



HAL
open science

Mécanismes moléculaires du contrôle de l'arborisation axonale par une régulation post-traductionnelle de la kinase LKB1

Audrey Garcia

► **To cite this version:**

Audrey Garcia. Mécanismes moléculaires du contrôle de l'arborisation axonale par une régulation post-traductionnelle de la kinase LKB1. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1265 . tel-03395871

HAL Id: tel-03395871

<https://theses.hal.science/tel-03395871v1>

Submitted on 22 Oct 2021

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.



N°d'ordre NNT :
2020LYSE1265

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale 340
(Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire)

Spécialité de doctorat : Biologie

Soutenue publiquement le 15/12/2020, par :

Audrey GARCIA

Mécanismes moléculaires du contrôle de l'arborisation axonale par une régulation post-traductionnelle de la kinase LKB1

Devant le jury composé de :

KRETZ-REMY, Carole	Professeure des Universités, Université Lyon 1	Présidente
HUMBERT, Sandrine	Directrice de Recherche, INSERM	Rapporteuse
MIROUSE, Vincent	Directeur de Recherche, CNRS	Rapporteur
GOILLOT, Evelyne	Directrice de Recherche, CNRS	Examinatrice
NAWABI, Homaira	Chargée de Recherche, INSERM	Examinatrice
COURCHET, Julien	Chargé de Recherche, INSERM	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Ce manuscrit finalise trois années difficiles de doctorat et son écriture m'a permis de me remémorer tous les moments (bons comme mauvais) mais aussi toutes les personnes qui ont été là pour me soutenir de près ou de loin durant ces trois années.

Je tiens donc tout d'abord à remercier l'ensemble de mon jury de thèse le Dr. Evelyne Goillot, Dr. Sandrine Humbet, Pr. Carole Kretz-Rémy, Dr. Vincent Mirouse et Dr. Homaira Nawabi, pour avoir accepté de lire et d'évaluer mon manuscrit ainsi que ma soutenance.

Je tiens à remercier chaleureusement le Dr Julien Courchet sans qui, rien de tout cela n'aurait été possible, qui m'a accepté dans son équipe pour mon premier stage de master 1 et qui n'a cessé de m'encadrer depuis. Merci pour ton investissement, ta confiance et ta disponibilité. Enfin, merci de m'avoir tant appris au cours de toutes ces années, et merci d'avoir continué avec moi malgré tous les hauts et les bas.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de suivi de thèse le Dr. Homaira Nawabi et le Dr. Marie Paschaki qui m'ont suivi tout au long de ma thèse, soutenu et conseillé.

Ensuite évidemment, je remercie tous les membres de l'équipe : Evelyne, Géraldine, Marine, Salma et Sozerko. Sozerko, merci pour nos discussions philosophiques et scientifiques et bien sûr, pour les cookies ! Géraldine, merci d'avoir participé à mon projet, merci pour nos rigolades, nos cafés, de remplir mes tiroirs vides et ton soutien précieux. Salma, merci pour le sourire et le grain de folie que tu nous apportes quand tu es là, tu m'as permis de me changer les idées. Evelyne, merci d'avoir été là pour moi, merci pour tout ton soutien que ce soit technique, scientifique ou personnel, merci de m'avoir aidé à rédiger ce manuscrit, je ne suis pas sûre que je serai arrivée au bout sans toi. Marine, merci pour tout, je suis tellement reconnaissante que nous ayons commencé notre thèse en même temps, merci pour tous ces moments, et même si parfois j'ai été un peu difficile à vivre au quotidien, pour toi tout va toujours bien et je te remercie pour cela. Tu as réussi à apporter un peu de ton monde de Bisounours dans le mien.

Je souhaite ensuite remercier l'ensemble de l'INMG pour les nombreux échanges que j'ai pu avoir avec toutes les équipes, en salle culture comme en salle de convivialité.

Ma thèse m'a permis de rencontrer des personnes formidables que je tiens à remercier chaleureusement. Dounia, Marine, Nathalie, Sarah... que dire... Merci à vous quatre, merci pour tous ces moments, au labo comme en dehors. L'expérience aurait été complètement

différente sans vous. Merci pour votre soutien indéfectible, merci parce que même en confinement j'ai pu rigoler avec vous, merci pour vos rires, vos recettes, vos livres, vos cadeaux et bien plus encore. Merci d'avoir illuminer mes journées (et mêmes les pires !) avec vos sourires. Nous ne sommes plus juste des copines de labo nous sommes bien plus que ça...

Mes remerciements vont ensuite à mes nombreux amis :

La team Scandinavie : Anna, Manon, Tibo et Toto, merci d'être toujours là, merci pour ce voyage que nous avons fait au cours de ma thèse, c'est inoubliable. Merci pour les photos de Manon dans tous ces états (je pense à en faire un album d'ailleurs), merci pour tous vos GIF horribles qui m'ont permis de bien rire. Par contre, désolé, mais le plus beau c'est celui que j'ai fait d'Anna à sa crémaillère ! Merci à vous tous de m'avoir écouté me plaindre sans jamais râler et en prenant toujours mon parti ! Merci pour votre soutien ! Merci pour nos soirées passées (et futures). En bref, merci d'être vous, merci d'être là !

Charlène, merci d'être là depuis le début, merci pour tout ton soutien. Merci pour tout tes conseils professionnels comme personnels. Merci de m'avoir permis d'aller faire du sport pendant un certain moment même si parfois on parlait plus qu'on ne bougeait. Merci pour tous ces moments partager !

Manon, merci d'être là malgré la distance et malgré ta nouvelle vie de famille, merci pour tout ton soutien !

Matthieu, je suis extrêmement reconnaissante de t'avoir rencontré en licence, qui aurait cru qu'on serait là tous les deux en fin de thèse aujourd'hui ! Merci pour tout ! Merci pour toutes nos discussions, merci pour tous nos rires, nos enquêtes Sherlock, tous les bons moments qu'on a pu partager. Et évidemment merci pour ton soutien sans faille !

Enfin merci à mes "nouveaux" amis : Arnaud, Camille, Kevin, Marion et Yaya, je suis ravie de vous avoir rencontré, merci pour toutes ces soirées qui ont données un peu d'air frais dans mon monde scientifique.

Je tiens ensuite à remercier du fond du cœur toute ma famille qui m'a soutenu au cours de toutes mes études, mes parents pour tout ce qu'ils m'ont apporté, leur soutien, leur conseils et tant d'autres choses... Et merci papa d'avoir corrigé les fautes de ce manuscrit. Je remercie également mon frère et ma sœur, Jérémy et Chloé qui, malgré mes sautes d'humeur, me supporte (plus ou moins bien) dès que je rentre et sont toujours là en cas de besoin !

Pour finir, je tiens à remercier Antoine pour son soutien quotidien de jour comme de nuit. Merci d'être là, merci pour ta patience, ta bonne humeur, merci de me faire rire même quand ça ne va pas, merci pour ton écoute et bien plus encore. Merci pour tout !

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS	9
LISTE DES FIGURES	11
INTRODUCTION GÉNÉRALE	15
INTRODUCTION	17
I- MECANISMES MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DU DEVELOPPEMENT DES CIRCUITS CORTICAUX	17
A- <i>Organisation du cortex cérébral de la souris</i>	17
1) La composition du cortex.....	17
2) Structure et fonction du cortex.....	19
B- <i>Principales étapes du développement</i>	20
1) Naissance et migration des types cellulaires peuplant le cortex	20
a. Les neurones pyramidaux.....	20
i. Genèse des neurones	20
ii. La migration des neurones <i>in vivo</i>	21
b. Les interneurones	23
2) Polarisation des neurones pyramidaux.....	24
a. Les différentes étapes de la polarisation.....	24
b. Rôle de l'environnement dans la polarisation <i>in vivo</i>	26
c. Mécanismes cellulaires impliqués dans la polarité <i>in vitro</i>	27
3) Morphogénèse de l'axone et formation des réseaux corticaux	29
a. Mécanismes cellulaires de l'élongation axonale	29
b. Les étapes d'élongation et de branchement <i>in vivo</i>	30
c. Mécanismes cellulaires de la formation des branches collatérales.....	31
i. La formation des patchs d'actine et des filopodes.....	33
ii. Émergence des branches par invasion des microtubules	34
iii. La synthèse de protéines.....	37
d. Rôle des mitochondries dans le développement axonal	38
i. Distribution des mitochondries <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	39
ii. Rôle des mitochondries dans la morphogénèse axonale	41
C- <i>Les voies de signalisation impliquées dans le développement neuronal</i>	42
1) La signalisation de la polarité neuronale	43
a. Les facteurs extracellulaires	43
i. BDNF et NT-3.....	43
ii. La semaphorine 3A.....	44
iii. Les protéines de la famille du TGF- β	44
b. Les voies intracellulaires impliquées dans la polarité neuronale	45
i. Le complexe Par3-Par6-aPKC	45
ii. Shootin 1	46
iii. CRMP2.....	46
2) Les voies impliquées dans l'élongation axonale	47
a. La kinase AMPK.....	47
b. La voie PI3K-Akt-mTOR	48
c. Rôle des kinases du cycle cellulaire	49
3) Les voies impliquées dans le branchement axonal	50
a. Signalisation PI3K, PTEN et GSK3 β	50

b.	La signalisation des MAP kinases.....	51
c.	Les Rho GTPases	52
D-	<i>Rôle de l'activité neuronale pour la formation des circuits et conséquences physiopathologiques...</i>	53
1)	Activité neuronale et formation des circuits.....	53
2)	Conséquences physiopathologiques des défauts de branchement axonal	54
II-	Le BDNF.....	57
A-	<i>Historique.....</i>	57
B-	<i>Le BDNF : du gène à la protéine</i>	57
1)	Structure et expression du gène <i>Bdnf</i>	57
2)	Synthèse et maturation de la protéine	60
C-	<i>Les récepteurs au BDNF</i>	62
1)	Les récepteurs Trk (Tropomyosine Related Kinase).....	62
2)	Le récepteur p75 ^{NTR}	64
3)	Le récepteur TrkB : de l'expression membranaire à la signalisation.....	66
a.	Transport du récepteur à la membrane	66
b.	Régulation du transport à la membrane	66
c.	Endocytose des complexes BDNF-TrkB	67
D-	<i>La signalisation par le BDNF</i>	69
1)	Sécrétion du BDNF	69
2)	La signalisation neuronale du BDNF	71
a.	La signalisation pro-BDNF.....	72
b.	La signalisation BDNF mature	73
E-	<i>Régulation du métabolisme par le BDNF</i>	76
1)	Régulation du métabolisme des mitochondries	76
2)	Régulation du métabolisme du glucose.....	78
3)	Régulation du métabolisme des lipides	78
III-	LKB1	81
A-	<i>Historique et syndrome Peutz-Jeghers</i>	81
1)	Clinique du syndrome Peutz-Jeghers	81
2)	Fonctions et mutations de LKB1	82
B-	<i>Du gène à la protéine.....</i>	82
1)	Gène de LKB1.....	82
2)	Différentes isoformes de LKB1.....	83
3)	Localisation de la protéine LKB1	84
4)	Régulation post-traductionnelle de LKB1	87
a.	Les phosphorylations.....	88
b.	Farnésylation	90
c.	Acétylations	90
C-	<i>Fonctions de LKB1</i>	91
1)	LKB1 et cancer.....	91
2)	Régulation de l'AMPK.....	93
a.	Inhibition de l'anabolisme	93
b.	La stimulation des voies cataboliques	95
3)	Régulation des autres AMPK-RK	96

4) Rôle de la protéine LKB1 dans le développement neuronal	100
a. Morphologie axonale.....	100
b. Morphologie dendritique	102
OBJECTIFS ET PROBLEMATIQUE.....	105
RÉSULTATS	109
CONCLUSIONS ET DISCUSSION.....	167
RÉFÉRENCES	179
PUBLICATIONS ANNEXES	223

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A

ADF : Actin depolymerizing factor
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADP : Adenosine Diphosphate
AKT : protein kinase B
AMPK : AMP-activated Protein Kinase
APC : Adenomatous Polyposis Coli
aPKC : atypical Protein Kinase C
aRG : cellule gliale radiale apicale
ARN : Acide RiboNucléique
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
ARP2/3 : Actin Related Protein 2/3
ASD : Autism Spectrum Disorders
ATM : Ataxia-Telangiectasia-Mutated
ATP : Adenosine TriPhosphate

B

BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor

C

cAMP : Adenosine MonoPhosphate cyclique
Cdc42 : Cell Division Control protein 42
Cdk5 : Cyclin Dependent Kinase 5
cGMP : Guanosine MonoPhosphate cyclique
CNP : C-type Natriuretic Peptide
CREB : C-AMP Response Element-binding protein
CRMP2 : Collapsin Response Mediator Protein Family

D

DCX : Doublecortin

DIV : Days In Vitro

DRG : Dorsal Root Ganglion

E

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase

G

GABA : Acide γ -Aminobutyrique
GM130 : Golgi Matrix protein GM130
GPI : GlycosylPhosphatidyInositol
GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase 3
GTP : Guanosine TriPhosphate

H

Hsp/Hsc70 : Heat shock protein/Heat shock cognate 70 kDa protein
HSP90 : Heat shock protein 90

I

Ig : immunoglobulin
IP : progéniteur intermédiaire

J

JIP3 : JNK Interacting Protein
JNK : c-Jun N-terminal Kinases

K

KIF2A : Kinesin like protein 2A

L

LIP1 : LKB1-interacting protein 1
LKB1 : Liver Kinase B 1

LTD : Long Term Depression
LTP : Long Term Potentiation

M

MAP : Microtubule Associated Protein
MAP1B : Microtubule Associated-Protein 1B
MAP2 : Microtubule Associated-Protein 2
MARK : MAP/microtubule Affinity-Regulating Kinase
MT : microtubules
mTOR : Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase

N

NEC : cellule neuro-épithéliale
NF κ B : Nuclear Factor Kappa B Subunit 1
NgCAM : Neuron-glia cell adhesion molecule
NGF : Nerve Growth Factor
NMDA : N-methyl-D-aspartate receptor
NT-3 : NeuroTrophic factor 3
NUAK1 : NUAKE Family kinase 1

P

p75^{NTR}: NeuroTrophine Receptor
PDK1 : Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1
PDK2 : Pyruvate Dehydrogenase Kinase 2
PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase
PIP2 : Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate
PIP3 : Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PJS : Peutz-Jeghers Syndrom
PKA : Protein kinase A
PKC : protein kinase C
PRG2 : Bone marrow proteoglycan

10

PSD-95 : postsynaptic density protein 95
PTEN : Phosphatase and tensin homolog
PV : parvalbumine

S

SAD : Synapses of Amphids Defective
SIK : Salt Induced Kinase
SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment Protein Receptor
SNPH : Synthaphilin
SNRK : Sucrose nonfermenting 1-related kinase
SorCS2 : Sortilin Related VPS10 Domain Containing Receptor 2
STRAD : STE20 Related Adaptor
STT : Somatostatine
SVZ : Zone Sous-ventriculaire

T

TrkB : Tropomyosin Receptor Kinase B
TSC2 : Tuberous Sclerosis Complex 2

U

UTR : Untranslated Region

V

VASP : Vasodilator-stimulated Phosphoprotein
VIP : Peptide Intestinal Vaso-actif
VZ : Zone Ventriculaire

W

WASP : Wiskott–Aldrich Syndrome Protein
WAVE1 : WASP-family Verprolin Homologous Protein

LISTE DES FIGURES

- **Figure 1** : Représentation schématique de la composition cellulaire du cortex
- **Figure 2** : Représentation schématique des divers interneurons présents dans le cortex
- **Figure 3** : Représentation schématique de la structure du cortex
- **Figure 4** : Schéma des deux modes de migration des neurones pyramidaux
- **Figure 5** : Représentation schématique du développement cortical
- **Figure 6** : Représentation schématique des étapes de développement des neurones pyramidaux *in vitro* et *in vivo*
- **Figure 7** : Représentation schématique des étapes de croissance et de branchement des neurones pyramidaux de la couche III *in vivo*
- **Figure 8** : Représentation schématique des différents modes de formation de branches
- **Figure 9** : Représentation schématique de la dynamique de l'actine
- **Figure 10** : Représentation schématique de la dynamique des microtubules
- **Figure 11** : Représentation schématique du développement d'une branche axonale et sa régulation par le cytosquelette
- **Figure 12** : Représentation schématique du système de mouvement des mitochondries
- **Figure 13** : Représentation schématique de la régulation de la croissance et du branchement par les phosphatidyl-inositol
- **Figure 14** : Représentation schématique de la régulation de l'élongation par la kinase PI3K
- **Figure 15** : Régulation de l'élongation axonale par Cdk5
- **Figure 16** : Structure du gène BDNF et représentation schématique des zones d'expression des ARNm messagers de BDNF en fonction des différents promoteurs
- **Figure 17** : Schéma des zones d'expression des ARNm messagers de BDNF en fonction de la longueur des régions 3'UTR
- **Figure 18** : Représentation schématique de la maturation du BDNF
- **Figure 19** : Schéma des différentes isoformes du récepteur TrkB et du récepteur p75NTR
- **Figure 20** : Représentation schématique de la fixation des différentes formes du BDNF sur leurs récepteurs
- **Figure 21** : Schéma de l'activation des récepteurs TrkB par deux modes d'exposition au BDNF : aiguë ou graduelle
- **Figure 22** : Représentation schématique de la signalisation induite par le pro-BDNF sur le récepteur p75NTR
- **Figure 23** : Schéma représentant la signalisation induite par le BDNF sur le récepteur TrkB
- **Figure 24** : Schéma représentant la régulation des mitochondries par le BDNF

- **Figure 25** : Caractéristiques phénotypiques de patients atteints par le syndrome Peutz-Jeghers
- **Figure 26** : Représentation des différentes formes de LKB1
- **Figure 27** : Représentation des différentes zones d'expression de LKB1 à l'état embryonnaire et adulte
- **Figure 28** : Représentation du mécanisme d'export de LKB1 du noyau
- **Figure 29** : Mécanismes de régulation de la localisation intracellulaire de LKB1
- **Figure 30** : Représentation des différentes modifications post-traductionnelles de LKB1
- **Figure 31** : Représentation schématique des différents processus régulés par LKB1 dans sa fonction de suppresseur de tumeur
- **Figure 32** : Représentation des fonctions de l'AMPK permises par la phosphorylation de LKB1
- **Figure 33** : Représentation des fonctions des différentes kinases de la famille de l'AMPK activées par LKB1
- **Figure 34** : Polarisation de l'axone par LKB1
- **Figure 35** : Différents rôles de LKB1 dans le développement neuronal
- **Figure 36** : Représentation schématique de la régulation de la phosphorylation de LKB1 sur le site S431
- **Figure 37** : Représentation schématique des deux hypothèses concernant les populations de neurones électroporés
- **Figure 38** : Schéma bilan de la régulation du branchement contralatéral des neurones corticaux des couches II/III

INTRODUCTION

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les réseaux neuronaux du cortex sont mis en place durant le développement cortical. L'unité de base de ces réseaux est le neurone, qui possède une morphologie particulière acquise au cours du développement. Les neurones sont des cellules polarisées avec un corps cellulaire et un axone unique et ramifié. L'acquisition de cette morphologie fait entrer en jeu de nombreux processus finement régulés comme le remodelage du cytosquelette ou encore la synthèse de protéines et lipides. Ces processus sont régulés par des voies de signalisation intracellulaires qui sont activées par des facteurs extracellulaires. Les branches axonales sont définies comme des ramifications de l'axone composées d'actine et de microtubules et mesurant au moins 5µm. Les branches axonales permettent la connectivité neuronale et des défauts de connectivités peuvent mener à des pathologies neuro-développementales (Fernandez et al., 2019). Au cours de ma thèse je me suis donc intéressée à l'acquisition d'une caractéristique morphologique des neurones : la formation de **branches axonales**.

Pour cela, j'ai porté plus particulièrement mon attention sur la kinase **LKB1**. C'est une kinase codée par un gène suppresseur de tumeur qui est impliquée dans la régulation de la morphologie neuronale par la régulation de kinases de la famille de l'AMPK (Kuwako and Okano, 2018a). En particulier, elle est impliquée dans la polarité neuronale par la régulation des kinases SAD A/B (Shelly et al., 2007 ; Barnes et al., 2007), le branchement axonal par l'activation de la kinase NUAK1 (Courchet et al., 2013) et le développement dendritique par les kinases SIK (Kuwako and Okano, 2018b). Cependant les mécanismes permettant la régulation de la kinase LKB1 dans ces différents processus sont peu connus. Un facteur extracellulaire : la neurotrophine **BDNF**, permet la phosphorylation de la kinase LKB1 sur le site S431 et cette phosphorylation est nécessaire pour la régulation des SAD par LKB1 lors de la polarité neuronale (Shelly et al., 2007). De plus, le BDNF est lui aussi impliqué dans le développement des branches axonales *in vitro* et *in vivo* (Cheng et al., 2011 ; Cohen-Cory, 1999 ; Cohen-Cory and Fraser 1995 ; Jeanneteau et al., 2010). Afin de comprendre les mécanismes permettant la régulation de LKB1 dans un contexte de branchement axonal, nous avons réalisé une approche candidat, avec l'hypothèse que le BDNF induit la phosphorylation du site S431 afin de réguler le branchement axonal par la voie LKB1/NUAK1.

