X in PHEM for 4 min at 37 °C and post-fixed in ice cold methanol for 2 min on ice. Fibroblasts were then blocked in 5% donkey serum in PHEM-0.3% Triton-X and then incubated for 1 h with the primary antibodies. Alexa-coupled secondary antibodies (Thermo Fischer) were used at 1/500.

Images were acquired using a confocal microscope TCS SP8 X (Leica microsystems).

In utero electroporation. In utero electroporation was performed using timed pregnant Swiss mice (Janvier)[62]. Animal experimentations were performed at the IGBMC animal facilities. The study was conducted according to national and international guidelines (authorization numbers 2017062811273521 and 2017022316297963, French MESR) and the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on mouse experimentation (Comité d'éthique pour l'expérimentation animale (Strasbourg, France)). At E14.5 the pregnant mice were anaesthetized with isolflurane (2 l min^{-1} of oxygen, 3% isoflurane during induction and 2.5% during surgery). The uterine horns were exposed, and a lateral ventricle of each embryo was injected using pulled glass capillaries (Harvard Apparatus) with Fast Green (2 µg ml^{-1}; Sigma) combined with the DNA constructs prepared with EndoFree plasmid purification kit (Macherey Nagel) and a reporter vector at 1 µg $µ^{-1}$ l each. 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, P3 ot P8. Embryo or pup brains were dissected and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS (Prosphate buffered saline) overnight and then sectioned at 80 µm slices using a VT1000S vibratome (Leica biosystems).

Time-lapse videomicroscopy. For time-lapse videomicroscopy, E16.5, embryo brains electroporated 2 days earlier, were dissected, embedded in 3% low-melt agarose (BioRad) diluted in HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, ThermoFisher Scientific) and sliced (300 µm) with a vibratome (Leica VT1000S, Leica Microsystems)[63]. Brain slices were cultured 16–24 h 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 2% B27, 1% N2, and 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Life Technologies). Slice cultures were placed in a humidified and thermoregulated chamber maintained at 37 °C on the stage of an inverted confocal microscope. Time-lapse imaging was performed with a Leica SP8 X scanning confocal microscope equipped with a 25X objective. Forty to fifty successive 'z' optical planes were acquired every 0.5 µm and every 30 min during 10 h. Sequences were analyzed using Image J and the 'Manual Tracking' Plugin.

EdU labelling. E14.5 electroporated pregnant mice were intraperitoneally injected 24 h later with EdU (5-ethynyl-2′-deoxyuridine solution, Invitrogen) diluted in sterile normal saline at the dose of 40 mg EdU kg^{-1} of body weight. Brains from embryos were dissected and fixed at E16.5. EdU staining was performed using Click-iT EdU Alexa Fluor 647 Imaging Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Mouse model and genotyping. Heterozygous *Tubg1* knock-out and knock-in mice expressing the Tyr92Cys (*Tubg1*$^{Y92C/+}$) variant were generated in the Institut Clinique de la Souris (Celphedia, Phenomin, ICS, Illkirch). The targeting vector (shown in Supplementary Fig. 6) was constructed as follows. An 843 bps fragment encompassing part of Tubg1 exons 2 and 3 was amplified by PCR (from RP23-440M18 BAC containing Tubg1) in two steps to allow the introduction of the A > G point mutation in exon 3 and subcloned in an ICS proprietary vector. This mutation changes the TAC codon in a TCC codon leading in a tyrosine to cysteine mutation at position 92 (Y92C). The ICS vector has a flipped Neomycin resistance cassette as well a 2 LoxP sites, one is located 5′ of the 843 bps fragment and NeoR cassette and one 3′ of the flipped NeoR cassette. Two fragments corresponding to the 5′ (3.5 kb) and 3′ (3.5 kb) homology arms were amplified by PCR and subsequently subcloned in step1 plasmid to generate the final targeting construct. The linearized construct was electroporated in C57BL/6N mouse embryonic stem (ES) cells (ICS proprietary line). After G418 selection, targeted clones were identified by long-range PCR and further confirmed by Southern blot with an internal (Neo) probe and a 3′ external probe. Two positive ES clones were validated by karyotype spreading and microinjected into BALB/C blastocysts. Resulting male chimeras were bred with Flp deleter females showing maternal contribution[64]. Germline transmission with the direct excision of the selection cassette was achieved in the first litter. The initial allele comprising the floxed and mutated fragment represents the KI allele. The KO allele can be obtained subsequently by breeding the initial allele with a Cre deleter line. Genotyping was performed by standard short-range PCR, using the following primers: Lf, CCTCGCAATAAGGTCATAGCTTCGG; Mf, GTGATCCATTCCATCCTAAACTCCTC; Ef, GGAACGCTAAGGACGCA GTCTAG; Mqf, GAAGAACGAGATCAGCAGCCTCTGTTCC; Lxr, CATACAT TATACGAAGTTATCTGCAG; Lr, GGTAGGTTCCAAATAGCCAGTGGG; Mr, CTGTGCCCACCCACAGAGTTGAG; Mqr, TGCTAAAGCGCATGCTCCAGA CTGC and Er, GCCTTCCTTCTCCATTGCGCATTG. The position of the different primers used are represented in Supplementary Fig. 6a. To determine the genotype, the presence and size of PCR fragments were analyzed to detect: the presence of exon 3 (Mf/Mr); the presence of distal LoxP (Lf/Lr), excision of the selection marker (Ef/Er), 5′ part of the selection marker (Ef/Mqr); 3′ part of the selection marker (Mqf/Er); LoxP specific PCR (Lf/Lxr) and the excision of the floxed exon (Lf/Er) The presence of the point mutation was confirmed by Sanger sequencing on the first F1 animals.

Mice were handled according to national and international guidelines (authorization number 2017022316297963, French MESR) and the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on mouse experimentation (Comité d'éthique pour l'expérimentation animale (Strasbourg, France)).

Neuroanatomical studies. Adult neuroanatomical studies were carried out using eight male mice ($n = 4$ per group) for *Tubg1* knock-in mice and 12 mice ($n = 3$ per group, male and female) for *Tubg1* knock-out mice. All mice were precisely 16-weeks-old. Mice were euthanized in a CO2 chamber and brains were dissected and fixed in 4% buffered formalin for 48 h, then transferred to 70% ethanol. Samples were embedded in paraffin using an automated embedding machine (Sakura Tissue-Tek VIP) and cut at a thickness of 5 µm with a sliding microtome (HM 450; Microm) in order to obtain sagittal brain region at Lateral +0.60 mm. The sections were then stained with 0.1% Luxol Fast Blue (Solvent Blue 38; Sigma-Aldrich) and 0.1% Cresyl violet acetate (Sigma-Aldrich) and scanned using NanoZoomer 2.0HT, C9600 series at 20x resolution. 166 brain parameters, made of area and length measurements as well as cell level features, were taken blind to the genotype across one precise sagittal section at Lateral +0.60 mm for *Tubg1* knock-in mice. For *Tubg1* knock-out mice, we measured 67 parameters across two coronal planes at Bregma +0.98 and Bregma −1.34 mm. Cortical layers were visually assessed based on neuronal differences in cytoarchitecture. Data were analyzed using a two-tailed Student *t*-test of equal variance to determine whether a brain region is associated with neuroanatomical defect or not. Similarly, neuroanatomical studies were carried out at postnatal day 0 ($n = 5$ WT and $n = 4$ Tubg1$^{Y92C/+}$ mice). Brain sections were cut exactly in the plane of the closest image to the section defined as critical section at Lateral +0.60 mm of the right hemisphere. Forty brain parameters, made of area and length measurements, were taken blind to the genotype.

Behavioral experiments. All mouse experimental procedures were performed in agreement with the EC directive 2010/63/UE86/609/CEE for the care and use of laboratory animals and every effort was made to minimize the number of animals used. The local animal care, use and ethic committee of the Institute of Genetics and of Molecular and Cellular Biology (IGBMC) approved the protocol under accreditation number 2017022316297963. One cohort of wild-type and mutant male mice were used for behavioural experiments (nine wt and nine *Tubg1*$^{+/-}$ in total, from 2.5 months ±1 week of age for the phenotyping). For all behavioural experiments, mice were kept in SPF conditions with free access to food and water. The light cycle was controlled as 12 h light and 12 h dark (lights on at 7:00 AM) and the tests were conducted between 9:00 AM and 4:00 PM. To produce experimental groups, only animals coming from litters containing a minimum of two male pups were selected. After weaning, male mice were gathered by litters in the same cage. Animals were transferred to the experimental room 30 min before each experimental test. Behavioural experimenters were blinded as to the genetic status of the animals. Tests were administrated in the following order, circadian activity, Y maze, OF, NOR, repetitive behaviours and FC with a maximum of one week in between two tests.