L'introduction de cette thèse se divise en trois grandes parties, dans la première partie je vais présenter les différentes étapes permettant le développement cortical et les processus moléculaires et cellulaires mis en place durant ce développement. Dans la deuxième partie je vais détailler les mécanismes moléculaires induits par la fixation du BDNF sur son récepteur TrkB. Enfin, dans la dernière partie je vais entrer dans les détails moléculaires et les différentes fonctions de la kinase LKB1, qui est au cœur de ma thèse.

Introduction

I- Mécanismes moléculaires et cellulaires du développement des circuits corticaux

Le néocortex est une structure cérébrale connue pour être le siège des fonctions cognitives supérieures comme le langage ou la mémoire. Le cortex cérébral est constitué de différentes aires. Il existe trois grands types d'aires corticales, les aires motrices, sensorielles et associatives qui permettent des fonctions distinctes (Jabaudon, 2017) (**Figure 3A**). Korbinian Brodmann a décrit les différences histologiques de chaque aire corticale et permet ainsi d'aboutir à la classification des aires de Brodmann (Zilles and Amunts, 2010). De plus, chaque aire corticale est interconnectée avec le thalamus. Les neurones des aires corticales frontales sont connectés avec des neurones thalamiques rostraux impliqués dans la planification et l'exécution des mouvements moteurs volontaires (Jabaudon, 2017).

A- Organisation du cortex cérébral de la souris

1) La composition du cortex

Le cortex est composé de deux grands types cellulaires, les neurones corticaux et les cellules gliales tous deux composés de sous types cellulaires. Les cellules gliales comprennent les astrocytes qui interagissent avec la grande majorité des cellules nerveuses, régulent la formation des synapses et constituent un support métabolique ; la microglie qui sont les cellules immunitaires du cerveau et les oligodendrocytes qui produisent la gaine de myéline entourant les axones dans la matière grise (Allen and Lyons, 2018) (**Figure 1**). Les neurones corticaux et les cellules gliales du cortex proviennent majoritairement d'un seul type cellulaire ; les cellules radiales gliales (**Figure 1**).

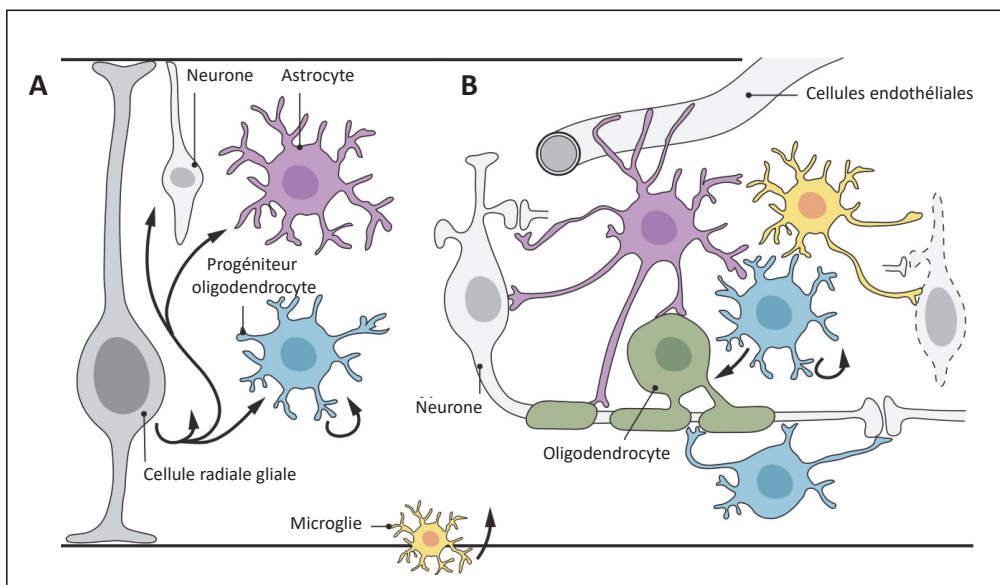


Figure 1: Représentation schématique de la composition cellulaire du cortex. A. L'ensemble des cellules neuronales proviennent d'un progéniteur commun : la cellule radiale gliale. **B.** Les cellules provenant de ce progéniteur forme ensuite un ensemble complexe dans le cortex. Les cellules gliales (microglie, oligodendrocyte, astrocyte) servent de support aux neurones. (Adapté de Allen and Lyons, 2018)

Le cortex présente deux types de neurones, les neurones pyramidaux et les interneurones. Les neurones pyramidaux représentent la majorité des neurones du cortex, et sont des neurones glutamatergiques excitateurs qui permettent les connexions corticales. Les interneurones sont majoritairement inhibiteurs et GABAergiques, ils possèdent des axones courts mais jouent un rôle pivot dans la propagation des signaux corticaux par inhibition locale permettant de réguler les réponses des neurones pyramidaux (Faux et al., 2012; Wamsley and Fishell, 2017). Il existe quatre types d'interneurones qui se caractérisent par l'expression de marqueurs moléculaires spécifiques : parvalbumine (PV), somatostatine (SST), peptide intestinal vasoactif (VIP) et reeline. En fonction du type de marqueur exprimé, les interneurones ont des cibles synaptiques différentes. Chaque type d'interneurone peut être subdivisé en sous-catégories dépendantes de leur spécificité synaptique. En effet, les interneurones exprimant la parvalbumine, la somatostatine ainsi que la reeline possèdent des contacts synaptiques directement sur le neurone glutamatergique et interagissent sur différentes parties du neurone pour permettre différentes connexions au neurone (**Figure 2**). Par exemple, les interneurones PV ciblent le compartiment somatique des neurones glutamatergiques et permettent l'inhibition des signaux provenant du thalamus (Wamsley and Fishell, 2017). Les interneurones VIP sont les seuls qui créent des contacts synaptiques avec les autres interneurones pour les inhiber (**Figure 2**).

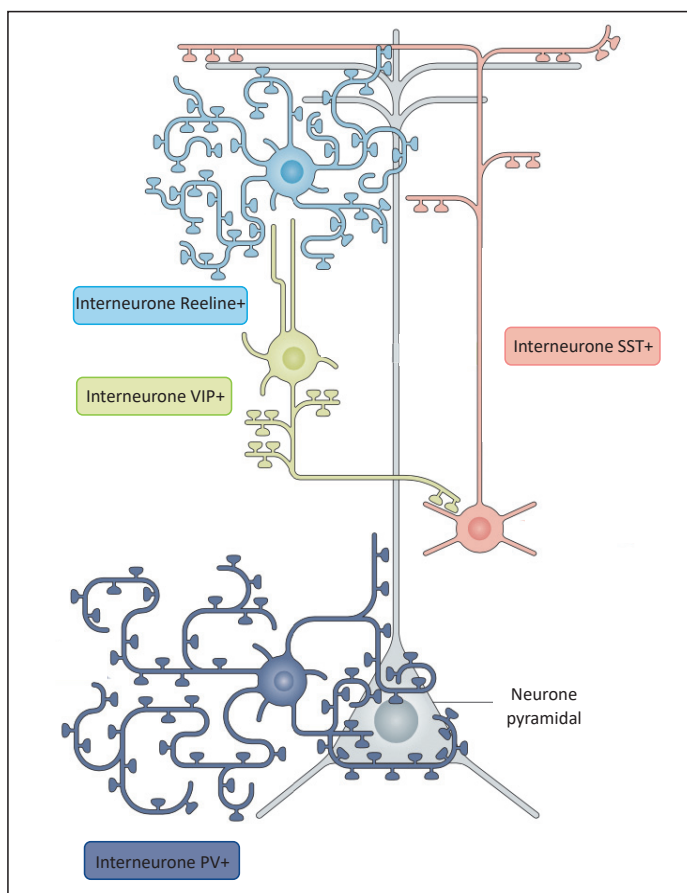


Figure 2: Représentation schématique des divers interneurones présents dans le cortex. Chaque type d'interneurone se lie spécifiquement à une partie d'un autre neurone. Les interneurones PV+ se connectent au corps cellulaire des neurones pyramidaux. Les interneurones Reeline+ et SST+ se connectent aux dendrites des neurones pyramidaux alors que les interneurones VIP+ inhibe l'activité des interneurones Reeline+ et SST+. (Adapté de Wamsley and Fishell, 2017)

2) Structure et fonction du cortex

Le cortex possède une organisation stratifiée, l'organisation en couche du cortex est définie par les différences morphologiques des neurones qui composent chaque couche (**Figure 3C**). Les neurones du cortex forment six couches horizontales (I à VI), la couche I étant la plus superficielle et la couche VI, la plus profonde.

Les neurones pyramidaux ou neurones de projection constituent 70 à 80% des neurones du cortex (Florio and Huttner, 2014). Les neurones de projections peuvent être classés en deux catégories ; les neurones de couches II/III et IV projettent au sein du cortex cérébral de façon intra ou inter-hémisphérique et jamais à l'extérieur (Molyneaux et al., 2007). Les neurones des couches V et VI en revanche, projettent à l'extérieur du cortex cérébral vers des structures sub-corticales comme la moelle épinière ou le thalamus ; ce sont des projections dites corticofugales (Molyneaux et al., 2007). Les neurones de projections sont nécessaires à la transmission de l'information entre les régions extra-corticales et corticales.

A l'âge adulte les neurones du cortex somato-sensoriel de la souris peuvent être classés selon leur caractéristique excitateur ou inhibiteur. Trois classes de neurones excitateurs ont été déterminées : 1) les neurones excitateurs supragranulaires sont tous des neurones pyramidaux et appartiennent aux couches II et III (Binzegger, 2004), 2) les neurones excitateurs de la couche IV qui forment le cortex somato-sensoriel associé aux vibrisses, segmenté par des agrégations de neurones et 3) les neurones excitateurs infragranulaires composant les couches les plus profondes : V et VI (**Figure 3B**).

Bien que les neurones excitateurs supragranulaires soient tous des neurones pyramidaux, la distinction entre les couches II et III est rendue difficile par la densité neuronale. Ce qui explique que de nombreuses études considèrent ces couches comme une seule, la couche II/III. La dendrite apicale des neurones pyramidaux de la couche II émerge du corps cellulaire proche de la couche I. Les neurones de la couche III peuvent se différencier de ceux de la couche II par la forte connectivité avec les couches IV et V (Bureau et al., 2006; Hooks et al., 2011).

Les interneurones composant le cortex ne possèdent pas de projection axonal, ils possèdent des axones courts qui ne sortent pas du cortex, afin de médier les réponses des neurones pyramidaux (Faux et al., 2012; Wamsley and Fishell, 2017).

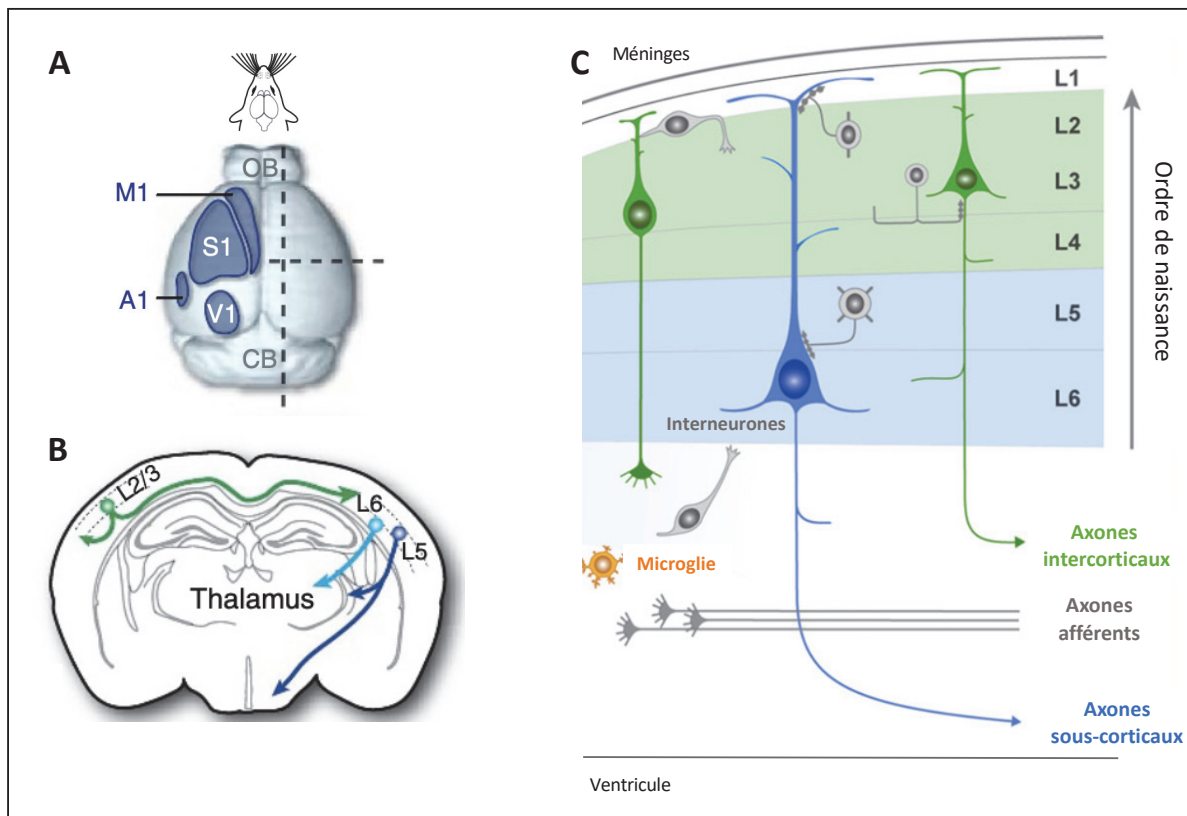


Figure 3 : Représentation schématique de la structure du cortex. **A.** Le cortex est formé de différentes aires corticales, les principales sont les aires primaires sensorielles (S1), primaires motrices (M1), primaires associatives (A1), et primaires visuelles (V1). **B-C.** Projections des neurones glutamatergiques des différentes couches du cortex. (Adapté de Jabaudon, 2017 ; Molnar et al., 2019)

B- Principales étapes du développement

1) Naissance et migration des types cellulaires peuplant le cortex

a. Les neurones pyramidaux

i. Genèse des neurones

Les neurones pyramidaux des différentes couches sont formés séquentiellement entre les stades embryonnaires E10.5 et E18 (embryon à 10.5 jours de gestation) chez la souris. Ils sont formés depuis la zone ventriculaire (VZ) (Molyneaux et al., 2007).

Les neurones corticaux glutamatergiques sont générés à partir de différents progéniteurs localisés dans la zone ventriculaire (Caviness et al., 1995) puis envahissent le cortex de l'intérieur vers l'extérieur ; c'est-à-dire que la couche la plus profonde (VI) est formée en première puis les autres couches se forment les unes après les autres au-dessus de la couche VI. C'est le moment de la naissance du neurone qui détermine la couche dans laquelle le neurone migre (**Figure 5**).

Dans la zone ventriculaire, les progéniteurs initiaux (cellules neuroépithéliales : NEC) s'auto-amplifient puis donnent naissance à d'autres progéniteurs : les cellules radiales gliales (RGC) qui permettent la formation des neurones. Le processus menant à la formation des neurones

est appelé neurogénèse. Il existe deux types de neurogénèse : la neurogénèse directe et la neurogénèse indirecte. Durant la neurogénèse indirecte, les RGC se divisent de façon symétrique ou asymétrique afin de donner naissance à des progéniteurs intermédiaires qui s'accumulent entre la VZ et la plaque corticale pour former la zone sub-ventriculaire (Pontious et al., 2008). Durant la neurogénèse directe, les RGC se divisent directement en neurones.

Les NECs sont les précurseurs de toutes les cellules neurales des mammifères. Ce sont des cellules cubiques formant un épithélium pseudostratifié qui s'allongent selon l'axe apico-basal durant la formation du tube neural (Huttner and Brand, 1997). Cette élongation leur procure une extension basale longue en contact avec la surface piaie et une extension apicale courte en contact avec le ventricule (Götz and Huttner, 2005). Les NEC composent la VZ et prolifèrent par des divisions symétriques qui permettent l'expansion latérale et radiale du néocortex. Elles peuvent aussi se diviser de façon asymétrique, dites divisions différenciatives, afin de former les cellules radiales gliales (**Figure 5**).

Les cellules radiales gliales (RGCs), issues de la division des NECs, possèdent un pôle apical au contact du ventricule par des jonctions adhérentes et, une extension basale contenant des microtubules et des filaments intermédiaires contrairement aux NECs. En outre, l'extension basale est en contact avec la surface piaie et permet aux neurones générés par la suite de migrer le long de cette extension (Kosodo and Huttner, 2009; Nadarajah and Parnavelas, 2002). Les RGCs, contrairement aux NECs, produisent plus de divisions asymétriques différenciatives que de divisions symétriques prolifératives (Noctor et al., 2004). Ainsi, lors de la division asymétrique, elles forment une cellule fille RGC et une cellule différenciée qui peut être un progéniteur intermédiaire (IP) (**Figure 5**). La division symétrique des IP donnent ensuite naissance aux neurones.

ii. La migration des neurones *in vivo*

Dans le cortex, la formation des différentes couches est permise par des vagues successives de migration ; vers E13 la migration neuronale sépare la "pre-plate" en deux et va former les zones marginale (=couche I) subventriculaire à proximité de la future couche VI.

Les neurones pyramidaux formés dans la VZ migrent radialement à travers la zone intermédiaire pour atteindre la plaque corticale et finissent leur migration sous la zone marginale. Au stade précoce, les neurones utilisent un mode de migration par translocation somatique et deviennent des cellules multipolaires c'est à dire qui possèdent plusieurs pôles représentés par des prolongements. Ces cellules subissent une migration dites multipolaire. Plus tard, les neurones deviennent bipolaires et entrent dans la plaque corticale où les neurones se dirigent par un mode de migration par locomotion vers la zone marginale (Noctor

et al., 2004). Pour finir les neurones se placent sous la zone marginale par un mode de migration dit translocation terminale.

La migration des neurones bipolaires par locomotion (**Figure 4**) a été proposée en 1972 par P. Rakic qui montre chez le singe, que tout le neurone est lié à une extension d'une cellule radiale gliale lors de sa migration (Rakic, 1972). Il propose donc que les neurones migrent le long des fibres de cellules radiales gliales. Ce phénomène a ensuite été observé sur des coupes corticales entre E13 et E14 lors de l'apparition de l'imagerie en temps réel (Nadarajah et al., 2001). Cette migration est irrégulière, lente (environ $30\mu\text{m}/\text{h}$) et le mouvement du soma ne se fait qu'à la fin de la migration, lorsqu'une extension formée par la cellule entre en contact avec la lame basale (Nadarajah et al., 2001).

Les migrations par translocation somatique et translocation terminale sont indépendantes des fibres des cellules radiales gliales. La migration par translocation somatique a été à nouveau observée par Nadarajah et al. (2001) qui montrent que les neurones forment de longues extensions pour se fixer à la surface du cortex et permettre la migration rapide (environ $60\mu\text{m}/\text{h}$) du soma vers la zone cible. Le deuxième type de migration indépendant des fibres des cellules radiales gliales est la translocation terminale lors des étapes tardives du développement cortical (Sekine et al., 2011). Ce mode de migration est mis en place après la migration par locomotion. Lors de ce processus seul le soma migre de façon rapide vers le haut de la plaque corticale (Sekine et al., 2011).