For the OF, the apparatus consisted of a white circular arena (52 cm diameter, 32 cm height) placed in a dimly lit testing room (30–40 lux). The mice were placed for 15 min in this arena for two successive sessions with 24 h of interval. During the sessions, mice were monitored using a video tracking system (Ethovision, Wageningen, The Netherlands), total distance travelled and time spent in the different zone of the arena (center, intermediate and peripheral) was recorded.

For circadian activity, spontaneous locomotor activity and rears were measured using individual boxes equipped with infra-red captors. Mice were tested for 45 h in order to measure habituation to the apparatus (two dark phase) as well as nocturnal and diurnal activities, represented by locomotor and rear activity. Results are expressed per 1 h periods.

For studying repetitive behaviour, mice were put individually into dimly lit (60 Lux) clean home-cages without pellets or water bottle. The occurrence of repetitive behaviours (rearing, jumping, digging, grooming) was observed for 10 min and scored using an ethological keyboard (Viewpoint, Labwatcher, France). This test was done only a cohort of nine WT and nine KI animals.

The NOR task was done 24 h after OF the session performed in the same apparatus. On Day 1, mice were placed in the test apparatus containing two identical objects and were free to explore them for 14 min (defined as a training session). The time spent exploring each object was manually scored and nose to the object at a distance <1.5 cm. After this acquisition phase, mice were returned to their home cage. After a waiting period of 24 h, mice were placed once again in the test apparatus with one FO (from the acquisition phase) and one NO. Mice were again free to explore the two objects for a 14 min period (defined as a test session) and time spent exploring each object was manually scored. Between trials and subjects, the different objects were cleaned with 70° ethanol in order to reduce olfactory cues. To avoid a preference for one of the two objects, the new one was different for the different animal groups and counterbalanced between genotype. It was also the case for the emplacement of the NO compared to the familiar one (left or right). For the retention phase, a RI was calculated as the percentage of time sniffing time NO minus the time sniffing the FO divided by the total time of sniffing, to assess memory performance. For this test, four WT mice were excluded because they did not come into contact with objects (sniffing time lower than 3 s).

FC (Contextual and Cued FC) experiments were conducted in four operant chambers (28 × 21 × 22 cm) with a metal bar floor linked to a shocker (Coulbourn Instruments, Allentown US). Chambers were dimly lit with a permanent house-light and equipped with a speaker for tone delivery and an infra-red activity monitor. The activity/inactivity behaviour was monitored continuously during the different session and data were expressed in duration of inactivity per 2 s. The experimental procedure consists of three sessions over 2 days. On day 1, for the conditioning session, the mouse was allowed to acclimate for 4 min, then a light/tone (10 kHz, 80-dB) conditioned stimulus (CS) was presented for 20 s and terminated by a mild foot shock unconditional stimulus (US) (1 s, 0.4 mA). After the foot shock, animals were left in the chamber for another 2 min. Total freezing time during the first 2 min and 4 min and 2 min immediately after foot shock was defined, respectively, as PRE1, PRE2 and POST. On Day 2, the context testing was performed by putting back the mice into the same chamber and allowing them to explore for 6 min without presentation of the light/auditory CS. The movement of the animal were monitored to detect freezing behaviour consequent to recognition of the chamber as the spatial context (contextual learning). The total freezing time was calculated by 2 min block as CONT2, CONT4 and CONT6. Finally, the cue testing was performed 5 h after the context testing. Animals were tested in modified conditioning chambers with walls and floor of a different colour and texture. The mouse was allowed to habituate for 2 min then presented to light/auditory cues for 2 minutes to evaluated conditioning fear. The total freezing time was calculated by 2 min block as PRECUE1, CUE1, PRECUE2, and CUE2.

The Y maze was made of three enclosed plastic arms, each 40 × 9 × 16 cm, set at an angle of 120° to each other, in the shape of a Y. The wall of the arm has different pattern to encourage spontaneous alternation behaviour (SAB). Animals were placed at the end of one arm (this initial arm was alternated within the group of mice to prevent bias of arm placement), facing away from the centre, and allowed to freely explore the apparatus for 6 min under moderate lighting conditions (70 lux in the centre-most region). The time sequences of entries in the three arms were recorded (arm entry was counted when mouse had all four paws inside the arm). Alternation was determined from successive entries of the three arms on overlapping triplet sets in which three different arms are entered. The number of alternations was then divided by the number of alternation opportunities namely, total arm entries minus one. In addition, total entries were scored as an index of locomotor activity.

Data were assessed for normality by Shapiro–Wilk test and for equality of variance by Brown–Forsythe test. If normality and equality of variance is assumed, we performed a one-way ANOVA analysis. In case of normality or equal of variance failure, we performed a one-way ANOVA on the rank (Kruskal–Wallis). By the same way, data from OF, NOR, and FC were assessed by repeated measure two-way ANOVA with genotype as between subject and session as within subject. All pairwise comparison was done with Tukey test in post hoc analysis. Also NOR RI was analysed with one sample *t*-test for determined a significant difference versus 0.

EEG recordings. Implantation of electrodes was done under general anesthesia (Propofol, Fentanyl, Domitor mixture 10 µL g^{-1}). Heterozygous *Tubg1*$^{Y92C/+}$ ($n = 3$) and C57Bl/6 wild-type littermate mice ($n = 3$) aged postnatal 12 weeks were implanted with stainless steel wire electrodes (Phymep, France). For each mouse, five single-contact electrodes were placed over the left and right fronto-parietal cortex. The electrodes were secured into the skull and soldered to a micro-connector that was fixed to the skull by acrylic cement. An electrode over the surface of the cerebellum served as ground for all derivations. All mice were allowed to recover for a period of 1 week before EEG recordings. Freely moving mice were then recorded in their housing transparent cage and were connected to a recording system. EEG signals were amplified with a band-pass filter setting of 0.1–70 Hz with a 64-channel system (Coherence, Natus) and sampled at 256 Hz. Recordings were performed during 1 h for evidence of spontaneous convulsive seizure. At the end of the recording period, animals were injected intraperitoneally with a convulsive dose of 30 mg kg^{-1} of pentylenetetrazole (PTZ; Sigma-Aldrich, Co), a $GABA_A$ receptor antagonist, to evaluate seizure threshold. EEG was recorded during 30 min after PTZ. Video-EEGs were reviewed offline for electrographic seizures.

Quantifications and statistical analysis. All experiments were done in at least three independent replicates and analysis were performed blinded to genotype or condition. All statistics were calculated with GraphPad Prism 6. Data are presented as mean ± sem. The experimental n, the test used and the statistical significance can be found in the figure legends. For in utero electroporation experiments cell countings were done in three different brain slices of at least three different embryos, pups or mice for each condition. Time-lapse recordings were performed in a minimum of three electroporated embryos per group. For all histological quantifications performed in *Tubg1*$^{Y92C/+}$ and *Tubg1*$^{+/-}$ mice three brain sections per brain of at least three different animals per condition were analyzed. Morphometric analysis of the knock-in and knock-out mice, a minimum of three animals were studied and analyzed in a single specific brain section. Experiments performed in cells (N2A, HeLA, Fibroblasts) were done independently at least three times. For EB3 comets, in each experiment 10 cells were analyzed and in each cell 15–30 comets were quantified. For re-polymerization, in each experiment around 100 cells were analyzed per condition. For behavioral analysis, 9 male mice of each genotype were used. Three mice of each genotype were used for EEG recordings and challenged with PTZ. A more detailed description of statistics is provided in Supplementary Dataset 3.

Reporting summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availiability

The source data underlying Figs. 1c; 2b, c; 3b–g, i–k; 4b, c, e, g–i; 5b, d, g–m; 6a, c; 7a–e; and Supplementary Figs. 1c, d; 2a–c, e, g, i; 3a, c–f; 4d; 5c, d; 6d–f; 7; 8; 9a; 10a–j, l–o; 11b–e are provided as a Source Data file. All other relevant data included in the article are available from the authors upon request.