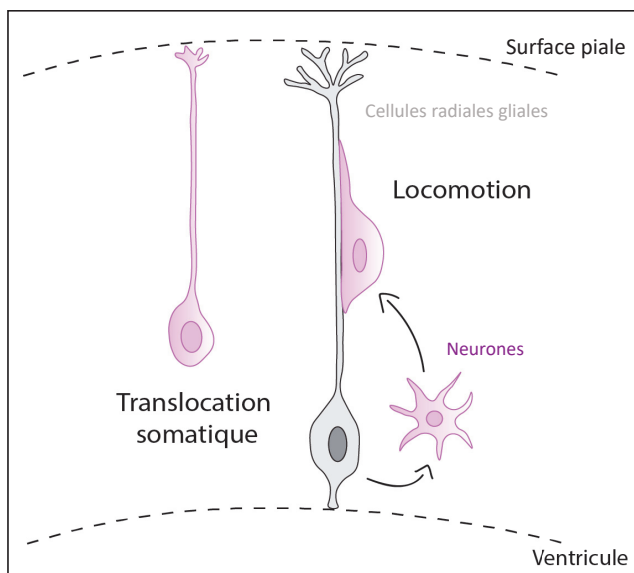


Figure 4 : Schéma des deux modes de migration des neurones pyramidaux. Les neurones pyramidaux migrent par translocation somatique (gauche) ou par locomotion grâce au soutien des cellules gliales radiales. (Adapté de Evsyukova et al., 2013)

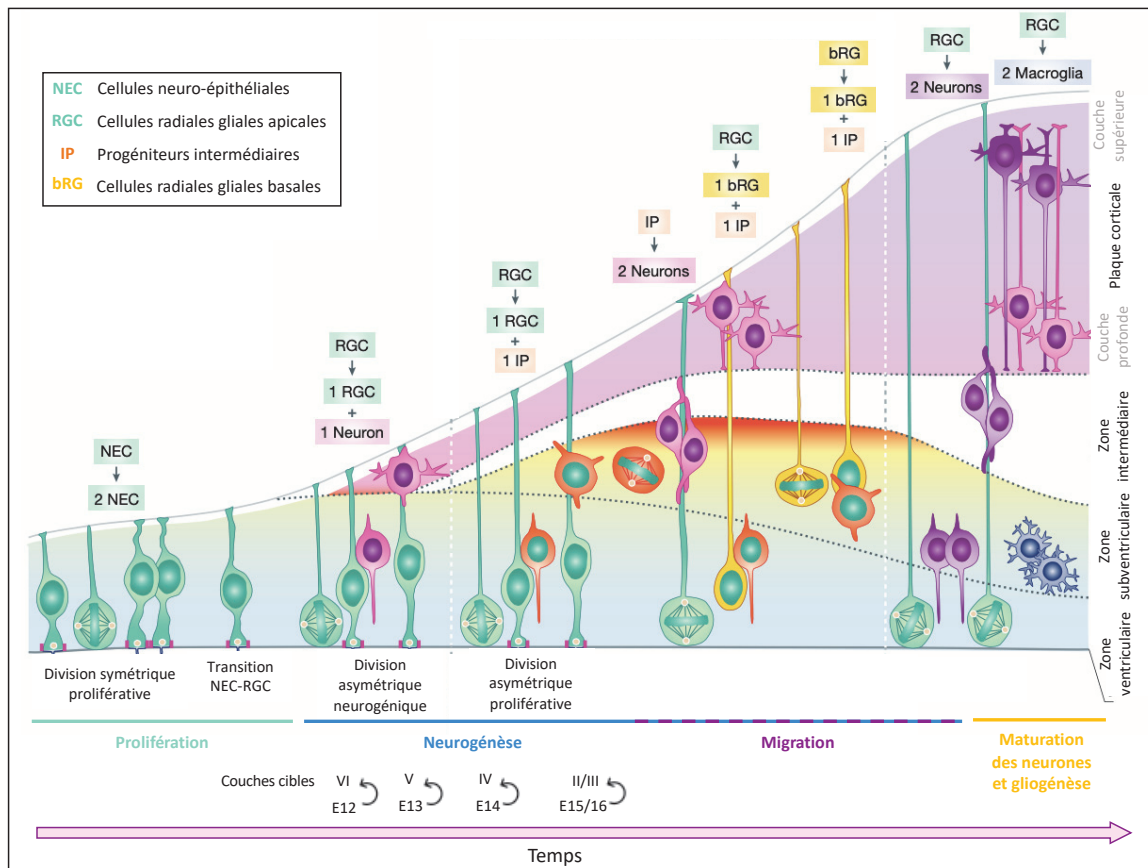


Figure 5 : Représentation schématique du développement cortical. Durant la phase de prolifération les NEC se multiplient avant de se différencier en RGC. Durant la neurogénèse, les RGC se divisent de façon asymétrique proliférative ou neurogénique et forment respectivement un progéniteur intermédiaire et un neurone. Une fois formés, les neurones migrent par locomotion ou par translocation somatique. Les neurones se positionnent ainsi dans les différentes couches en poursuivant leur maturation, en parallèle la gliogénèse débute. (Adapté de Paridaen and Huttner, 2014)

b. Les interneurones

Contrairement aux neurones glutamatergiques, les interneurones ne sont pas produits dans le cortex mais dans les éminences ganglionnaires et migrent tangentiellement, c'est-à-dire perpendiculairement à la migration radiale et parallèlement aux différentes couches du cortex. Les interneurones PV positifs et SST positifs sont générés dans l'éminence ganglionnaire médiane alors que les autres sont générés dans l'éminence ganglionnaire caudale (Rudy et al., 2011; Wonders and Anderson, 2006).

Ces neurones reçoivent des signaux extracellulaires qui vont induire leur migration. Won et al. (2013) a montré que les cellules endothéliales qui composent les vaisseaux sanguins sont capables de guider les interneurones vers leur destination. Il existe deux trajectoires pour la migration tangentielle : la première se fait depuis les éminences ganglionnaires médianes vers néocortex et l'hippocampe et la deuxième depuis les éminences ganglionnaires latérales jusqu'aux bulbes olfactifs. La migration des interneurones provenant des éminences caudales

est principalement guidée par des facteurs de transcription tels que COUP-TFI, COUP-TFII et SP8 (Alzu'bi et al., 2017a, 2017b).

Enfin, les interneurones interagissent avec les neurones pyramidaux lors de la migration neuronale. En effet, les neurones possèdent des récepteurs GABAergiques qui fixent l'acide γ -aminobutyrique (GABA), principal neurotransmetteur inhibiteur du cerveau adulte (Ben-Ari et al., 2007; Wang and Kriegstein, 2009). L'utilisation d'ARN interférents ciblant les récepteurs GABAergiques dans les neurones pyramidaux impacte la migration neuronale ainsi que la morphologie des neurones (Bony et al., 2013). C'est à dire que cela induit une augmentation de la croissance de l'axone alors que la croissance des dendrites diminue. L'utilisation d'antagonistes des récepteurs GABA induit une augmentation de cAMP. Ce qui montre que cAMP est régulée négativement par les récepteurs GABA. La molécule GABA étant principalement sécrétée par les interneurones, cette étude montre que les interneurones interagissent avec les neurones pyramidaux *via* leurs récepteurs GABA lors de la migration de ces derniers *via* l'inhibition de cAMP (Bony et al., 2013).

2) Polarisation des neurones pyramidaux

a. Les différentes étapes de la polarisation

La première étape de l'acquisition de la morphologie neuronale est la polarisation neuronale. La polarité neuronale est définie comme une asymétrie morphologique et moléculaire de la cellule. C'est à dire que les structures cellulaires sont orientées et possèdent un pôle basal et un pôle apical qui n'ont pas la même structure. La morphologie atypique des neurones, qui possèdent un axone long et de multiples dendrites autour du corps cellulaire, reflète cette asymétrie. La migration des neurones pyramidaux est accompagnée de la polarisation de ces derniers puisque les neurones passent de multipolaires à bipolaires avant d'entrer dans la plaque corticale (Tabata and Nakajima, 2003). Les neurones pyramidaux acquièrent leur polarité finale avec l'émergence d'extensions principale et secondaire pendant la migration (Barnes and Polleux, 2009). L'extension principale correspondant à la future dendrite principale est au pôle basal alors que l'extension secondaire qui formera le futur axone est situé du côté apical.

Des études considérables, réalisées dans les neurones de l'hippocampe (Dotti and Banker, 1987; Dotti et al., 1988; Goslin and Banker, 1989), ont permis de définir les différentes étapes du développement neuronal correspondant à l'acquisition de leur morphologie. Il y a cinq étapes dans la formation des neurones *in vitro* qui sont basées sur la morphologie (**Figure 6A**) : le premier stade cellulaire consiste en une cellule en forme de lamellipode avec protrusion de multiples filopodes, au deuxième stade entre 1-2DIV (DIV : Days *in vitro*), la cellule forme de multiples neurites immatures, toutes équivalentes les unes aux autres et poussant de façon aléatoire. Au stade 3, une neurite s'allonge au détriment des autres pour se spécialiser et

devenir l'axone entre 2 et 4DIV, c'est l'étape de spécification de l'axone : dites polarisation neuronale. Durant le quatrième stade entre 4 et 15DIV, l'axone croît et les branches axonales se forment. Enfin, le stade 5 entre 15 et 25 DIV correspond à la formation d'épines dendritiques et de contacts synaptiques.

Cependant, ces différentes étapes ont été observées *in vitro*. Il est important de noter que la plupart des neurones mis en culture étaient polarisés au moment de leur dissociation (E15.5). Ainsi, l'observation de culture *in vitro* ne correspond pas réellement à la première polarisation des neurones mais correspond donc plutôt à une deuxième polarisation du neurone. Ces cultures restent un bon modèle pour l'étude du développement des neurones puisque parmi ces cinq étapes, seul le premier stade n'est pas observé *in vivo* (Polleux and Snider, 2010). Après division de la cellule, les neurones présentent de multiples neurites immatures puis deux neurites se différencient en extensions principale et secondaire qui deviennent respectivement la dendrite principale et l'axone. La polarisation des neurones pyramidaux s'effectue au début leur migration, à contrario des étapes de formation de branches axonales, d'épines dendritiques et de contacts synaptiques qui se déroulent une fois le neurone correctement positionné (**Figure 6B**).

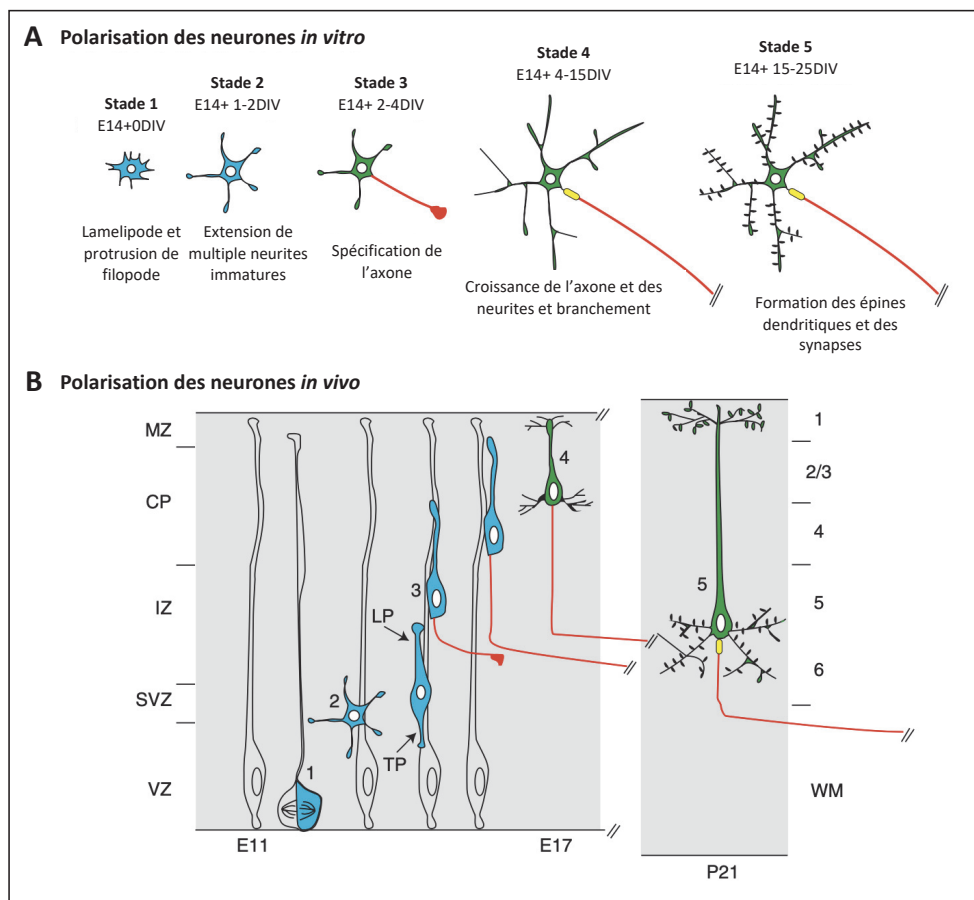


Figure 6 : Représentation schématique des étapes de développement des neurones pyramidaux *in vitro* et *in vivo*. A. La polarisation des neurones *in vitro* se déroule en 5 étapes et excepté la 1ere étape, toutes les étapes sont retrouvées *in vivo* (TP : trailing process, LP : leading process) (Polleux and Snider 2010)

b. Rôle de l'environnement dans la polarisation *in vivo*

Durant la polarisation, les neurones sont localisés dans un environnement contenant de nombreux facteurs extracellulaires. Ces facteurs, tels que les neurotrophines (NT-3 et BDNF), les molécules d'adhésions (NgCam, N-cadhérine, TAG-1) ou encore les facteurs de croissance (IGF-1, TGF- β) régulent la polarisation de l'axone.

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle des neurotrophines dans la polarité (Cheng et al., 2011b; Nakamuta et al., 2011; Shelly et al., 2007). BDNF et NT-3 sont toutes les deux fortement exprimées au cours du développement du cerveau. Une diminution de l'expression de leur récepteurs : TrkB et TrkC induit dans les deux cas la transition entre cellules multipolaires et cellules bipolaires *in vivo* (Nakamuta et al., 2011). Les voies de signalisations activées par le BDNF lors de sa fixation sur son récepteur, ainsi que leur effet moléculaire permettant la régulation de la polarité seront abordées dans un prochain paragraphe.

Plus récemment, des études ont montré que différents facteurs de croissance étaient impliqués dans la polarisation axonale. Une diminution de l'expression du récepteur à IGF-1 inhibe également la transition multipolaire-bipolaire et la migration neuronale (Nieto Guil et al., 2017). L'implication de TGF β a été mise en évidence par déplétion de son récepteur TGF β -R2 qui induit une perte de la formation des axones (Yi et al., 2010).

Le rôle de la molécule d'adhésion cellulaire NgCam dans la polarisation a été découvert dans des neurones de l'hippocampe. Ils ont été cultivés sur des lamelles recouvertes alternativement avec des stries contenant du NgCam ou de la laminine (Esch et al., 1999). Les auteurs ont ainsi pu observer que lorsque le corps cellulaire est sur une strie de NgCam, alors la neurite qui entre en contact avec la laminine devient l'axone et inversement ; si le corps cellulaire est situé sur de la laminine la neurite qui entre en contact avec NgCam deviendra l'axone. Cela suggère que le passage d'un substrat promouvant l'axone à un autre est un signal suffisant pour initier l'axone (Esch et al., 1999). De plus, la molécule NgCam est une molécule d'adhésion neurone-glie ainsi, cette découverte met en avant la nécessité de l'interaction neurones-glies dans le cerveau. Plus récemment, la molécule d'adhésion N-cadhérine a été identifiée comme déterminante dans la polarisation des neurones. Elle s'accumule dans la région supérieure de la zone intermédiaire et permet l'interaction entre les cellules radiales gliales et les neurones (Xu et al., 2015). Une inhibition de la N-cadhérine induit une perte de la polarité axone-dendrite et une inhibition de la migration neuronale *in vivo* (Gärtner et al., 2012; Jossin and Cooper, 2011; Xu et al., 2015).

Ainsi l'ensemble de ces résultats montre que l'environnement des neurones est en partie responsable de la régulation de la polarité axone-dendrite lors du développement cortical.

c. Mécanismes cellulaires impliqués dans la polarité *in vitro*

La polarité cellulaire n'est pas un processus unique aux neurones, de nombreux types cellulaires acquièrent une polarité tel que les cellules épithéliales, ou encore les cellules souches en division. Ainsi, de nombreux processus permettant d'aboutir à une cellule polarisées sont partagés par les différents types cellulaires.

La fonction neuronale nécessite une morphologie unique avec de multiples dendrites et un axone unique ayant des fonctions différentes. Afin de permettre ces fonctions, l'axone et les dendrites diffèrent par leur morphologie, leur organisation du cytosquelette, leur composition moléculaire ou encore leur composition membranaire. La première étape de l'acquisition de la polarité est la formation d'un axone qui nécessite un remodelage du cytosquelette.

Durant la polarisation, de nombreuses voies de signalisation et protéines liées à l'actine régulent l'organisation du cytosquelette d'actine. La première étude impliquant l'actine dans le processus de polarisation des neurones a été effectuée en 1999 et montre qu'une déstabilisation de l'actine par des drogues telles que la latrunculine B ou encore la cytochalasine D, induit la formation de multiples axones et donc une perte de la polarité (Bradke and Dotti, 1999). De plus, l'exposition à la cytochalasine D d'une neurite induit sa différenciation en axone. En outre, même une fois l'axone formé (stade 3), une exposition d'une autre neurite à un depolymérisateur de l'actine induit sa différenciation en axone. Ces résultats indiquent que le devenir axone ou dendrite est plastique et régulé par la dynamique de l'actine. Un régulateur majeur de l'actine est le complexe ADF/cofiline. En effet, une diminution de l'expression de ces deux protéines inhibe la croissance des neurites *in vitro* et *in vivo* (Flynn et al., 2012). La cofiline est aussi régulée par Cdc42, une petite GTPase. Dans les mutants possédant une diminution de l'expression Cdc42, la cofiline est inactive dans le cône de croissance et une dépolymérisation de l'actine dans ces conditions induit une restauration du phénotype de l'axone (Garvalov et al., 2007). Ces résultats suggèrent que Cdc42 promeut la formation de l'axone par la régulation de la cofiline. Les vagues d'actine sont des structures ressemblant à des cônes de croissance qui proviennent du corps cellulaire et se déplacent le long des neurites. Elles permettent le transport de l'actine et de ses régulateurs. Ainsi, il a été montré que les vagues d'actine sont plus fréquentes dans la neurite qui se spécialisera en axone (Flynn et al., 2009).

Un deuxième composant du cytosquelette, le réseau de microtubules, est lui aussi impliqué dans l'initiation de l'axone. En effet, la présence de protéines associées aux microtubules, différentes entre l'axone et les dendrites (MAP2 pour le compartiment somato-dendritique et Tau enrichi dans l'axone (Conde and Cáceres, 2009)) suggère que les microtubules sont fortement impliqués dans la polarisation. En outre, on peut observer la présence du moteur moléculaire : kinésine 1 dès le stade 2 de la formation des neurones où elle s'accumule dans

le futur axone (Twelvetrees et al., 2016). La relocalisation de la dynéine dans le futur axone est régulée par la kinésine 1 (Twelvetrees et al., 2016).

L'importance de la dynamique des microtubules a été démontrée par l'utilisation de drogues qui stabilisent (Taxol) ou déstabilisent (Nocodasol) spécifiquement les microtubules. Leur utilisation induit une inhibition de la formation de l'axone (Letourneau and Ressler, 1984; Tanaka et al., 1995) montrant ainsi la nécessité de la dynamique des microtubules. Enfin, une stabilisation partielle des microtubules par le taxol induit la formation de l'axone (Witte et al., 2008). Toutefois, cet effet peut être inhibé par une diminution de l'expression de MAP6 qui, spécifiquement exprimé dans le cerveau, contribue à la stabilité des microtubules (Tortosa et al., 2017). Les MAPs les plus abondantes dans le cerveau : MAP1B, MAP2 et Tau contribuent à la polarisation des neurones par la stabilisation des microtubules et en permettant l'interaction avec d'autres protéines associés aux microtubules. L'absence de MAP1B diminue le développement axonal et la polymérisation des microtubules (Gonzalez-Billault et al., 2001) alors qu'un défaut de Tau ou MAP2 n'a pas d'effet (Takei et al., 2000; Teng et al., 2001). Ceci s'explique par le fait que MAP1B agit de façon synergique avec Tau et MAP2. Lorsque MAP1B est absent, un défaut de MAP2 induit des conséquences plus fortes dans les dendrites. Un défaut de Tau lui induit des conséquences plus importantes dans l'axone comme une diminution du corps calleux (Takei et al., 2000).

La protéine APC est une protéine qui se lie au réseau de microtubules au niveau des extrémités positives des microtubules. Cette protéine est enrichie dans la neurite qui deviendra l'axone (Shi et al., 2004). Phosphorylée par GSK3 β , APC induit alors une diminution de son affinité avec la protéine EB1 qui lui permet de se lier aux microtubules. Enfin une inhibition de GSK3 β induit une accumulation d'APC dans plusieurs neurites (Shi et al., 2004) démontrant ainsi l'importance des microtubules pour l'initiation de l'axone *via* la protéine APC et sa phosphorylation par GSK3 β .