Received: 15 May 2018 Accepted: 5 April 2019
Published online: 13 May 2019

References

1. Rakic, P. Specification of cerebral cortical areas. *Science* **241**, 170–176 (1988).
2. Anderson, S. A., Eisenstat, D. D., Shi, L. & Rubenstein, J. L. R. Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. *Science.* **278**, 15–18 (1997).
3. Guerrini, R. & Dobyns, W. B. Malformations of cortical development: clinical features and genetic causes. *Lancet Neurol.* **13**, 710–726 (2014).
4. Francis, F. et al. Human disorders of cortical development: from past to present. *Eur. J. Neurosci.* **23**, 877–893 (2006).
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. Jaglin, X. H. & Chelly, J. Tubulin-related cortical dysgeneses: microtubule dysfunction underlying neuronal migration defects. *Trends Genet.* **25**, 555–566 (2009).
7. Bahi-Buisson, N. et al. The wide spectrum of tubulinopathies: what are the key features for the diagnosis? *Brain* **137**, 1676–1700 (2014).
8. Bond, J. et al. A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size. *Nat. Genet.* **37**, 353–355 (2005).
9. Hussain, M. S. et al. A truncating mutation of CEP135 causes primary microcephaly and disturbed centrosomal function. *Am. J. Hum. Genet.* **90**, 871–878 (2012).
10. Yu, T. W. et al. Mutations in WDR62, encoding a centrosome-associated protein, cause microcephaly with simplified gyri and abnormal cortical architecture. *Nat. Genet.* **42**, 1015–1020 (2010).
11. Guernsey, D. L. et al. Mutations in centrosomal protein CEP152 in primary microcephaly families linked to MCPH4. *Am. J. Hum. Genet.* **87**, 40–51 (2010).
12. Bond, J. et al. ASPM is a major determinant of cerebral cortical size. *Nat. Genet.* **32**, 316–320 (2002).
13. Kumar, A., Girimaji, S. C., Duvvari, M. R. & Blanton, S. H. Mutations in STIL, encoding a pericentriolar and centrosomal protein, cause primary microcephaly. *Am. J. Hum. Genet.* **84**, 286–290 (2009).
14. Poirier, K. et al. Mutations in TUBG1, DYNC1H1, KIF5C and KIF2A cause malformations of cortical development and microcephaly. *Nat. Genet.* **45**, 639–647 (2013).
15. Brock, S. et al. Tubulinopathies continued: refining the phenotypic spectrum associated with variants in TUBG1. *Eur. J. Hum. Genet.* **26**, 1132–1142 (2018).
16. Yuba-Kubo, A., Kubo, A., Hata, M. & Tsukita, S. Gene knockout analysis of two γ-tubulin isoforms in mice. *Dev. Biol.* **282**, 361–373 (2005).

17. Dráberová, E. et al. Differential expression of human γ-tubulin isotypes during neuronal development and oxidative stress points to a γ-tubulin-2 prosurvival function. *FASEB J.* **31**, 1828–1846 (2017).
18. Moudjou, M., Bordes, N., Paintrand, M. & Bornens, M. gamma-Tubulin in mammalian cells: the centrosomal and the cytosolic forms. *J. Cell. Sci.* **109** (Pt 4), 875–887 (1996).
19. Vinopal, S. et al. γ-Tubulin 2 nucleates microtubules and is downregulated in mouse early embryogenesis. *PLoS ONE* **7**, e29919 (2012).
20. Ohashi, T., Yamamoto, T., Yamanashi, Y. & Ohsugi, M. Human TUBG2 gene is expressed as two splice variant mRNA and involved in cell growth. *FEBS Lett.* **590**, 1053–1063 (2016).
21. Oegema, K. et al. Characterization of two related Drosophila γ-tubulin complexes that differ in their ability to nucleate microtubules. *J. Cell. Biol.* **144**, 721–733 (1999).
22. Knop, M. & Schiebel, E. Spc98p and Spc97p of the yeast gamma-tubulin complex mediate binding to the spindle pole body via their interaction with Spc110p. *EMBO J.* **16**, 6985–6995 (1997).
23. Kollman, J. M. et al. The structure of the gamma-tubulin small complex: implications of its architecture and flexibility for microtubule nucleation. *Mol. Biol. Cell.* **19**, 207–215 (2008).
24. 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).
25. Wang, X., Qiu, R., Tsark, W. & Lu, Q. Rapid promoter analysis in developing mouse brain and genetic labeling of young neurons by doublecortin-DsRed-express. *J. Neurosci. Res.* **85**, 3567–3573 (2007).
26. Galjart, N. Plus-end-tracking proteins and their interactions at microtubule ends. *Curr. Biol.* **20**, R528–R537 (2010).
27. Collins, S. C. et al. A method for parasagittal sectioning for neuroanatomical quantification of brain structures in the adult mouse. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* **8**, e48 (2018).
28. Li, G. & Pleasure, S. J. The development of hippocampal cellular assemblies. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **3**, 165–177 (2014).
29. Bevins, R. A. & Besheer, J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat. Protoc.* **1**, 1306–1311 (2006).
30. Crawley, J. N. Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Res.* **835**, 18–26 (1999).
31. Loscher, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure* **20**, 359–368 (2011).
32. Oakley, C. E. & Oakley, B. R. Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of Aspergillus nidulans. *Nature* **338**, 662–664 (1989).
33. Gueth-Hallonet, C. et al. Gamma-Tubulin is present in acentriolar MTOCs during early mouse development. *J. Cell. Sci.* **105**, 157–166 (1993).
34. Donato, N. Di et al. Analysis of 17 genes detects mutations in 81 % of 811 patients with lissencephaly. *Genet. Med.* **20**, 1354–1364 (2018).
35. Faheem, M. et al. Molecular genetics of human primary microcephaly: an overview. *Bmc. Med. Genom.* **8**, 24–27 (2015).
36. Corbo, J. C. et al. Doublecortin is required in mice for lamination of the hippocampus but not the neocortex. *J. Neurosci.* **22**, 7548–7557 (2002).
37. Keays, D. A. et al. Mutations in α-Tubulin cause abnormal neuronal migration in mice and lissencephaly in humans. *Cell* **128**, 45–57 (2007).
38. Gstrein, T. et al. Mutations in Vps15 perturb neuronal migration in mice and are associated with neurodevelopmental disease in humans. *Nat. Neurosci.* https://doi.org/10.1038/s41593-017-0053-5 (2018).
39. Stottmann, R. W. et al. *Genes. Brain. Behav.* **16**, 250–259 (2016).
40. Bai, J. et al. RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nat. Neurosci.* **6**, 1277–1283 (2003).
41. Jaglin, X. H. et al. Mutations in the B-tubulin gene TUBB2B result in asymmetrical polymicrogyria. *Nat. Genet.* **41**, 746–752 (2009).
42. Wong, M. & Roper, S. N. Genetic animal models of malformations of cortical development and epilepsy. *J. Neurosci. Methods* **260**, 73–82 (2016).
43. Chevassus-au-Louis, N. & Represa, A. The right neuron at the wrong place: Biology of heterotopic neurons in cortical neuronal migration disorders, with special reference to associated pathologies. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 1206–1215 (1999).
44. Oakley, B. R., Oakley, C. E., Yoon, Y. & Jung, M. K. Gamma-tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in Aspergillus nidulans. *Cell* **61**, 1289–1301 (1990).
45. Stearns, T., Evans, L. & Kirschner, M. Gamma-tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell* **65**, 825–836 (1991).
46. Joshi, H. C., Palacios, M. J., McNamara, L. & Cleveland, D. W. Gamma-tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation. *Nature* **356**, 80–83 (1992).
47. Oakley, B. R. I. Centrosomes and Microtubule Nucleation. *Curr. Top. Dev. Biol.* **49**, 27–54 (2000).
48. Wiese, C. & Zheng, Y. A new function for the gamma-tubulin ring complex as a microtubule minus-end cap. *Nat. Cell Biol.* **2**, 358–364 (2000).
49. Hendrickson, T. W., Yao, J., Bhadury, S., Corbett, A. H. & Joshi, H. C. Conditional mutations in gamma-tubulin reveal its involvement in chromosome segregation and cytokinesis. *Mol. Biol. Cell.* **12**, 2469–2481 (2001).
50. Feng, Y. & Walsh, C. A. Mitotic spindle regulation by Nde1 controls cerebral cortical size. *Neuron* **44**, 279–293 (2004).
51. Mcintyre, R. E. et al. Disruption of mouse cenpj, a regulator of centriole biogenesis, phenocopies seckel syndrome. *PLoS Genet.* **8**, 1–18 (2012).
52. Bouissou, A. et al. γ-Tubulin ring complexes regulate microtubule plus end dynamics. *J. Cell. Biol.* **187**, 327–334 (2009).
53. Paluh, J. L. et al. A mutation in gamma-tubulin alters microtubule dynamics and organization and is synthetically lethal with the kinesin-like protein pkl1p. *Mol. Biol. Cell.* **11**, 1225–1239 (2000).
54. Chinen, T. et al. The γ-tubulin-specific inhibitor gatastatin reveals temporal requirements of microtubule nucleation during the cell cycle. *Nat. Commun.* **6**, 1–11 (2015).
55. Sánchez-Huertas, C. et al. Non-centrosomal nucleation mediated by augmin organizes microtubules in post-mitotic neurons and controls axonal microtubule polarity. *Nat. Commun.* **7**, 12187 (2016).
56. Cunha-Ferreira, I. et al. The HAUS complex is a key regulator of non-centrosomal microtubule organization during neuronal development. *Cell Rep.* **24**, 791–800 (2018).
57. Sulimenko, V. et al. Microtubule nucleation in mouse bone marrow–derived mast cells is regulated by the concerted action of GIT1/βPIX proteins and calcium. *J. Immunol.* **194**, 4099–4111 (2015).
58. Dráberová, E. et al. Overexpression and nucleolar localization of γ-tubulin small complex proteins GCP2 and GCP3 in glioblastoma. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **74**, 723–742 (2015).
59. Hájková, Z. et al. STIM1-directed reorganization of microtubules in activated mast cells. *J. Immunol.* **186**, 913–923 (2011).
60. Sulimenko, V. et al. Association of brain γ-tubulins with αβ-tubulin dimers. *Biochem. J.* **365,** 889–895 (2002).
61. Katsetos, C. D. et al. Altered cellular distribution and subcellular sorting of γ-tubulin in diffuse astrocytic gliomas and human glioblastoma cell lines. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **65**, 465–477 (2006).
62. Tabata, H. & Nakajima, K. 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 (2001).
63. Tielens, S., Godin, J. D. & Nguyen, L. Real-time recordings of migrating cortical neurons from GFP and Cre recombinase expressing mice. *Curr. Protoc. Neurosci.* **74**, 3.29.1–23 (2016).
64. Birling, M.-C., Dierich, A., Jacquot, S., Herault, Y. & Pavlovic, G. Highly-efficient, fluorescent, locus directed cre and FlpO deleter mice on a pure C57BL/6N genetic background. *Genesis* **50**, 482–489 (2012).