Un deuxième phénomène important pour la polarisation de l'axone est la localisation d'organelles comme l'appareil de Golgi et le centrosome. Les centrosomes sont placés de façon asymétrique lors de la division cellulaire. Dans les neurones corticaux, le centrosome subit des translocations successives. D'abord situé du côté apical, le centrosome migre vers l'extension arrière proche, du futur axone, pour finalement subir une dernière translocation vers l'extension principale qui formera la dendrite principale ; ce phénomène est appelé nucléokinèse (Tsai and Gleeson, 2005). Ainsi la régulation de la localisation du centrosome permet de réguler la polarité axone-dendrite.

De plus, l'appareil de Golgi et le centrosome se rassemblent dans le soma du côté de la première dendrite formée, c'est-à-dire, du côté opposé au dernier plan de division mitotique (de Anda et al., 2005). C'est la proximité de ces deux organelles qui détermine la spécification d'une neurite en axone. L'hypothèse est que la présence de l'appareil de Golgi à proximité de

la dendrite proximale permet d'avoir une source de membrane et de microtubules proche du cône de croissance (de Anda et al., 2010; Efimov et al., 2007). Ainsi, la polarité de ces organelles est nécessaire pour la polarité des neurones.

3) Morphogénèse de l'axone et formation des réseaux corticaux

a. Mécanismes cellulaires de l'élongation axonale

Le développement axonal est divisé en différentes étapes : la spécification de l'axone avec la mise en place de la polarité vu dans le paragraphe précédent, la croissance axonale, le branchement des axones et pour finir le raffinement des circuits avec des processus de formation et d'élimination des synapses. Dans ce paragraphe je vais présenter plus particulièrement la croissance de l'axone.

La croissance de l'axone est dirigée par la dynamique du cytosquelette. L'élongation de l'axone est rendue possible par deux processus exerçant des forces opposées sur le cône de croissance : 1) le transport axonal lent et la polymérisation des microtubules créant une force de poussée sur l'axone, 2) le flux rétrograde d'actine créant une force de traction à l'extrémité du cône de croissance (Letourneau et al., 1987).

La première étude démontrant le rôle du cytosquelette dans l'élongation axonal montre, par l'utilisation de cytochalasine D et colchicine, que les deux composants du cytosquelette : l'actine et les microtubules sont nécessaires à la croissance (Yamada et al., 1970). Plus tard, l'imagerie à permis de découvrir les principes généraux de leur assemblage durant la croissance axonale (Omotade et al., 2017; Pacheco and Gallo, 2016). La régulation du cytosquelette est permise par l'activité des protéines associées aux microtubules et aux filaments d'actine. Ces protéines doivent donc avoir un fonctionnement coordonné pour réguler l'élongation.

Récemment, il a été montré que la croissance de l'axone en 2D diffère de la croissance en 3D d'un axone. En effet, dans les cultures en 3D qui se rapprochent davantage des phénomènes observés *in vivo*, le stade 1 (lamellipode) du développement neuronal est largement raccourci en temps par rapport aux cultures en 2D. Et plus de la moitié des neurones sont au stade 3 (polarisation) après 24h de culture, contrairement aux neurones cultivés en 2D où la polarisation de l'axone se déroule entre 2 et 4 jours après la mise en culture (Santos et al., 2020). En outre, la composition en actine et en microtubules du cône de croissance diffère entre les cultures 2D et 3D. La structure du cône de croissance est bien caractérisée. Il est composé d'un domaine central enrichi en microtubules et, en périphérie se trouvent des filopodes et lamellipodes enrichies en filaments d'actine. Ce sont des arcs d'acto-myosines qui permettent de faire la transition entre ces deux zones. Cependant, dans cette étude utilisant des cultures 3D, une nouvelle organisation a été observée. Les auteurs n'ont pas détecté de

zones périphériques et centrales distinctes, toutefois ils ont observé une structure riche en actine et en microtubules contenant des filopodes sans arc d'acto-myosine ni lamellipode (Santos et al., 2020). Enfin, cette étude montre que les neurones n'ont pas besoin de force de traction pour croître et que les cônes de croissance ne nécessitent pas de sites d'adhésion pour l'élongation de l'axone.

Ainsi, ces résultats montrent que les cultures classiques *in vitro* en 2D ne sont pas optimales pour comprendre au mieux la morphologie neuronale.

b. Les étapes d'élongation et de branchement *in vivo*

L'élongation des axones des neurones corticaux des couches II/III qui projettent dans l'hémisphère opposé se déroule selon une séquence ordonnée (**Figure 7**). Les étapes composant cette séquence se déroulent de façon post-natale, on observe au 1^{er} jour post-natal (P1) la migration des neurones des couches II/III dans les couches superficielles. La plupart des neurones achèvent cette migration autour de P3 et elle se termine complètement à P6 (Mizuno et al., 2007; Wang et al., 2007) (**Figure 7A**). Elle est suivie d'une élongation des axones callosaux, qui traversent la ligne médiane entre P3 et P5 (**Figure 7B-C**) puis les axones pénètrent dans la matière grise opposée entre P6 et P10 (**Figure 7D**) (Mizuno et al., 2007; Wang et al., 2007). Le branchement axonal a lieu de façon concomitante avec l'élongation des axones. L'arborisation axonale en couche V se déroule avant le passage de la ligne médiane (**Figure 7B-C**). Le branchement terminal en revanche s'effectue à la fin de l'envahissement de l'hémisphère opposé, à P10, les axones et les branches terminales sont entremêlés (**Figure 7E**) (Mizuno et al., 2007; Wang et al., 2007). Entre P10 et P13 on observe une spécification des branchements dépendante des différentes couches (**Figure 7F**). A P13 on observe un fort branchement terminal des couches I à III et des ramifications moins nombreuses en couche V, et le branchement continue à augmenter jusqu'à au moins P15 (Mizuno et al., 2007; Wang et al., 2007).

Afin d'apporter une meilleure compréhension du développement neuronal à une résolution neurone unique, une nouvelle méthode d'analyse des projections axonales a récemment été proposée et répertorie plus de mille neurones ainsi que leurs projections *in vivo* (Winnubst et al., 2019). Cette étude a permis le développement d'un site web nous permettant de rechercher un type de neurone et de pouvoir l'observer dans le cerveau entier <http://ml-neuronbrowser.janelia.org/>. Enfin la rapidité permise par cette technique (8h de reconstruction pour 1 neurone contre 4 mois par une méthode classique) permettra, à plus long terme, la reconstruction de l'ensemble des neurones du cerveau.

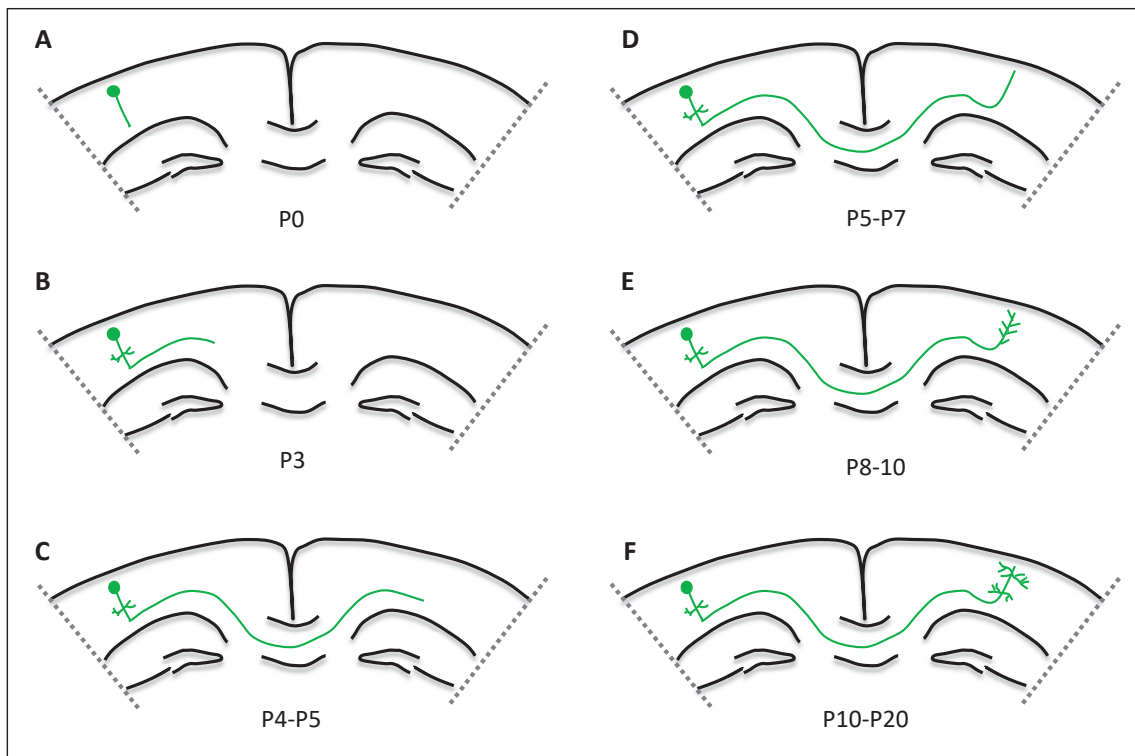


Figure 7 : Représentation schématique des étapes de croissance et de branchement des neurones pyramidaux de la couche III in vivo. Les neurones pyramidaux atteignent la couche III au stade P2 (A), s'ensuit une élongation de l'axone et une formation de branche en couche V (B). L'élongation se poursuit avec la traversée de la matière blanche (C) et la pénétration de la matière grise de l'hémisphère opposé (D). Le branchement terminal est d'abord aléatoire (E), puis se spécifie dans les couches II/III et V (F). (D'après Mizuno et.al, 2007, 2010 ; Wang et al., 2010)

c. Mécanismes cellulaires de la formation des branches collatérales

Suite à la croissance de l'axone, des ramifications se forment le long de l'axone, ces ramifications sont nommées branches collatérales. Une branche est une structure collatérale mesurant plus de $5\mu\text{m}$ composé d'actine et de microtubules (Kalil and Dent, 2014).

Lorsque celles-ci sont situées dans l'hémisphère opposé au corps cellulaire (contralatéral) comme c'est le cas des neurones des couches II/III, elles sont nommées branches terminales. Lorsque ces branches collatérales émergent directement depuis l'axone elle sont aussi appelées branches interstitielles (Schmidt and Rathjen, 2010).

La formation de branches axonales est mise en place par deux mécanismes : 1) la séparation du cône de croissance, 2) la formation de branches collatérales (Acebes and Ferrús, 2000).

La séparation du cône de croissance induit la formation de deux structures formant un "Y" ou un "T", ce qui permet de former des branches dans des cas spécifiques comme chez le poisson zèbre où la première branche formée par les axones des neurones moteurs est induite par bifurcation du cône de croissance (Sainath and Granato, 2013). Elles ont aussi été observées

chez la souris dans les neurones de la racine dorsale, qui effectuent cette séparation du cône de croissance à l'entrée de la moelle épinière (Schmidt et al., 2007).

Suite à la séparation du cône de croissance, les autres branches se forment par le mécanisme de branches collatérales. Le mode de formation de branches par séparation du cône de croissance n'est donc pas le mécanisme majoritaire ; c'est un mécanisme qui permet la formation d'une unique branche dans l'axone ce qui va permettre à l'axone de suivre deux routes différentes.

La formation de branches collatérales quant-à-elle peut être initiée par différents mécanismes : 1) la formation d'un lamellipode, 2) la formation d'un filopode, 3) la pause du cône de croissance (**Figure 8**) (Kalil and Dent, 2014). Dans le mécanisme de lamellipode, la branche émerge depuis un lamellipode formé à la base de l'axone et qui va migrer de façon antérograde le long de l'axone en formant des "vagues". Ce phénomène a été principalement observé *in vitro* et *in vivo* dans les neurones hippocampaux, et la branche qui émerge du lamellipode se forme là où la "vague" s'arrête (Flynn et al., 2009).

Dans le mécanisme de formation par filopode, la branche est initiée depuis une protrusion de l'axone puis se forme un filopode qui est ensuite stabilisé et mûri en branche (Ketschek and Gallo, 2010; Spillane et al., 2012).

Enfin, pour la formation de branches par pause du cône de croissance, la branche est formée depuis des sites de l'axone où le cône de croissance s'est arrêté. Lors de la croissance de l'axone, le cône de croissance peut effectuer des pauses qui laissent des "marques" le long de l'axone. Ces marques sont caractérisées par une activité persistante de protrusions d'actine, ce qui va permettre la formation de branches collatérales (Halloran and Kalil, 1994).

Dans tous les cas la formation des branches nécessite une régulation du cytosquelette avec la formation d'un patch d'actine et l'invasion des filopodes/lamellipodes par les microtubules.

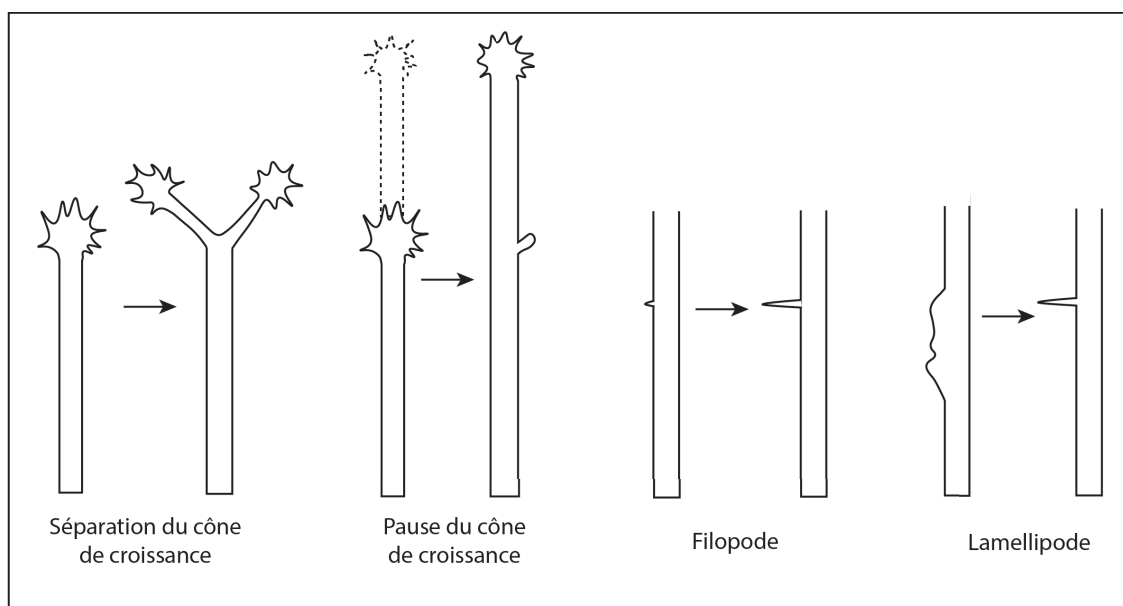


Figure 8 : Représentation schématique des différents modes de formation de branches. Quatre modes de formation de branches sont possibles : la séparation du cône de croissance qui donne une branche fille différente de la branche mère, la pause du cône de croissance qui laisse une "marque" pour la formation de filopode, la formation de filopode ou encore de lamellipode. (Adapté de Acebes et Ferrus, 2000)

i. La formation des patches d'actine et des filopodes

La première étape de la formation de branches implique les filaments d'actine et leur rôle dans la formation d'un filopode. Un filopode est une fine structure membranaire principalement composée de filaments d'actine parallèles les uns aux autres reliés par des protéines associées à l'actine.

L'actine est un polymère dynamique assemblé à partir de monomères d'actine G liés à l'ATP. Dans le cerveau, les isoformes majoritaires sont les isoformes β et γ . Une sous-unité d'actine est constituée d'une isoforme β et de deux isoformes γ , ce qui crée une asymétrie et une polarité. La polymérisation des filaments d'actine s'effectue au niveau de l'extrémité pointue (positive) (Coles and Bradke, 2015; Dent et al., 2011; Flynn, 2013) (**Figure 9**). Chaque isoforme est plus ou moins présente dans un compartiment donné (Moradi et al., 2017). L'actine α est globalement peu présente dans les motoneurones, alors que les isoformes β et γ sont fortement exprimées dans l'axone et le cône de croissance. Bien que ce soit l'isoforme la moins exprimée dans l'axone, l'isoforme α est localisée au point de branchement et son absence induit une diminution du branchement axonal *in vitro*. Les isoformes β et γ sont enrichies dans les filopodes et le cône de croissance (Moradi et al., 2017). Cependant, cette même étude montre que dans les neurones corticaux, l'actine α est beaucoup moins exprimée dans l'axone ce qui démontrant ainsi le rôle spécifique de chaque isoforme au type cellulaire étudié.

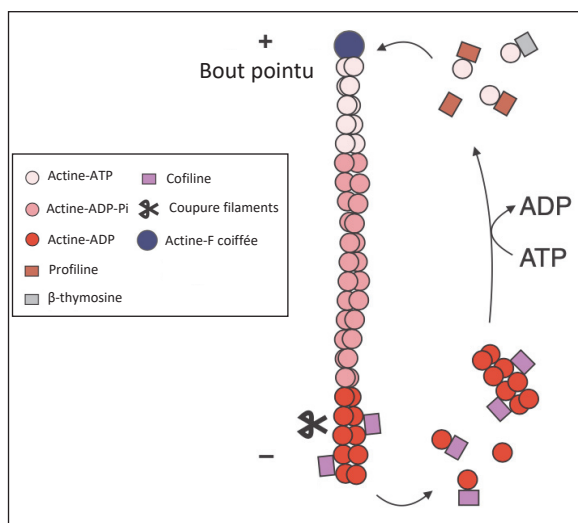


Figure 9 : Représentation schématique de la dynamique de l'actine. L'addition d'actine monomérique à l'extrémité positive (polymérisation) est permise par la profiline. L'actine-ADP est éliminée du filament d'actine (dépolymérisation) et est induite par la cofiline et les protéines qui coupent les filaments d'actine. (Adapté de Coles and Bradke, 2015)

La polymérisation rapide des filaments génère une force qui pousse la membrane vers l'extérieur. La formation d'un filopode se déroule en trois étapes : tout d'abord la nucléation de l'actine permettant la formation de nouveaux filaments d'actine, puis l'élongation rapide de l'actine nucléée pour finir avec le regroupement des filaments d'actine (Mattila and Lappalainen, 2008; Svitkina et al., 2003). Les patches d'actine sont précurseurs de la formation d'un filopode (**Figure 11**). Ces patches d'actine sont des domaines très localisés d'accumulation

d'actine dynamique ayant une organisation similaire aux lamellipodes (Spillane et al., 2011) qui se forment spontanément et de façon transitoire (Ketschek and Gallo, 2010; Loudon et al., 2006; Sainath et al., 2016). Seuls certains de ces patchs seront amenés à former des branches (20% chez les neurones sensoriels) (Ketschek and Gallo, 2010) et ils ont été observé *in vivo* dans des neurones sensoriels de poisson zèbre, des neurones somatosensoriels de souris et chez l'embryon de poulet (Andersen et al., 2011; Hand et al., 2015; Spillane et al., 2011).

Les filaments d'actines sont régulés par les protéines associées à l'actine, parmi elles, le complexe ARP2/3 est important pour la régulation des étapes précoces de la formation de branches (Spillane et al., 2011, 2012; Strasser et al., 2004) (**Figure 11**).

ARP2/3 est un complexe qui permet la nucléation de nouveaux filaments d'actine sur des filaments pré-existants, il permet donc de former une bifurcation sur un filament d'actine qui sera par la suite regroupé avec d'autres filaments pour former un noyau d'où émergera le filopode (Korobova and Svitkina, 2008; Svitkina et al., 2003). Dans les neurones sensoriels, le complexe Arp2/3 est nécessaire à la formation des patchs d'actine et donc à la formation des branches (Spillane et al., 2011).

Une fois les patchs d'actine formés, l'émergence du filopode nécessite une élongation rapide des filaments d'actine à leur extrémité pointue, et le regroupement des filaments pour former un noyau de filament d'actine support du filopode (Lebrand et al., 2004; Mattila and Lappalainen, 2008).

Ce processus est permis par l'action de protéines liées à l'actine comme Ena/VASP, une famille de protéines qui se lie à l'actine pour réguler l'assemblage des filaments d'actine et régule la morphologie des filopodes (Bear and Gertler, 2009; Dent et al., 2007; Mattila and Lappalainen, 2008) (**Figure 11**). Cette protéine se lie aux extrémités des filaments d'actine et augmente leur élongation et, une déplétion en Ena/VASP diminue le nombre de filopodes dans les neurones hippocampaux ce qui engendre une inhibition de la formation de branches collatérales des axones rétinoectaux (Dwivedy et al., 2007; Lebrand et al., 2004).