Acknowledgements

This work was supported by grants from the EU Seventh Framework Programme FP7 under the projects GENCODYS (COLLABORATION PROJECT-2009-2.1.1-1/241995 to H.S., Y.H. and J.C.) and DESIRE (grant agreement no. 602531 to J.C), the French state funds through the Agence Nationale de la Recherche under the projects ANR-15-CE16-0018-01, and the programme Investissements d'Avenir labelled [ANR-10-IDEX-0002-02, ANR-10-LABX-0030-INRT, to B.Y., J.G, J.C., Y.H., and ANR-10-INBS-07 PHENOMIN to Y.H.]. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish or manuscript preparation. This work was also supported in part by Grants 16–23702s (Vadym Sulimenko) and 18–27197s (Pavel Dráber) from the Grant Agency of the Czech Republic and by Institutional Research Support (RVO 68378050). We thank the Imaging Center of IGBMC (ici.igbmc.fr), in particular Basile Gurchenkov, Elvire Guiot and Erwan Grandgirard for their assistance in the microscope imaging experiments and Nadia Messaddeq from the electron microscopy platform for the data generated. We are grateful to the staff of the mouse facilities of the Institut Clinique de la souris (ICS) and Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) for their involvement in the project. We also thank the lab of David Agard (San Francisco, California), and in particular Axel Brilot for their assistance and suggestions. We thank Maria Osipenko for the analysis of cortical thickness in adult knock-in mice. We are grateful to Julien Couchet for providing us the pCAG-mScarlet and pSilencer-CAG-Venus-2 plasmids. We would like to acknowledge Mohammed Selloum and Hamid Meziane for their implication in the characterization of Tubg1$^{+/-}$ model.