Un autre complexe protéique est nécessaire à l'émergence des filopodes, en effet, Ena/VASP permet l'élongation des filaments d'actine mais cela n'est possible que par la disponibilité des monomères d'actine. Le complexe ADF/cofiline augmente la dépolymérisation de l'actine en coupant les extrémités pointues (**Figure 11**). Cette coupure entraîne une augmentation des monomères d'actine disponibles et ainsi l'assemblage de nouveaux filaments d'actine pour promouvoir la formation de filopodes (Flynn et al., 2012).

ii. Émergence des branches par invasion des microtubules

Malgré la formation de multiples filopodes, seulement quelques-uns sont maturés en branche grâce à l'envahissement du filopode par les microtubules. Les microtubules permettent la formation et le maintien de la morphologie neuronale par la croissance et la stabilisation des

axones ainsi que des dendrites et des branches. De plus, ils servent de guides pour le transport des moteurs moléculaires impliqué par exemple dans le transport des mitochondries (Armijo-Weingart and Gallo, 2017; Delandre et al., 2016; Kalil and Dent, 2014; Menon and Gupton, 2016; Winkle et al., 2016)

Les microtubules sont des structures tubulaires creuses composées de 13 protofilament de dimères de tubuline α et β . Le polymère qui résulte de cet assemblage est polaire : il possède une extrémité positive à croissance rapide qui expose la β -tubuline et une extrémité négative à croissance lente qui elle, expose l' α -tubuline (Coles and Bradke, 2015; Goodson and Jonasson, 2018) (**Figure 10**).

Durant la formation des branches, des dimères de tubuline sont ajoutés (polymérisation) ou supprimés (catastrophe : dépolymérisation du microtubule) de l'extrémité positive des microtubules. L'extrémité positive est dirigée vers la membrane ce qui va permettre l'invasion des microtubules dans le filopode (Coles and Bradke, 2015). Cette invasion des microtubules dans les filopodes est un des critères permettant de différencier une branche d'un filopode.

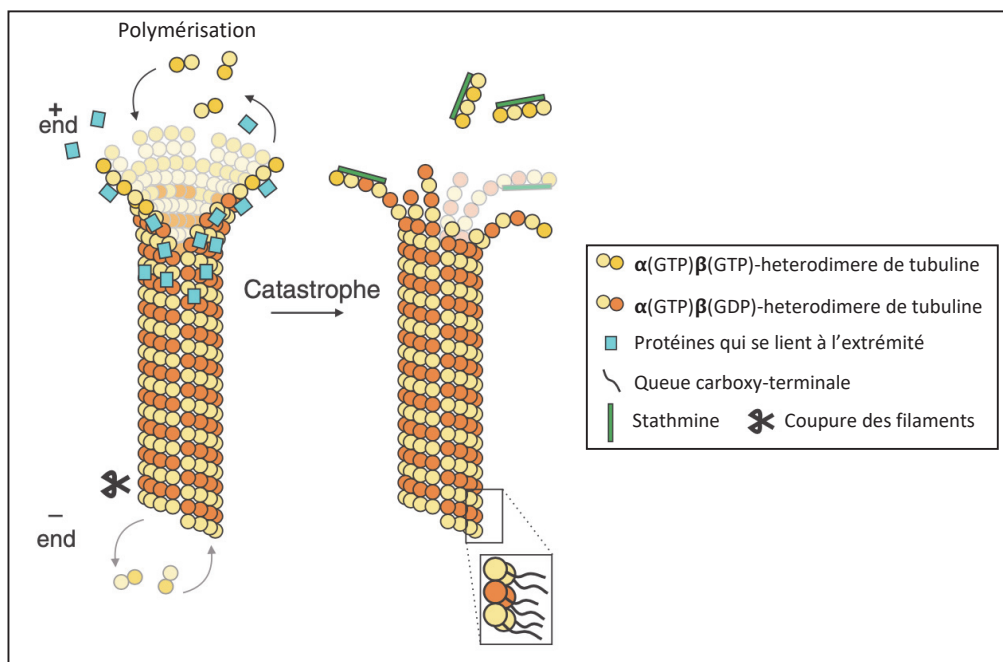


Figure 10 : Représentation schématique de la dynamique des microtubules. La polymérisation des microtubules a lieu à l'extrémité positive par addition d'hétérodimère de tubuline. Cette polymérisation est permise par les protéines qui se lient à l'extrémité des microtubules en recrutant d'autres protéines régulatrices. Les filaments sans coiffe peuvent aussi légèrement polymériser au pôle négatif du microtubule. Les catastrophes sont généralement induites par une diminution de la disponibilité des hétérodimères de tubuline provoquée par la séquestration de ces derniers par la stathmine. (Adapté de Coles and Bradke, 2015)

Dans l'axone, les microtubules forment un réseau parallèle et groupé. Le long de l'axone, au site de branchement, les microtubules subissent une fragmentation locale créant ainsi une discontinuité du réseau de microtubules (Dent et al., 1999; Yu et al., 1993). Les microtubules effectuent des mouvements rétrogrades et antérogrades dans la branche, ce qui montre une action constante de polymérisation et dépolymérisation du microtubule. Toutes ces données montrent que la formation des branches nécessite une "cassure" du réseau de microtubules afin de former un nouveau réseau qui va pénétrer dans la branche nouvellement formée.

Il existe deux différences majeures dans l'organisation des microtubules des axones et des dendrites. Tout d'abord l'orientation des microtubules, dans l'axone tous les microtubules sont orientés dans le même sens avec leur extrémité positive vers l'extrémité de l'axone alors que dans les dendrites, l'orientation des microtubules diffère d'un microtubule à un autre (Baas et al., 1988). Leur deuxième caractéristique est leur composition en MAPs en particulier les protéines MAP2 et tau. En effet, MAP2 est située uniquement dans le compartiment somato-dendritique, ainsi il est possible de distinguer par immunomarquage l'axone des dendrites puisque Tau est exprimé dans l'axone.

MAP1B est une des MAPs exprimée le plus tôt au cours du développement. Dans les neurones une délétion de MAP1B augmente le branchement axonal, en effet, en absence de MAP1B les futures branches sont plus susceptibles d'être stabilisées et donc de devenir des branches matures (Barnat et al., 2016; Bouquet, 2004).

Une diminution de la phosphorylation de MAP1B spécifiquement à la base des branches provoque une stabilisation des microtubules pour aboutir à une stabilisation des protrusions axonales qui peuvent mûrir en branches (Barnat et al., 2016). Cette diminution locale est permise par une diminution de l'activité de GSK3 β à la base des branches (Kim et al., 2006; Zhou et al., 2004).

Enfin, Tau est une des protéines associées au MTs les plus étudiée. Elle a été identifiée pour son rôle dans la fixation et l'assemblage des MTs (**Figure 11**). Elle est exprimée dans les axones et dans le cône de croissance où elle est nécessaire à l'élongation de l'axone dans les neurones en culture. La déphosphorylation de cette protéine induit sa dissociation des microtubules ce qui laisse l'accès des microtubules à la katanine qui est une protéine qui fragmente les microtubules (Qiang, 2006; Yu et al., 2008). Longtemps considérée comme une protéine de stabilisation des MTs, de récentes études suggèrent que Tau permet aux MTs d'avoir des domaines labiles (Baas and Qiang, 2019). Enfin, Tau est une protéine régulant le transport axonal par la régulation des dynéines et kinesines. En effet, une forte concentration de Tau sur les MTs inhibe l'association entre les MTs et les transporteurs moléculaires. Les dynéines changent de direction lorsqu'elles rencontrent des MTs associés à Tau, alors que les kinésines

se détachent (Dixit et al., 2008). Cependant les très fortes concentrations de Tau utilisées dans cette étude ne permettent pas de conclure quant à ce rôle *in vivo* (Tapia-Rojas et al., 2019).

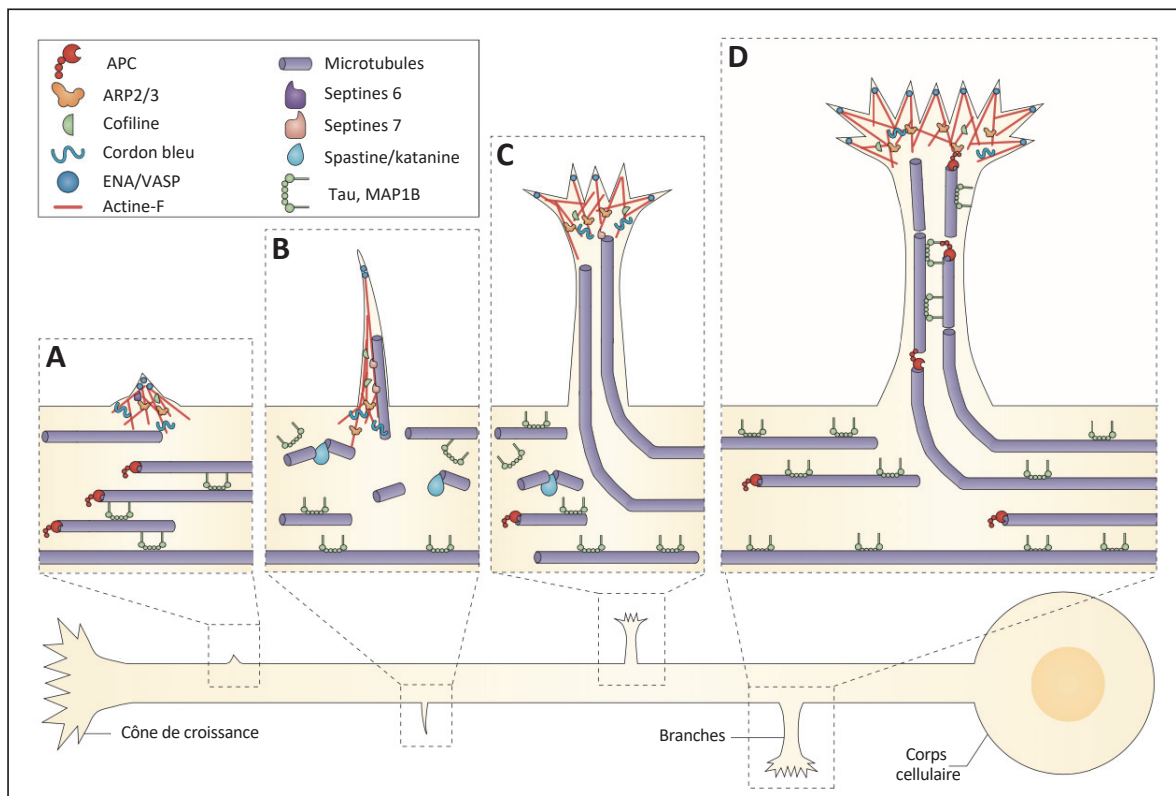


Figure 11 : Représentation schématique du développement d'une branche axonale et sa régulation par le cytosquelette. A. Formation d'un patch d'actine dans l'axone par l'accumulation de filaments d'actine régulée par ENA/VASP, cordon bleu, ARP2/3 et cofiline. B. Formation d'un filopode avec pénétration des microtubules par déstabilisation des microtubules par la spastine et katanine, les septines 7 promeuvent l'entrée des microtubules dans le filopode. C-D. Formation des branches par l'entrée de microtubules stables dans le filopode. Les microtubules se regroupent et s'alignent dans la branche sous l'action des MAPs : Tau et MAP1B. (Kalil and Dent 2014)

iii. La synthèse de protéines

La synthèse de protéines dans les neurones se déroule souvent dans le corps cellulaire. Cependant, l'axone pouvant mesurer jusqu'à plusieurs centimètres de long et le temps de demi-vie de certaines protéines étant court, des études ont montré que des ARNm pouvaient être transportés afin de subir une traduction locale dans l'axone (Cioni et al., 2018). De plus, des ribosomes libres et des ARNm ont été observé dans les axones (Bassell et al., 1988; Piper and Holt, 2004; Tennyson, 1970). Lors du développement des neurones *in vivo*, la traduction axonale n'est pas constante et atteint un pic au stade du branchement axonal dans les cellules ganglionnaires rétiniennes chez la souris (Shigeoka et al., 2016). Le transport des ARNm dans l'axone est permis par des modifications post-transcriptionnelles de l'ARNm. Ces modifications sont induites par les protéines de liaisons à l'ARN (RNA-binding proteins : RBP), qui se fixent sur les ARNm sur les régions non traduites (UTR). Cette fixation bloque la

traduction des ARNm et permet leur ciblage dans l'axone. De plus, *in vitro* dans les neurones corticaux, la protéine TRF2-S (telomere repeat-binding factor 2) interagit avec les ARNm pour faciliter leur transport dans l'axone. La protéine FMRP (fragile-X mental retardation protein) bloque la fixation de la protéine TRF2-S sur les ARNm, ce qui induit une diminution du transport des ARNm (Zhang et al., 2015). La concentration de RBP *in vivo* varie au cours du développement, certaines RBPs sont plus présentes au stade de la croissance axonale comme APC alors que d'autres comme FRMP sont plus présentes au stade du branchement axonal (Shigeoka et al., 2016). Ces variations suggèrent que les RBP permettent la régulation de la coordination entre la traduction et la localisation des ARNm.

De nombreux ARNm codant pour des protéines de régulation du cytosquelette telles que ARP2, cortactine ou encore WAVE1 sont localisés dans l'axone grâce à leur séquence en 3'UTR (Gumy et al., 2011; Spillane et al., 2012, 2013). Les ARNm se déplacent dans l'axone *via* les microtubules, et bien que de nombreux motifs soient nécessaires à la localisation des ARNm, aucun motif unique n'a été identifié pour cibler spécifiquement l'axone (Kislauskis et al., 1994). Ces ARNm sont localisés au point de branchement ce qui implique que la machinerie de traduction soit présente elle-aussi dans l'axone. Dans l'axone, ce sont les facteurs extracellulaires qui régulent la traduction. Ainsi, *in vitro*, le NGF est capable d'induire la traduction locale de la cortactine et WAVE1 et une inhibition de la traduction implique une diminution de la formation de branches par le NGF (Spillane et al., 2012). *In vivo*, dans les cellules rétinienne ganglionnaires du Xenope, les ARN se localisent à des points permettant de prédire la formation de branches. Ces sites d'accumulation corrélerent avec la localisation de la synthèse de β -actine nécessaire à la formation de branches (Wong et al., 2017). Cette étude montre l'importance de la synthèse locale de protéines pour le branchement axonal *in vivo*.

d. Rôle des mitochondries dans le développement axonal

Bien que le cerveau humain ne représente que 2% de sa masse corporelle, il consomme près de 20% de l'ATP produit (Attwell and Laughlin, 2001). Dans le cortex, 77% de l'ATP est consommé par la matière grise et parmi ces 77%, les neurones consomment environ 96% de l'ATP. La source majeure d'ATP dans les neurones provient des mitochondries qui permettent la conversion de pyruvate en ATP par la chaîne de transport d'électrons et la phosphorylation oxydative. Outre le fait d'être une source majeure d'ATP, la mitochondrie permet le maintien de l'homéostasie calcique (Billups and Forsythe, 2002) et est impliquée dans différents processus comme la régulation de l'apoptose ou l'inflammation (Bock and Tait, 2020).

La morphologie des neurones, implique un vrai défi pour maintenir une homéostasie énergétique. Pour cela ils doivent pouvoir 1) recruter et redistribuer les mitochondries depuis le corps cellulaire jusqu'à l'axone distal et l'arborisation terminale, 2) éliminer les mitochondries anciennes ou endommagées aux extrémités axonales (Ashrafi et al., 2014; Lin

et al., 2017; Zheng et al., 2019). Un modèle intéressant est que le trafic et la distribution des mitochondries permet de répondre aux besoins métaboliques (Cheng and Sheng, 2020).

i. Distribution des mitochondries *in vitro* et *in vivo*

Dans les axones, les mitochondries sont individualisées contrairement au corps cellulaire où elles sont fusionnées pour former un réseau mitochondrial. Les mitochondries s'accumulent dans certaines zones de l'axone qui demandent plus d'énergie comme le cône de croissance, les boutons présynaptiques ou les ramifications axonales (Courchet et al., 2013; Lin et al., 2017; Ruthel and Hollenbeck, 2003; Tao et al., 2014). Grâce à leur individualité, il est possible d'observer le trafic des mitochondries dans l'axone. Les mitochondries sont transportées le long des microtubules par des moteurs moléculaires : la dynéine qui va permettre le déplacement vers le pôle négatif des microtubules et donc vers le corps cellulaire (Hirokawa et al., 2010) et les kinésines (KIF5a, KIF5b, KIF5c) qui vont permettre le déplacement vers le pôle positif et donc vers le cône de croissance (Cai and Sheng, 2009; Cai et al., 2005) (**Figure 12**). La syntaphiline (SNPH) est une protéine localisée préférentiellement dans l'axone. Elle est co-localisée avec les mitochondries immobiles de l'axone et, une diminution de l'expression de SNPH induit une augmentation du trafic des mitochondries *in vitro* et *in vivo* (Kang et al., 2008). Ces résultats montrent que la SNPH est nécessaire à la stabilité des mitochondries dans l'axone. La SNPH se lie au mitochondries par son extrémité C-terminale et son domaine de liaison aux microtubules lui permet de stabiliser les mitochondries le long de l'axone (Kang et al., 2008).

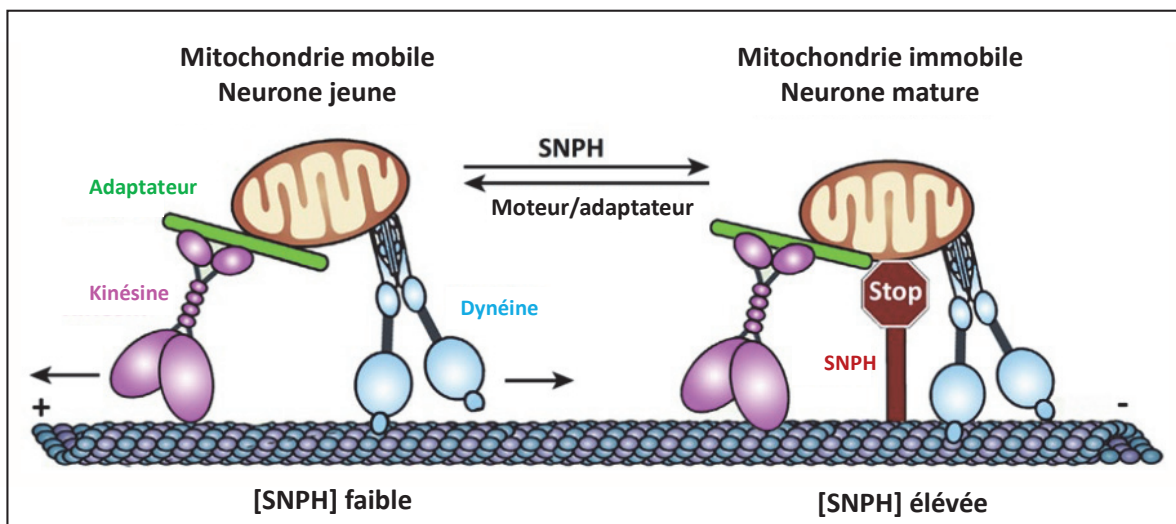


Figure 12 : Représentation schématique du système de mouvement des mitochondries. Le mouvement des mitochondries est permis par sa fixation sur les moteurs moléculaires kinésine et dynéine. La SNPH est une protéine d'ancrage des mitochondries. Dans les neurones jeunes, la concentration en SNPH est faible et conduit à une forte mobilité alors que dans les neurones matures une concentration de SNPH élevée induit une faible mobilité des mitochondries. (Chamberlain and Sheng, 2019)

Durant les premières étapes du développement axonal, les neurones synthétisent de nombreuses protéines et organites. Cette synthèse nécessite un fort trafic des mitochondries qui est transitoire, puisque dans les neurones matures, le trafic des mitochondries est diminué (Chada and Hollenbeck, 2004; Ruthel and Hollenbeck, 2003). En effet, *in vitro*, dans les neurones immatures (5 jours *in vitro* : 5DIV) la mobilité des mitochondries est plus élevée que dans les neurones matures (14DIV)(Chang and Reynolds, 2006). En revanche, les fonctions des mitochondries restent inchangées entre 5DIV et 15DIV, en effet les auteurs n'ont observé aucune différence au niveau du potentiel de membrane et de leur capacité tampon pour le calcium. Les auteurs proposent que la forte mobilité des mitochondries dans les neurones immatures permet une dispersion de l'énergie plus rapide alors que dans les neurones matures, l'immobilisation des mitochondries leur permet de devenir des sources d'énergie stables pour les synapses (Chang and Reynolds, 2006).