Author contributions

E.L.I. conceived and designed the experiments, performed experiments and analyzed the data of IUE, Time-lapse, cellular studies in fibroblasts and N2a cells, immunohistochemistry studies in mice and wrote the manuscript. J.G.G. performed and analyzed EB3 studies in fibroblasts and immunohistochemistry studies in mice and reviewed the manuscript. Vad.S. conceived, designed, performed and analyzed the data of immunoprecipitation studies and reviewed the manuscript. A.D. performed and analyzed behavioral studies. G.R. performed and analyzed EEG studies. K.R. participated in IUE and Time-lapse studies. S.C.C. performed neuroanatomical studies. L.A. provided assistance with Time-lapse studies. L.B. provided assistance and contributed with suggestions. N.D, and P.T. provided technical assistance and prepared reagents. P.N. provided patient fibroblasts. W.M. and A.V. and Val.S. provided technical assistance and advice for in vivo studies in mice. J.D.G. provided assistance, contributed with suggestions and reviewed the manuscript. M-C.B. and G.P. participated in the development of the mouse model. B.Y. designed experiments related to neuroanatomical studies. Y.H. designed experiments related to behavioral studies and reviewed the manuscript. P.D. designed experiments related to immunoprecipitation studies, provided assistance, contributed with suggestions and reviewed the manuscript. J.C. conceived, coordinated and supervised the study. M-V.H. conceived, designed, performed and analyzed the data of proliferation and EB3 in HeLa cells studies, coordinated and supervised the study.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at https://doi.org/10.1038/s41467-019-10081-8.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Reprints and permission information is available online at http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/

Journal peer review information: *Nature Communications* thanks the anonymous reviewers for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2019

Laure ASSELIN

Etude du rôle de la kinésine Kif21b au cours du développement cortical

Résumé

Le développement du cortex cérébral se déroule selon des étapes bien définies qui sont essentielles à la formation d'un cerveau fonctionnel. La perturbation de l'une ou plusieurs de ces étapes peut conduire à des malformations neuro-développementales, responsables de différents troubles cognitifs, d'épilepsies ou encore de déficience intellectuelle. De nombreuses mutations dans des gènes codant pour les tubulines ou bien les kinésines, sont retrouvées chez des individus présentant diverses anomalies neuro-développementales. Bien que les kinésines soient impliquées dans le développement cortical, les mécanismes fonctionnels par lesquels elles conduisent aux malformations demeurent encore méconnus. Mon travail de thèse identifie la kinésine Kif21b, jusqu'alors peu connue, comme étant essentielle au développement cortical. Nous montrons que Kif21b régule la migration neuronale dans le cortex et identifions quatre variants chez des individus présentant des malformations neuro-développementales. Nous montrons que l'expression ectopique des variants chez la souris et le poisson zèbre récapitulent les phénotypes observés chez ces patients.

Mots-clés : Kif21b, développement cortical, migration neuronale, transport intracellulaire, kinésine, microtubules.

Résumé en anglais

The development of the cerebral cortex is a highly regulated process that is crucial for the establishment of functional cortical networks. Disruption of one or several of these steps can lead severe neurodevelopmental disorders that are associated with intellectual disabilities, epilepsies and cognitive impairment. Over the past few years, several genetic mutations in genes encoding either tubulin or microtubule-associated motors such as kinesins, have been found in individuals with neurodevelopmental disorders. Although kinesins have been found to be essential for a proper cortical development, the exact functions of kinesins in these processes are still poorly understood. My work clearly identified Kif21b, a poorly-known kinesin, as a novel key regulator of cortical development both in mouse and human. We show that Kif21b regulates both radial and tangential migration of cortical neurons, and identify four KIF21B variants in individuals presenting neurodevelopmental disorders. We show that ectopic expression of variants recapitulate phenotypes both in mice and zebrafish.

Key words: Kif21b, cortical development, neuronal migration, intracellular transport, kinesin, microtubules.