Plus tard, une étude *in vitro* dans les neurones corticaux montre que l'arrêt des mitochondries au cours de la maturation axonale se produit aux sites présynaptiques (Lewis et al., 2016). De plus, dans les neurones matures, le potentiel de membrane mitochondrial, et la dynamique du calcium dans les mitochondries ont été mesurés. Les auteurs n'ont pas observé de différence au niveau du potentiel de membrane entre des neurones de 7DIV et de 28DIV (Lewis et al., 2016). Cela montre que les mitochondries ne subissent pas de changement au niveau de leur potentiel membranaire au cours de la maturation. Cependant, l'import de calcium dans les mitochondries et le niveau calcique basal dans les mitochondries des neurones matures sont supérieurs à ceux des neurones immatures. Selon les auteurs, cet effet serait dû à la diminution du trafic des mitochondries (Lewis et al., 2016). L'utilisation de chambre microfluidique pour cultiver les neurones permet de se rapprocher de la formation de réseau de neurones qui se déroule *in vivo* puisque cela permet de former des connexions orientées par les contacts axone-dendrites. Cette technique a permis de reconstruire un réseau cortico-striatale et de démontrer que dans les neurones corticaux, le trafic des mitochondries (Moutaux et al., 2018) (antérograde et rétrograde) diminue entre 4DIV et 21DIV sans affecter le nombre de mitochondries (Burkhalter et al., 2003)(Moutaux et al., 2018).

Afin d'étudier le trafic mitochondrial en conditions physiologiques, des souris transgéniques exprimant un marqueur mitochondrial fluorescent ont été générées. Ainsi l'équipe de Litchman en 2007 a réalisé la première étude *in vivo* sur la mobilité des mitochondries dans des neurones périphériques de souris adultes en utilisant la souche de souris Thy1-mitoCFP (Misgeld et al., 2007). Ainsi ils montrent que, *in vivo*, dans les neurones périphériques de souris adultes, 87% des mitochondries sont stationnaires et, 66% des mitochondries mobiles effectuent des mouvements antérogrades.

Les neurones corticaux des couches II/III la mobilité mitochondriale *in vivo* est d'environ 1% dans les souris adultes (Lewis et al., 2016; Smit-Rigter et al., 2016). Les auteurs expliquent ce résultat par la présence de mitochondries dans près de 50% des sites présynaptiques et suggèrent que la diminution du trafic des mitochondries est due à l'augmentation des sites présynaptiques stables (Lewis et al., 2016).

ii. Rôle des mitochondries dans la morphogénèse axonale

Il a été montré dans des neurones corticaux de rats que la biogénèse des mitochondries était nécessaire à la croissance axonale. PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α) est un régulateur des mitochondries qui permet l'activation des facteurs de respiration nucléaire NRF1 et NRF2 qui *in fine* régule l'expression des gènes codant pour les protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale (Wu et al., 1999). La surexpression de PGC1 α induit une augmentation de la longueur de l'axone accompagnée d'une augmentation de la densité mitochondriale. L'augmentation de cette densité n'est pas homogène dans tous les compartiments cellulaires : il y a une forte augmentation dans l'axone alors que l'augmentation à proximité du corps cellulaire est faible (Vaarmann et al., 2016). De plus, la sonde ratiométrique PercevalHR permet de mesurer le ratio ATP/ADP (Tantama et al., 2013) et montre que l'augmentation de la densité mitochondriale induit une augmentation de ce ratio dans les axones (Vaarmann et al., 2016). Ainsi, ces résultats suggèrent que lors de la croissance axonale, les mitochondries se regroupent dans l'axone afin d'augmenter la production d'ATP.

Dans un contexte de branchement, la mobilité des mitochondries est contrôlée par la voie de signalisation LKB1-NUAK1 (Courchet et al., 2013). En effet, *in vitro* dans les neurones corticaux, une diminution de l'expression de LKB1 ou de NUAK1 induit une augmentation du trafic des mitochondries. Cette augmentation du trafic a été corrélée avec une diminution du nombre de branches. En effet, la surexpression de SNPH dans des neurones avec une diminution de l'expression de LKB1 ou de NUAK1 permet de restaurer le phénotype de branchement (Courchet et al., 2013). Ainsi cette étude montre que la régulation du trafic des mitochondries par LKB1 et NUAK1 est nécessaire au branchement axonal.

De plus, il a été montré que la position des mitochondries immobiles est corrélée avec la position des branches matures (Spillane et al., 2013). En outre, une inhibition de la respiration et de la synthèse de protéines induit une diminution de la maturation des branches. Ainsi, dans cette étude, les auteurs ont corrélé la formation de branches et la position des mitochondries (Spillane et al., 2013).

La question se pose de savoir si les mitochondries se positionnent à la base des branches avant ou après leur formation. En 2014, des travaux sur les neurones de l'hippocampe montre *in vitro*, que la localisation des mitochondries précède la formation des branches et que la

présence de mitochondries est corrélée avec une durée de vie plus longue des branches (Tao et al., 2014). Cependant, récemment, l'équipe a soumis un article (Lanfranchi et al., 2020) montrant que dans les neurones corticaux, les mitochondries sont recrutées après la formation de branches axonales et qu'elles sont nécessaires à leur stabilisation.

L'implication de NUAK1 dans le branchement axonal est appuyée par son implication dans la régulation du métabolisme mitochondrial. En effet, l'équipe montre que lorsque l'expression de NUAK1 est diminuée les neurones corticaux, le ratio ATP/ADP ainsi que le potentiel de membrane des mitochondries diminuent (Lanfranchi et al., 2020).

Ainsi, l'ensemble de ces résultats montrent que la régulation du trafic et des fonctions des mitochondries est importante lors de la croissance axonale et du branchement.

C- Les voies de signalisation impliquées dans le développement neuronal

De très nombreuses voies de signalisation régulent les différentes étapes du développement neuronal. Dans les paragraphes suivants, je vais dans un premier temps, décrire l'implication de différentes kinases dans la polarisation des axones. Puis, j'aborderai les voies de signalisation intervenant dans l'élongation et le branchement des axones.

Les kinases impliquées dans la polarisation axonale modulent l'expression protéique, la transcription, la stabilité et la localisation des ARNm. Ces ARNm codent pour des régulateurs du cytosquelette et assurent le remodelage du cytosquelette d'actine et des microtubules requis pour le processus de polarisation. Ces kinases transmettent des signaux positifs qui promeuvent la formation d'un axone mais également des signaux négatifs qui inhibent la formation des multiples axones. Ces signaux sont régulés spatio-temporellement au cours de la polarisation. Plusieurs de ces voies de signalisation interviennent également dans les étapes suivant la polarisation lors du développement axonal : la croissance et le branchement axonale.

Ces voies de signalisation intracellulaires incluent :

- La Glycogen Synthase Kinase 3b (**GSK3 β**) est une serine threonine kinase qui régule de multiples étapes de la morphogénèse neuronale. Elle intervient dans la polarisation, la croissance et la migration neuronale (Jaworski et al., 2019; Jiang et al., 2005),
- la Liver Kinase B1 (**LKB1**), qui intervient également dans de multiples étapes de la morphogénèse neuronale (Kuwako and Okano, 2018; Mencarelli et al., 2018),
- le complexe Par3–Par6–atypical protein kinase C (aPKC) (Hapak et al., 2018),
- et les petites GTPases Rac1/RhoA/Cdc42 (Lundquist, 2003).

Ces différentes voies de signalisation convergent pour assurer conjointement le remodelage du cytosquelette d'actine et des microtubules qui sont les processus clés pour initier la

polarité axonale. Certaines protéines effectrices sont communes à ces différentes signalisations.

1) La signalisation de la polarité neuronale

a. Les facteurs extracellulaires

i. BDNF et NT-3

Parmi les facteurs extracellulaires figurent les neurotrophines comme le Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), le Nerve Growth Factor (NGF), la neurotrophine-3 (NT-3), et la neurotrophine-4 (NT-4). Ils exercent leurs actions via les récepteurs de la famille tropomyosin-related kinase (Trk), des récepteurs à activité tyrosine kinase et $p75^{\text{NTR}}$, un membre de la famille des récepteurs au TNF (Tumor necrosis factor). La neurotrophine BDNF étant au cœur de mon projet de thèse, sa biologie et son action sur la croissance et le branchement axonale sera détaillée dans une partie ultérieure de ce manuscrit.

Des études *in vitro* ont montré que des applications locales de BDNF, par l'application de stries de BDNF sur les boîtes de culture avant la mise en culture (Shelly et al., 2007) stimule la polarisation des axones corticaux et pyramidaux. Cette action est dépendante de l'interaction des neurotrophines avec leurs récepteurs TrkB et C. L'inhibition de l'expression de ces récepteurs (Nakamuta et al., 2011) ainsi que la neutralisation du BDNF par des anticorps ou par un récepteur TrkB-Fc soluble réduit drastiquement le nombre de neurones formant des axones *in vitro* (Cheng et al., 2011b).

Le BDNF est sécrété localement par les neurones et son action autocrine est amplifiée par le recrutement local de récepteurs TrkB (Cheng et al., 2011b). Une des voies de signalisation impliquée dans la sécrétion autocrine du BDNF fait intervenir la PKA (protein kinase A) activée par l'augmentation de l'AMPc (AMP cyclique) dans les neurites indifférenciés. Cette activation a pour effet d'augmenter localement la sécrétion de BDNF en direction de l'axone (Cheng et al., 2011b). L'augmentation de cAMP est permise par une régulation de la balance entre cGMP et cAMP. L'utilisation de la technique de FRET dans des neurones en culture a permis d'impliquer les phosphodiesterases (PD4E) dans le mécanisme de régulation réciproque entre cAMP et cGMP (Shelly et al., 2010). De plus, la signalisation médiée par BDNF-TrkB active la phosphatidylinositol kinase 3 (PI3-kinase) qui conduit au transport des récepteurs TrkB dans le futur axone, amplifiant ainsi la signalisation du BDNF (Arimura et al., 2009; Cheng et al., 2011b). De plus, l'activation de PI3K par BDNF-TrkB génère la production de phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3) (**Figure 13**). Ces PIP3 sont localisés dans l'axone naissant et permettent le recrutement et l'activation de la protéine kinase B (AKT), engendrant ainsi l'inactivation de $GSK3\beta$. Cette inactivation permet l'activation de certaines protéines associées aux microtubules (MAPs), comme les protéines collapsin response mediator protein 2 (CRMP2) et Tau1, qui en régulant la polymérisation de la tubuline vont permettre la polarisation de l'axone (Reichardt, 2006).

Le BDNF induit également la phosphorylation de la kinase LKB1 une kinase importante dans plusieurs aspects de la morphogénèse neuronale. L'absence de LKB1 dans les neurones hippocampaux et corticaux bloque la formation d'axones (Barnes et al., 2007; Shelly et al., 2007). L'action du BDNF sur LKB1 est médiée par la phosphorylation et l'activation de LKB1 par PKA. L'interaction de LKB1 avec sa protéine partenaire (Shelly et al., 2007) la pseudokinase STE20-related kinase adaptor alpha (Strada), promeut son exportation du noyau et l'activation de ses cibles ; les kinases SAD (SAD-A and SAD-B). Ces kinases SAD vont, en phosphorylant des protéines associées aux microtubules, favoriser la polarisation neuronale (Kishi et al., 2005; Veleva-Rotse et al., 2014).

La neurotrophine NT3 active localement la formation d'un axone via des mécanismes dépendants du Ca²⁺. L'augmentation des ions Ca²⁺ fait intervenir la kinase Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK). De façon intéressante et contrairement au BDNF, NT3 inhibe également la formation de multiples axones. Cette inhibition est permise par les ions Ca²⁺, produits sous l'effet de NT3 par la kinase CamK1, qui par l'intermédiaire de l'activation de la GEF-H1 vont activer RhoA et prévenir la formation de multiples axones (Nakamuta et al., 2011; Takano et al., 2017). RhoA permet de réguler la rétraction des neurites par un remaniement du cytosquelette d'actine (Conde et al., 2010; Da Silva et al., 2003).

ii. La semaphorine 3A

La sémaphorine 3A (Sema3A) ainsi que son récepteur neuropilin-1 (NP-1) sont exprimés dans le cortex cérébral et les neurones corticaux en développement (Chen et al., 2008; Polleux et al., 2000). L'exposition de neurones hippocampaux en culture, à la sémaphorine 3A supprime la formation des axones et promeut la différenciation des neurites en dendrites (Shelly et al., 2011). La stimulation de NP-1 par la Sema 3A élève les niveaux de cGMP mais réduit ceux d'AMPC et ce qui engendre une diminution de l'activation de PKA. L'effet inhibiteur de Sema3A est attribué à l'absence d'activation de GSK3 β et LKB1 par PKA (Shelly et al., 2011). Enfin, une diminution de la signalisation de Sema 3A par injection d'un ARN interférent dirigé contre NP-1 dans des progéniteurs corticaux de rat conduit à des défauts de polarisation *in vivo* (Shelly et al., 2011).

iii. Les protéines de la famille du TGF- β

Les Transforming Growth Factor β (TGF- β 1-3) sont les ligands du récepteur de type II de TGF- β (T β R2), qui après activation recrutent le récepteur de type I TGF- β receptor (T β R1). Ce rapprochement induit la phosphorylation de T β R1 par T β R2 conduisant au remodelage du cytosquelette et à des régulations transcriptionnelles.

Les récepteurs T β R1 and T β R2 sont présents de manière diffuse dans la membrane des neurones primaires avant la polarisation de l'axone, puis ces deux récepteurs s'accumulent dans la région du cône de croissance. Par cette relocalisation, l'exposition au TGF- β permet la spécification de l'axone. L'inhibition de l'expression de T β R2 dans des neurones primaires *in vitro* et *in vivo* ne permet pas la formation d'un axone (Yi et al., 2010). Le mécanisme d'action du TGF- β repose sur la phosphorylation de Par6 par T β R2. Par6 recrute l'ubiquitine ligase Smurf1 (Ozdamar et al., 2005) et promeut la dégradation par le protéasome de RhoA impactant *in fine* le cytosquelette d'actine.

b. Les voies intracellulaires impliquées dans la polarité neuronale

i. Le complexe Par3-Par6-aPKC

Le complexe Par3, Par6 et aPKC est conservé dans l'ensemble du règne animal et joue un rôle prédominant dans la polarité cellulaire. Ce complexe est assuré par l'interaction des différentes protéines entre elles. Par3 interagit avec Par6 et avec le domaine kinase de aPKC. Par6 se fixe au domaine régulateur de la kinase aPKC. Dans les neurones, le complexe est présent exclusivement dans le cône de croissance axonal et gouverne la mise en place et le maintien de la croissance axonale, essentielle à la polarité des neurones (Shi et al., 2003, 2004). La localisation du complexe est cruciale à son action sur la formation de l'axone et plusieurs mécanismes assurent cette localisation.

Le complexe Par3-Par6-aPKC est transporté à l'extrémité distale du futur axone par la kinésine Kif3a (Nishimura et al., 2004; Shi et al., 2003) via une interaction entre Par3 avec Kif3a (Funahashi et al., 2013). La phosphorylation de Par3 par la MAP kinase Erk2 interrompt son interaction avec Kif3a et permet le relargage du complexe à l'extrémité de l'axone (Funahashi et al., 2013).

La localisation de Par6 dans l'axone est également régulée par son ubiquitination et sa dégradation dans les autres neurites par l'ubiquitine ligase Smurf1 (Cheng et al., 2011a). La phosphorylation de Smurf1 par PKA après stimulation par le BDNF conduit à un changement d'affinité de Smurf1 pour ses différents substrats. Ainsi, la dégradation de RhoA nécessaire à la formation de l'axone augmente tandis que celle de Par6 diminue (Cheng et al., 2011a). Ce mécanisme permet donc la diminution de RhoA et l'accumulation de Par6 dans les futurs axones ; conditions nécessaires à la formation et l'élongation des axones.

Un autre mécanisme est dépendent de l'association de Par3 avec APC (adenomatous polyposis coli) et la kinésine KIF3A. APC se fixe à l'extrémité positive des microtubules et stimule l'assemblage des microtubules et leur stabilité. La phosphorylation d'APC par GSK3 β inhibe son interaction avec les microtubules et régule la localisation d'APC et de son partenaire Par3 (Shi et al., 2004).

La localisation du complexe Par à l'extrémité des axones est également régulée par l'activation de la PI3K. La PI3K est une kinase permettant l'ajout d'un groupement phosphate sur un

phosphatidyl-inositol : PI(4,5)P₂, cet ajout mène à la formation de PI(3,4,5)P₃. Ce phosphatidylinositol contient un domaine PH (plextrin homology) qui va permettre la liaison de différentes protéines (**Figure 13**). La phosphatase PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) permet la déphosphorylation de PI(3,4,5)P₃ afin de reformer du PI(4,5)P₂, elle a un rôle antagoniste à PI3K.

La génération de PI(3,4,5)P₃ recrute des protéines comme l'aPKC, AKT ou encore les GEFs Tiam1 et Tiam2 qui sont responsables de l'activation des GTPases Cdc42 et Rac1. Une surexpression de Tiam1 dans des neurones primaires conduit au développement de plusieurs axones (Kunda et al., 2001).

La protéine AKT est recrutée à la membrane plasmique par PIP₃ grâce à son domaine PH ce qui permet sa phosphorylation et son activation par les kinases PDK1 et 2. La forme phosphorylée de AKT est retrouvée principalement dans le cône de croissance des neurones polarisés *in vitro* (Shi et al., 2003). De plus, PI3K permet l'accumulation spécifique de PIP₃ et AKT dans une neurite qui sera le futur axone (Ménager et al., 2004). La phosphorylation des sites S9 sur GSK3 β et S21 sur GSK3 α induit sa perte d'activité. La phosphorylation de GSK3 β est aussi régulée par Dock3 (une protéine Rac1-GEF) qui permet le recrutement de GSK3 β à la membrane pour faciliter sa phosphorylation par PI3K (Namekata et al., 2012).

Le complexe Par régule également la polarisation via la kinase MARK2 (microtubule affinity-regulating kinase (MARK)/PAR-1). La diminution de l'expression de MARK2 favorise la formation d'axones multiples tandis qu'une surexpression prévient la polarisation. La kinase aPKC est responsable de l'inhibition de MARK2. Cette inactivation conduit à la déphosphorylation de protéines associées aux microtubules conduisant à l'assemblage des microtubules et l'élongation de l'axone (Chen et al., 2006). Le complexe est impliqué dans différentes signalisations régulant la polarité au cours du développement des neurones.

ii. Shootin 1

Shootin1 est une protéine cytosolique localisée dans toutes les neurites durant les premiers stades de développement de neurones d'hippocampe. Par la suite, elle s'accumule dans le cône de croissance en développement (futur axone) et disparaît des autres neurites. L'inhibition de l'expression de Shootin1 empêche la polarisation (Toriyama et al., 2006). A l'inverse, l'augmentation de son expression conduit à la formation d'axones multiples. Shootin1 recrute PI3K dans le cône de croissance. La diminution de l'expression de Shootin1 empêche la génération de PIP₃ dans le cône de croissance (Sapir et al., 2013).

iii. CRMP2

La protéine Collapsin response mediator protein 2 (CRMP2) est une protéine adaptatrice qui intervient dans le trafic vésiculaire et la régulation du cytosquelette. C'est une protéine

associée aux microtubules (MAPs) qui a une activité d'hydrolase des pyrimidines. Elle est exprimée dans le système nerveux en développement. La protéine est enrichie dans les axones en croissance de neurones hippocampaux. La surexpression de CRMP2 induit la formation d'axones multiples et l'élongation des axones préexistants (Inagaki et al., 2001). CRMP2 se fixe aux hétérodimères de tubuline et promeut la polymérisation des microtubules. Elle participe ainsi à l'élongation et aux branchements des axones (Fukata et al., 2002). Les mécanismes moléculaires intervenants ne sont pas encore connus.

Takeshi Yoshimura et col. ont montré que la phosphorylation de CRMP2 par GSK3 β inhibe sa liaison à la tubuline. L'expression d'une protéine mutante CRMP2 non phosphorylable par GSK3 β induit la formation de multiples neurites semblables à des axones dans des neurones hippocampaux. Indiquant ainsi que GSK3 β régule la polarité neuronale en contrôlant l'activité de CRMP2 (Yoshimura et al., 2005). Le traitement de neurones par la neurotrophine NT3 ou le BDNF entraîne l'inactivation de GSK3 β et par conséquent l'activation de CRMP2 en promouvant la croissance axonale. L'inhibition de GSK3 β quant à elle, est régulée par l'activation de la voie PI3K-AKT par les neurotrophines (Yoshimura et al., 2006).

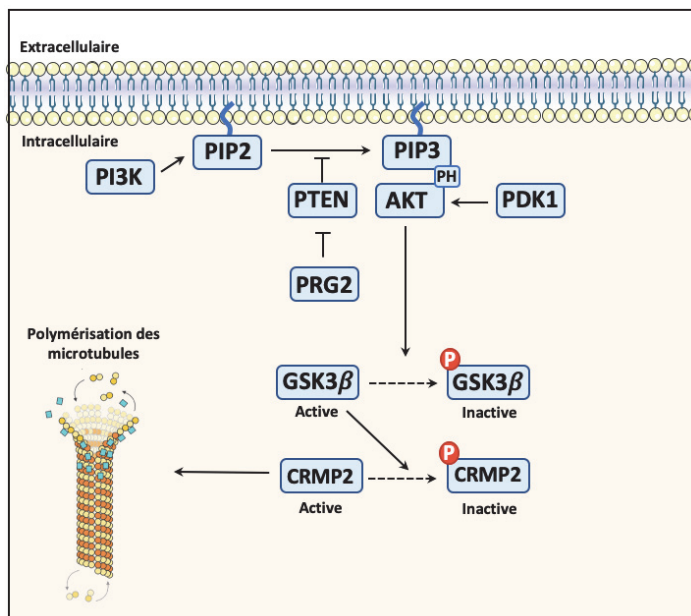


Figure 13 : Représentation schématique de la régulation de la croissance et du branchement par les phosphatidylinositol. La PI3K permet la phosphorylation de PIP2 en PIP3, ce qui permet la translocation de AKT à la membrane via son domaine PH. Cette translocation engendre l'activation d'AKT par PDK1, ainsi AKT induit l'inactivation de GSK3 β ce qui in fine permet le maintien de l'activité de CRMP2 et ainsi la polymérisation des microtubules. L'activité phosphatase de PTEN induit la déphosphorylation de PIP3 en PIP2, PTEN est régulée négativement par PRG2 afin de promouvoir le branchement axonal.

2) Les voies impliquées dans l'élongation axonale

Les différentes kinases impliquées dans l'élongation des neurites régulent et coordonnent le remodelage du cytosquelette, l'addition de nouvelle membrane plasmique, l'adhésion des neurones et la synthèse protéique.

a. La kinase AMPK

L'AMPK (Adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase) est un senseur clé du métabolisme énergétique cellulaire qui participe à de multiples cascades de signalisation. Elle

contrôle l'homéostasie énergétique en stimulant les voies productrices d'ATP et en inhibant les voies qui en consomment. AMPK réduit l'élongation des neurites en inhibant la voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR impliquée dans l'élongation des neurites (voir paragraphe suivant). Cependant, l'AMPK peut également réguler directement cette élongation, indépendamment du niveau d'énergie cellulaire. En effet, l'AMPK interagit avec un récepteur à la nétrine 1, la protéine DSCAM (Down Syndrome Cell Adhesion Molecule) (Zhu et al., 2013). L'addition de nétrine dans les cultures de neurones corticaux promeut l'élongation des neurites *via* la phosphorylation et l'activation d'AMPK. L'utilisation d'inhibiteurs d'AMPK ou de la forme mutée d'AMPK bloquent l'effet positif de la nétrine sur l'élongation des neurites.

b. La voie PI3K-Akt-mTOR

La voie de signalisation PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) - Akt (protein kinase) - mTOR (mammalian target of rapamycin) participe non seulement à l'initiation de la formation des neurites mais aussi à la croissance et au développement des dendrites et axones (Bennison et al., 2020). Cette voie de signalisation régule le remodelage du cytosquelette mais également la synthèse des lipides et protéines *via* la kinase mTOR. De nombreux travaux ont montré l'implication de la voie PI3K-AKT-mTOR sur la croissance des neurites dans des cellules primaires (neurones de l'hippocampe, neurones des ganglions de la racine dorsale ou encore les neurones des ganglions des nerf supérieurs) (Kuruvilla et al., 2000; Tucker et al., 2008; Zheng et al., 2008). La signalisation PI3K-Akt est activée par différents stimuli comme le BDNF, le HGF (Hepatocyte Growth Factor) ou encore le NGF. L'activation d'AKT induit l'inhibition de GSK3 β ce qui conduit à l'activation de MAP2 (**Figure 14**), et par conséquent à la polymérisation des microtubules et l'élongation des neurites (Lim and Walikonis, 2008) (**Figure 14**). L'inhibition de GSK3 β conduit plus spécifiquement à l'élongation de l'axone *via* la protéine APC qui promeut l'assemblage des microtubules (Zhou et al., 2004). AKT phosphoryle et active la protéine Tau qui intervient dans la stabilité et l'assemblage des microtubules (Ksiezak-Reding et al., 2003). En outre, AKT active également la kinase mTOR qui contrôle la synthèse des protéines et des lipides nécessaires à la croissance des axones et dendrites.

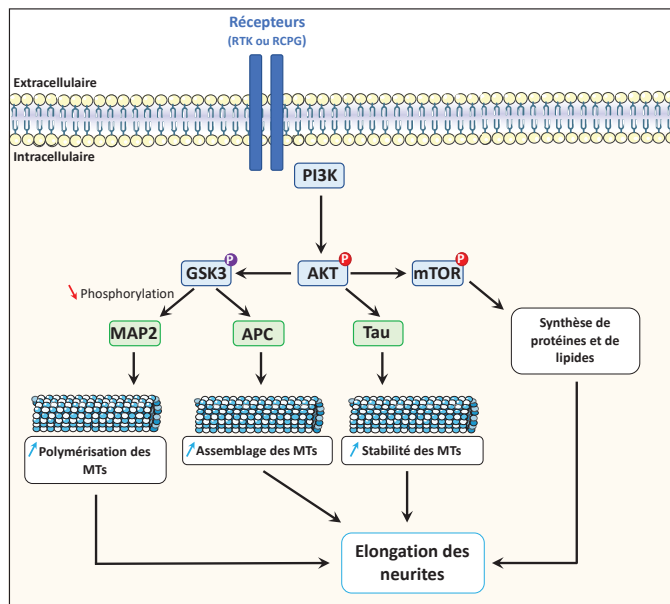


Figure 14 : Représentation schématique de la régulation de l'élongation par la kinase PI3K. La kinase PI3K permet l'activation de la kinase AKT qui induit la phosphorylation de mTOR et GSK3 β (provoquant respectivement leur activation et leur inhibition). L'inactivation de GSK3 β diminue la phosphorylation de MAP2 et APC ce qui permet d'augmenter la polymérisation et l'assemblage des microtubules (MTs). En parallèle AKT active la protéine Tau ce qui augmente la stabilité des MTs. Enfin, l'activation de mTOR permet la synthèse de protéines et de lipides. L'ensemble de ces processus permettent l'élongation des neurites. (Adapté de Bennison et al., 2020)

c. Rôle des kinases du cycle cellulaire

Ces kinases connues pour réguler le cycle cellulaire, sont également impliquées dans divers processus dans les cellules post-mitotiques. C'est le cas de la kinase A Aurora, qui est un régulateur important de l'élongation des neurites dans les neurones corticaux. Suite à sa phosphorylation par la kinase aPKC, elle forme un complexe avec son substrat NDEL1 et régule la projection et l'invasion des microtubules dans les neurites en croissance (Mori et al., 2009). La Cyclin-dépendent kinase 5 (Cdk5), initialement connue pour son rôle dans la régulation de la mitose, est également impliquée dans l'élongation des neurites (**Figure 15**). Le complexe Cdk5-p35 est recruté au récepteur à la sérotonine (5-HTR6). 5-HTR6 est un récepteur couplé aux protéines G (de type RCPG). Cdk5 phosphoryle et active 5-HTR6 induisant l'activation de la GTPase Cdc42, un régulateur du cytosquelette d'actine pour aboutir *in fine* à l'élongation des neurites (**Figure 15**). Cet effet n'est pas dépendant de la présence du ligand du récepteur 5-HTR6 (Duhr et al., 2014).

Cdk5 agit également via le récepteur 5-HTR7 (**Figure 15**), un récepteur à activité tyrosine kinase. L'activation de 5-HTR7 et l'élongation des neurites nécessite la fixation du BDNF sur 5-HTR7. Une fois activée, Cdk5 est recrutée et phosphoryle 5-HTR7 et déclenche une cascade de signalisation impliquant la MAP kinase ERK et aboutissant à l'élongation des neurites. Les MAPK sont elles aussi impliquées dans la régulation de la croissance axonale. En effet, un gain de fonction des kinases Ras et ERK induit une augmentation de la longueur axonale *in vitro*. La régulation de l'élongation axonale par les MAPK est rendue possible par leur activité sur les facteurs de transcription et leur régulation du cytosquelette (Polleux and Snider, 2010).

La signalisation de 5-HTR7 implique également Cdc42 et MAP1B un régulateur des microtubules (Speranza et al., 2015). Ainsi les récepteurs 5-HTR6 et 5-HTR7 *via* Cdk5 régulent les cytosquelettes d'actine et de tubuline (**Figure 15**).

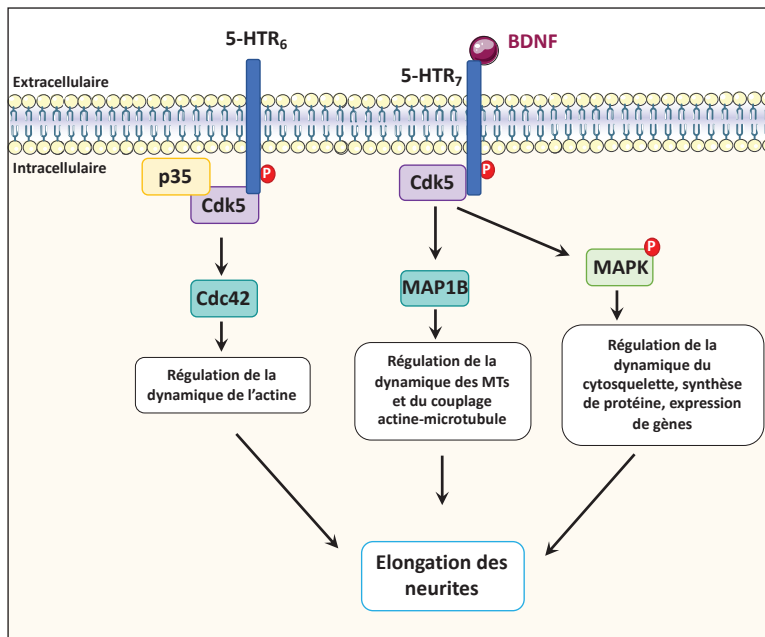


Figure 15 : Régulation de l'élongation axonale par Cdk5. La kinase Cdk5 forme un complexe avec la protéine p35, ce qui permet d'activer le récepteur et d'induire l'activation de la kinase Cdc42 qui promeut la dynamique de l'actine. En parallèle, l'activation du récepteur HTR7 par le BDNF permet son interaction avec Cdk5 ce qui engendre l'activation de MAPK comme ERK, ou encore induit l'augmentation de l'expression de MAP1B. Les trois effecteurs des récepteurs sérotonine permettent de réguler le cytosquelette, ERK induit en plus la synthèse de protéines et l'expression de gènes. (Adapté de Bennison et al., 2020)

3) Les voies impliquées dans le branchement axonal

Le branchement axonal est régulé spatio-temporellement par des facteurs extracellulaires tels que les neurotrophines (BDNF) (Jeanneteau et al., 2010), les molécules de guidage (netrine-1, éphrines, semaphorines)(Dent et al., 2004; Palmer and Klein, 2003; Pasterkamp, 2012), ou encore les morphogènes (Wnt)(Ciani and Salinas, 2005). L'ensemble de ces facteurs régule des processus intracellulaires comme la position des organelles ou l'expression des gènes, et peuvent être régulés par l'activité neuronale. Ces facteurs déclenchent l'activation de voies de signalisation qui régulent et coordonnent le remodelage local du cytosquelette et l'addition de nouvelle membrane plasmique par endocytose et exocytose. Dans ce paragraphe, je vais décrire le rôle des voies de signalisation PI3K-AKT-GSK3 β -mTOR et des Rho GTPases activées par le BDNF dans la régulation du cytosquelette pour branchement axonal. L'implication de la kinase LKB1 et de ces kinases cibles sera détaillée dans la partie III.

a. Signalisation PI3K, PTEN et GSK3 β

Comme nous l'avons décrit dans le paragraphe précédent, de nombreuses études ont montré l'importance de la voie de signalisation PI3K et de PTEN dans la croissance axonale au cours du développement. PI3K synthétise les phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PI(3,4,5)P3) et la phosphatase PTEN hydrolyse le phosphate situé en position 3 du phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP3), ce qui lui confère un rôle de régulateur négatif de la voie de signalisation intracellulaire contrôlée par la phosphatidylinositol-3 kinase. Dans les neurones, la production localisée de PI(3,4,5)P3 est associée (en plus de la polarité) à la mise en place de spots riches en actine, à la formation de filipodes, leur élongation et par conséquent à la formation de branches (Gallo, 2013; Ketschek and Gallo, 2010; Spillane et al., 2012). PTEN est très fortement exprimée dans les neurones. Elle participe à la régulation de l'activité de PI3K

au cours de l'élongation des axones. Les niveaux de PTEN aux extrémités des axones en croissance sont régulés via sa dégradation par le protéasome (Drinjakovic et al., 2010) ou l'accumulation du micro RNA-17-92 (Zhang et al., 2013).

Des travaux récents de Brosig et al. ont montré que l'activité de PTEN au site du futur filopode est régulée par son association avec la protéine PRG2 (plasticity-related gene 2 (PRG2)). PRG2 est une protéine membranaire appartenant à la famille des protéines LPPR (lipid phosphate phosphatase related). L'analyse de l'expression de PRG2 montre que cette protéine est exprimée *in vivo* durant les stades de développement du branchement axonal (E17-P1). Dans l'axone, PRG2 est localisée proche des patches d'actine où les filopodes se forment (Brosig et al., 2019). Une surexpression ou une diminution de l'expression de PRG2 induit respectivement une augmentation ou une diminution du nombre de filopodes uniquement dans le compartiment axonal (Brosig et al., 2019). PRG2 interagit avec PTEN et inhibe son activité préservant ainsi le pool de PI3P nécessaire à la signalisation de PI3K impliquée dans le remodelage de l'actine.

La voie PI3K/AKT est également impliquée dans la régulation de la synthèse de protéines. Elle permet l'activation de mTOR qui phosphoryle la protéine ribosomale S6 (S6K1/2) et l'inhibiteur de traduction 4E-BP1, ce qui permet l'augmentation de la traduction locale des ARNm contenant une coiffe et une région UTR en 5' (Lipton and Sahin, 2014).

b. La signalisation des MAP kinases

Jeanneteau et al. (2010) ont démontré le rôle de la signalisation des MAP kinases et de la phosphatase MKP1 dans le branchement axonal stimulé par le BDNF dans les neurones corticaux de rat (Jeanneteau et al., 2010). MKP1 est une phosphatase spécifique de certaines MAPKs. Cette famille comporte 11 membres et beaucoup sont exprimés dans le système nerveux. Lors des étapes de la formation de branches axonales, la fixation du BDNF sur son récepteur TrkB engendre l'activation de la kinase ERK ce qui induit l'expression de la protéine MKP1 (MAPK phosphatase 1) (Jeanneteau et al., 2010). Cette protéine régule négativement la protéine JNK qui est connue pour phosphoryler la stathmine et MAP1B (protéine associée aux microtubules 1B) qui stabilisent les microtubules (Chang et al., 2003). Ainsi, l'activation de MKP1 par le BDNF favorise la déphosphorylation et donc l'inactivation des kinases JNK et par conséquent l'activation de leur substrat les stathmines.

In vivo, une surexpression ou une diminution de l'expression de MKP1 dans les neurones corticaux induit respectivement une augmentation ou une diminution du branchement terminal (Jeanneteau et al., 2010).

La voie des MAP kinases régule aussi le branchement et l'expression protéique par l'activation de CREB (Zhou et al., 2012). Cependant, l'activité de CREB n'est pas suffisante pour promouvoir le branchement, elle nécessite l'interaction avec un co-activateur : CRT1 qui est

transloqué depuis le noyau par un mécanisme dépendant de l'activation des récepteurs NMDA par le glutamate (Finsterwald et al., 2010). L'augmentation de l'activité de CREB permet par exemple une augmentation de la transcription des gènes précoces comme c-fos et ARC nécessaire au branchement dendritique (Cohen et al., 2011)

La voie PI3K/AKT est impliquée dans la régulation de deux processus lors de la formation des branches axonales, la synthèse de protéines et la dynamique des microtubules. Elle permet d'une part l'activation de mTOR qui phosphoryle la protéine ribosomale S6 (S6K1/2) et l'inhibiteur de traduction 4E-BP1, ce qui permet l'augmentation de la traduction locale des ARNm contenant une coiffe et une région UTR en 5' (Lipton and Sahin, 2014).

Enfin, une diminution de l'expression de JIP3 (JNK-interacting protein kinase 3) induit une augmentation du branchement axonal par la diminution du niveau de GSK3 β . La diminution du branchement par la voie JIP3-GSK3 β est permise par la phosphorylation de la protéine associée aux microtubules, la doublecortine (DCX) (Bilimoria et al., 2010).

c. Les Rho GTPases

Les Rho GTPases régulent le cytosquelette d'actine et sont importantes pour la croissance axonale, la morphologie des axones et la plasticité synaptique. Cependant, leur implication dans ces processus semble être dépendante du type de neurones et du stade de développement ainsi que de l'activité électro-physiologique. Cdc42 a été impliquée dans la formation de l'axone mais ne joue pas un rôle prépondérant dans le branchement axonal (Schwamborn et al., 2009).

RhoA a un effet inhibiteur sur la formation des branches axonales en permettant la régulation négative de la formation de filopodes (Loudon et al., 2006). Ainsi, l'inhibition de RhoA induit une diminution du branchement axonal dans des cultures de neurones embryonnaires de l'hippocampe. Cependant dans ces mêmes cultures, l'expression d'un mutant RhoA constitutivement actif n'a pas d'effet sur le branchement (Ahnert-Hilger et al., 2004).

L'activation ou l'inhibition de RhoA dans des cultures organotypiques de cortex induit respectivement, une augmentation ou une diminution des branchements (Ohnami et al., 2008). Cette augmentation est dépendante de l'activité neuronale. En effet, elle est bloquée par l'inhibition des récepteurs aux glutamates et des canaux sodium.

Une autre famille de GTPases est impliquée dans le branchement : la famille des kinases Rac. Rac3 est exprimée dans le système nerveux et son expression augmente au moment du branchement des axones (Albertinazzi et al., 1998) indiquant ainsi une possible implication dans ce mécanisme. RhoG inhibe la formation des branches axonales des neurones de l'hippocampe, cette action implique le signal ELMO/Dock180/Rac1 (Franke et al., 2012).

Enfin, les GTPases Ras sont également impliquées dans la régulation du branchement axonal. Une étude a montré que R-Ras induit le branchement axonal via l'inhibition de GSK3 β par la signalisation PI3K/Akt (Iwasawa et al., 2012). En effet, les Ras GTPases activent PI3K par interaction avec la sous-unité PI3K-p110 (Yang et al., 2012). D'autres GTPases sont également capables d'activer PI3K (Rho, Rac1-3) et la contribution de PI3K à leur action sur le branchement axonal reste à déterminer.

D- Rôle de l'activité neuronale pour la formation des circuits et conséquences physiopathologiques

1) Activité neuronale et formation des circuits

Dans les neurones pyramidaux, le nombre de connexions homolatérales (dans le même hémisphère : ipsilatéral) est largement supérieur au nombre de connexion dans l'hémisphère opposé (contralatéral) (Swanson et al., 2017). Bien que les connexions contralatérales soient moins nombreuses, il a été proposé plusieurs modèles quand à la formation de la connectivité inter-corticale. Le premier modèle est que durant le développement, des projections axonales de chaque aires se forment de façon exubérante et aspécifique et, seule une petite partie de ses projections est conservée et stabilisée pour la formation d'un connectome mature. Le deuxième modèle est que les projections sont prédéterminées et qu'elles se forment directement dans les régions spécifiques cibles. Les premières études ont montré que la formation des neurones callosaux est permise par l'élimination de projections transitoires durant le développement (O'Leary et al., 1981). Les neurones forment des projections et persistent là où ils reçoivent des projections afférentes à l'état adulte (Innocenti and Price, 2005). Cependant, d'autres études ont montré par marquage antérograde que les projections axonales ne se développent que dans les régions qui seront conservées à l'état mature (Innocenti, 1981; Ivy and Killackey, 1981). Ce phénomène a aussi été observé plus récemment utilisant la technique d'électroporation *in utero* (Fenlon et al., 2017).

L'ensemble de ces résultats montrent que différents processus sont impliqués dans la mise en place de la connectivité neuronale et en particulier, la mise en place des projections axonales intra-corticales et peuvent être considérés comme différents modèles. Ainsi, il y a tout d'abord une formation aléatoire de connectivité avec formation de projections transitoires qui seront éliminés durant le raffinement post-natal des circuits. Puis, une interaction, durant le développement, entre les axones et leur cible permet une sélection des axones qui persisteront après maturation. L'étape finale d'élaboration et de stabilisation des connectivités (branches) à leur cible spécifique est dépendante de l'activité spontanée des axones (Mizuno et al., 2007; Wang et al., 2007). En effet, il été a montré, par l'utilisation de Kir2.1 (inhibiteur de l'activité neuronale), que d'une part l'activité neuronale présynaptique est nécessaire à la formation du branchement des projections axonales en couche II/III et, d'autre part, que l'activité post-synaptique est peu impliquée dans le branchement terminal

(Mizuno et al., 2007). Enfin, il a été montré avec l'utilisation d'inhibiteur de l'exocytose des vésicules synaptiques (TeNT) que l'activité synaptique est nécessaire au branchement collatéral (Wang et al., 2007). Peu de temps après, la contribution des activités neuronales post et pré-synaptique a pu être détaillée (Mizuno et al., 2010; Tagawa and Hirano, 2012) avec la mise en évidence de l'implication de l'activité neuronale pré-synaptique à partir du stade P7, stade d'envahissement du côté contralatéral. L'activité post-synaptique quant à elle n'est nécessaire qu'à partir du stade P9, au début de la formation de branches terminales (Mizuno et al., 2010).

2) Conséquences physiopathologiques des défauts de branchement axonal

Enfin, des défauts de fonctionnels des circuits corticaux sont associés à des pathologies neuro-développementales comme des troubles du spectre autistique (ASD) ou la schizophrénie (del Pino et al., 2018).

L'utilisation de l'IRM (imagerie par résonance magnétique) a permis d'identifier des défauts dans les circuits corticaux de patients ASD (Courchesne and Pierce, 2005). Cette étude montre que dans les patients ASD, la connectivité à longue distance est diminuée alors que celle à courte distance est augmentée dans le cortex frontal (Courchesne and Pierce, 2005).

La kinase NUA1 est un gène candidat pour les troubles du spectre autistique (Iossifov et al., 2012). En 2018, l'équipe a montré qu'une haploinsuffisance de NUA1 provoque des défauts dans les neurones corticaux, *in vitro* et *in vivo*, comme une diminution du branchement axonal ou une augmentation du trafic des mitochondries (Courchet et al., 2018). Ces défauts ont été corrélés avec des troubles du comportement. Les souris NUA1^{+/-} ne présentent pas de défauts olfactif, visuel et moteur. En revanche, elles présentent une diminution de la mémoire spatiale, et de la mémoire à court terme. De plus, ces souris ont un comportement social altéré, en effet, lors du test des 3 chambres, les souris NUA1^{+/-} préfèrent le contact d'une souris connue plutôt que d'une souris inconnue contrairement aux souris sauvages (Courchet et al., 2018). L'ensemble des résultats de cette étude montre que la perte d'un allèle *Nuak1* implique des défauts de comportement comparable à ceux observés dans les cas de trouble du spectre autistique, schizophrénie ou encore une infirmité intellectuelle (Courchet et al., 2018).

Plus récemment, l'étude d'un modèle de syndrome de Digeorge (22q11) a permis de montrer que la connectivité neuronale est diminuée dans le cortex de ces souris (Fernandez et al., 2019). Ce syndrome, causé par une délétion dans le chromosome 22, induit de nombreux troubles comme des malformations cardiaques, des problèmes immunitaires mais il a également été associé à des troubles neuro-développementaux tels que l'anxiété, la schizophrénie ou encore des troubles du spectre autistique (Meehan et al., 2015). Ainsi l'équipe de A.S. Lamantia a montré, grâce à l'imagerie, que les connexions à longues distances sont altérées chez les souris 22q11. Cette connexion longue distance est altérée par une

diminution de la complexité axonale (longueur et branches) et celle-ci est associée à un défaut dans le fonctionnement des mitochondries, plus précisément à une augmentation des ROS (Fernandez et al., 2019). Cette étude permet donc d'établir un lien entre la complexité axonale, le métabolisme et des troubles du comportement.

Ainsi, les défauts de mise en place des circuits impliqués dans les pathologies neuro-développementales montre l'importance de l'étude du développement cortical.

II- Le BDNF

A- Historique

Le développement du réseau neuronal est régulé par des facteurs intrinsèques comme les voies de signalisation et extrinsèques comme les neurotrophines (Park and Poo, 2013). Les neurotrophines (NT) constituent une famille de protéines impliquée dans la croissance, la différenciation, la survie et la plasticité des neurones. La première neurotrophine, le NGF (Nerve Growth Factor), a été découverte en 1954. Rita Levi-Montalcini et Viktor Hamburger ont mis en évidence la sécrétion d'un facteur soluble favorisant la survie et le développement de fibres neuronales sympathiques (Levi-Montalcini et al., 1954). Des études *in vitro* réalisées par Stanley Cohen en 1960 ont permis d'isoler et d'identifier le NGF comme un facteur de croissance des cellules neuronales. Rita Levi-Montalcini et Stanley Cohen ont reçu le prix Nobel de "Physiologie ou Médecine" en 1986 pour leur découverte du NGF. En 1982, Barde et al. ont isolé, à partir de cerveaux de porcs, un nouveau polypeptide capable de promouvoir la survie et la croissance de neurones en culture. Ils le nomment Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) (Barde et al., 1982). Depuis d'autres facteurs neurotrophiques ont été identifiés et regroupés par similarités de structure. La famille des neurotrophines a été construite selon leur ressemblance au NGF et comprend le NGF (Nerve Growth Factor), la neurotrophine 3 (NT-3), le brain-derived neurotrophic factor (BDNF) et la neurotrophine 4/5 (NT-4/5) chez les mammifères. Dans les paragraphes suivants, je vais décrire la structure du gène du BDNF et son expression cellulaire et tissulaire à travers la description des différents transcrits du BDNF. Dans un deuxième temps, je détaillerai la synthèse, la maturation du BDNF ainsi que son mode d'action à travers ses récepteurs TrkB et p75^{NTR}. J'aborderai aussi la signalisation et le trafic intracellulaire de ces récepteurs.

B- Le BDNF : du gène à la protéine

1) Structure et expression du gène *Bdnf*

Le gène codant pour le BDNF est localisé, respectivement, sur les chromosomes 11, 2 et 3 chez l'Homme, la souris et le rat. Il est composé de 11 exons chez l'homme et de 9 chez la souris et le rat (**Figure 16**) (Aid et al., 2007; Hofer et al., 1990; West et al., 2014). Les exons 1, 2, 4 et 6 sont très conservés entre l'Homme et les rongeurs (Tognoli et al., 2010). La transcription du gène *Bdnf* induit de multiples variants de l'ARN messager du BDNF qui codent tous pour la même protéine. La séquence codante est entièrement comprise dans l'exon 9.

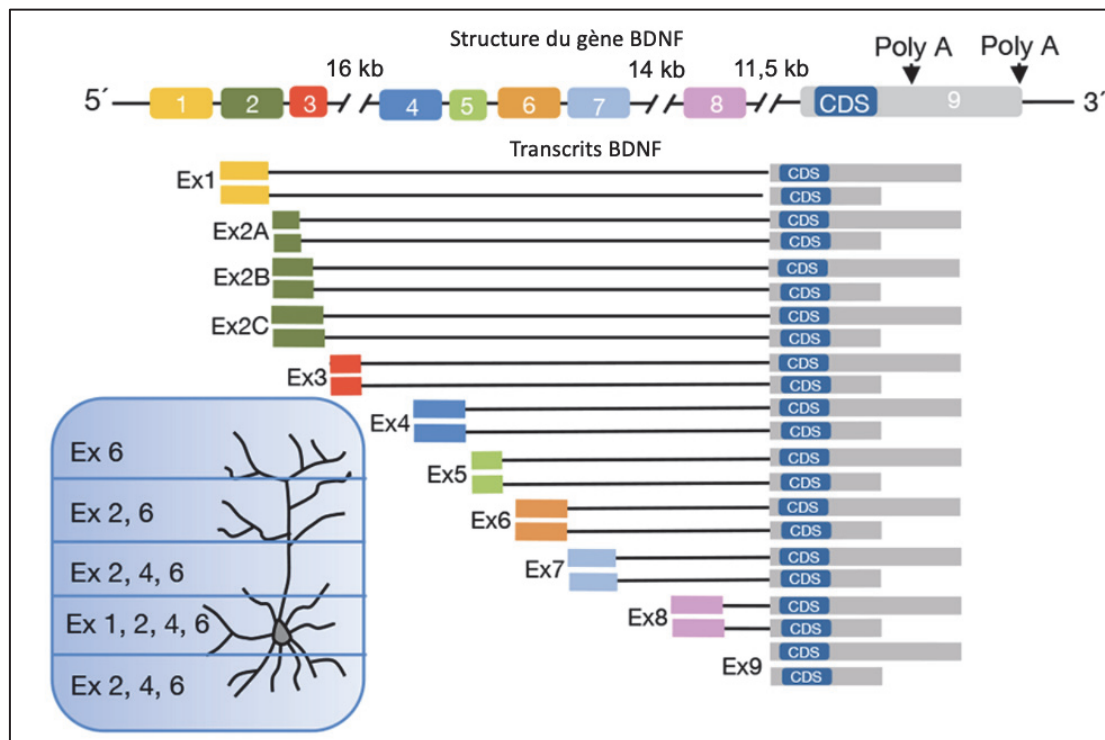


Figure 16 : Structure du gène BDNF et représentation schématique des zones d'expression des ARNm messagers de BDNF en fonction des différents promoteurs. Le gène codant pour le BDNF est composé de 9 exons. L'expression des différents exons de BDNF permet une expression région dépendante. Les exons 2,4 et 6 promeuvent l'expression dans le soma et les dendrites proximales, l'exon 6 est le seul à promouvoir l'expression dans les dendrites distales. (Adapté de De Vicenti et al., 2019)

La machinerie de transcription du BDNF utilise 9 promoteurs différents, ainsi, l'épissage alternatif de la région 5'UTR et les différences de longueur de la région 3'UTR mènent à la formation de 22 transcrits différents (Timmusk et al., 1993, 1995) (**Figure 16**).

Ainsi, deux mécanismes contrôlent la localisation intracellulaire : la longueur de la région 3'UTR et l'expression des exons.

De plus, l'expression des différents promoteurs permet de cibler la zone où est exprimée le BDNF. A titre d'illustration, le promoteur 4 dirige l'expression du BDNF dans le cerveau et le pancréas (Aid et al., 2007; Liu et al., 2006; Timmusk et al., 1995).

Plus précisément, l'équipe de T. Timmusk a pu décrire l'expression du BDNF dans différentes régions du cerveau. Ainsi, certains ARNm sont exprimés dans toutes les régions du cerveau comme les exons 1 et 3 alors que l'exon 5 par exemple est plus particulièrement exprimé dans le cortex et l'hippocampe. En outre, les niveaux d'expression de chacun des exons au cours du temps ont été observés, de ce fait, au stade embryonnaire E15, c'est l'exon 4 qui prédomine alors que les exons 1 et 3 sont peu exprimés. Ainsi, on peut constater que certains exons dominants à l'âge adulte sont très peu exprimés durant le développement, ce qui montre une spécificité spatio-temporelle des différents exons (Aid et al., 2007).

L'expression des différents exons quant-à-elle dirige l'expression dendritique du BDNF (Baj et al., 2011) (**Figure 16**). Par exemple les exons 1 et 4 sont exprimés dans les dendrites proximales alors que les exons 2C et 6 sont exprimés les dendrites distales des neurones pyramidaux de l'hippocampe (Baj et al., 2011). Une ségrégation identique des ARNs a aussi été retrouvée dans les neurones corticaux (Pattabiraman et al., 2005).

Le deuxième mécanisme mis en place pour réguler l'expression de BDNF est la longueur de la région 3'UTR. En effet, il a d'abord été démontré en 2008 chez la souris, que si la région 3'UTR de l'ARNm est courte, l'ARNm se localise dans le corps cellulaire alors que si elle est longue, l'ARNm est transporté dans les dendrites pour une traduction locale (An et al., 2008) (**Figure 17**). Quel signal permet de cibler les ARNm aux dendrites ? Une étude *in vitro*, dans les neurones de l'hippocampe de rat, montre que la région codante commune à tous les transcrits BDNF contient le signal pour la localisation aux dendrites (Chiaruttini et al., 2009). Cependant dans cette étude, les exons 1 et 4 sont localisés dans le soma et non les dendrites. L'utilisation d'ARN interférents ciblant la transline couplé à une expérience d'immunoprécipitation, montre que ce complexe interagit avec les ARNm de BDNF sur le site G196 (Chiaruttini et al., 2009). La transline est une protéine qui interagit avec l'ADN et les ARN simple brin et qui forme un complexe hétérodimérique avec Trax (Translin associated factor x). Une mutation ponctuelle du site G196 induit la perte de la translocation aux dendrites, et les ARN mutants G196A sont localisés dans le compartiment somatique. Ainsi, la translocation des ARNm aux dendrites distales est permise par la liaison du complexe transline/Trax sur l'ARNm BDNF *via* son site G196. Cette étude montre que la séquence nécessaire à la fixation de transline/Trax est absente dans les transcrits des exons 1 et 4 ce qui induit leur localisation somatique (Chiaruttini et al., 2009).

En 2015, une nouvelle étude a montré dans des neurones de l'hippocampe chez le rat, que les ARNm BDNF ayant des régions 3'UTR courtes ou longues sont transportées dans les dendrites par des mécanismes différents (Vicario et al., 2015). Ce transport implique la longueur de la région 3'UTR et passe par différents mécanismes. Ainsi, les ARNm BDNF avec une région 3'UTR courte répondent à une stimulation par NT-3 et requiert l'activité de protéines telles que CPEB-1,2 et ELAV-2,4. En revanche, les ARNm BDNF constitués d'une longue région 3'UTR répondent à une stimulation par le BDNF et font intervenir un mécanisme plus complexe qui met en jeu la sécrétion du BDNF dépendante du BDNF lui-même, de ELAV-1,3,4, de FMRP et de FXRP2 (Vicario et al., 2015).

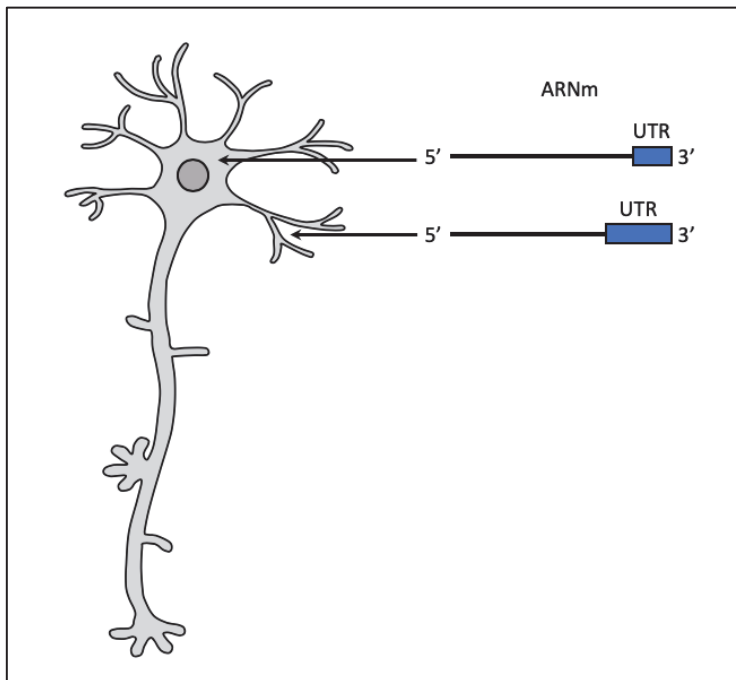


Figure 17 : Schéma des zones d'expression des ARNm messagers de BDNF en fonction de la longueur des régions 3'UTR. Les ARNm possédant une longue région 3'UTR sont localisés dans les dendrites, alors que ceux possédant une courte région 3'UTR sont dans le corps cellulaire. (UTR : "Untranslated Transcribed Region" ; Région non traduite)

2) Synthèse et maturation de la protéine

Comme la plupart des hormones et des facteurs de croissances, le BDNF est synthétisé sous forme d'une protéine précurseur, le pré-proBDNF qui acquiert sa structure tridimensionnelle dans le réticulum endoplasmique. Le peptide signal constitué des 18 premiers acides aminés du pré-proBDNF permet de l'adresser dans les voies de sécrétion où il sera clivé lors de son transfert dans le réseau *trans* de l'appareil de Golgi (Lu, 2003), formant ainsi le pro-BDNF (**Figure 18**).

Le pro-BDNF est également clivé, au niveau intra- ou extracellulaire, pour donner la forme mature qu'est le BDNF (Foltran and Diaz, 2016; Mizui et al., 2016). Le clivage intracellulaire du pro-BDNF peut avoir lieu dans le réseau trans-golgi par des endoprotéases de la famille des subtilisine-kexine comme les furines ou, dans des vésicules de sécrétion par des convertases (Lu et al., 2005; Mowla et al., 1999). Le clivage extracellulaire est assuré par la plasmine (tPA : tissu plasminogen activator) (Lee et al., 2001) en association avec les métalloprotéase (MMP3, 7 et 9) de la matrice (Lee et al., 2001; Pang et al., 2004) (**Figure 18**).

L'efficacité de clivage du pro-BDNF en BDNF diffère au cours du développement ; en effet, du nouveau-né à l'adolescence les deux formes sont exprimées de façon égale alors qu'à l'âge adulte le BDNF domine (Yang et al., 2014).

Pendant longtemps, les chercheurs ont pensé que seul le BDNF mature était biologiquement actif et que le pro-BDNF n'était qu'un précurseur. Contre toute attente, une étude réalisée en 2001 montre que le pro-BDNF peut se fixer de façon indépendante sur le récepteur p75^{NTR} et pas sur TrkB qui fixe le BDNF mature (Lee et al., 2001; Woo et al., 2005). La fixation à son récepteur induit l'activation de voies de signalisation qui seront détaillées par la suite.

Le BDNF et tPA sont tous les deux impliqués dans la phase tardive de la stimulation à long terme (LTP : Potentialisation à long terme) et la mémoire à long terme. L'étude de P. T. Pang montre que le BDNF est capable de restaurer la LTP alors qu'un mutant pro-BDNF non clivable ne permet pas cette restauration. Cette étude suggère que la conversion du pro-BDNF en BDNF promeut la LTP dans les neurones hippocampaux (Pang et al., 2004).

Le BDNF produit dans le corps cellulaire est transporté dans les axones et les dendrites à sa sortie de l'appareil de Golgi. Il est transporté dans des vésicules à cœur dense le long de l'axone et jusqu'à la région présynaptique comme l'ont montré des travaux utilisant du BDNF marqué radioactivement (von Bartheld et al., 1996; Moller et al., 1998)

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, les ARNm du BDNF peuvent aussi être transportés et traduits localement. L'exocytose des vésicules contenant le BDNF peut être déclenchée suite à une augmentation du calcium intracellulaire. Cette dernière fait suite à une dépolarisation membranaire (activation des canaux calciques *via* les récepteurs NMDA ou activation des canaux calciques voltage dépendants). La kinase CaMKII activée par le calcium entraîne la fusion des vésicules de sécrétion (Kolarow et al., 2007) et la libération du BDNF au niveau pré-synaptique. Le BDNF peut également être stocké après endocytose au niveau post-synaptique constituant ainsi une réserve prête à être mobilisée lors de l'augmentation de l'activité neuronale (Santi et al., 2006; Wong et al., 2015).

Le développement d'anticorps monoclonaux ou de lignées de souris tagguées ont permis à l'équipe de Y-A. Barde d'identifier la localisation subcellulaire du BDNF. Pour observer la localisation du BDNF dans les cerveaux matures, l'équipe a ciblé les projections de fibres moussues des cellules granulaires dans le CA3 (une des régions exprimant le plus le BDNF). Ainsi, ils montrent que le BDNF est préférentiellement localisé et nouvellement synthétisé dans le compartiment présynaptique dans les vésicules à corps dense (Dieni et al., 2012). Cependant, des évidences suggèrent que le BDNF peut être synthétisé et sécrété depuis d'autres composants des synapses comme les astrocytes (Parpura and Zorec, 2010), la microglie (Parkhurst et al., 2013), les dendrites post-synaptiques (Leßmann and Brigadski, 2009) ainsi que les cellules endothéliales constituant les vaisseaux sanguins (Goldman and Chen, 2011).

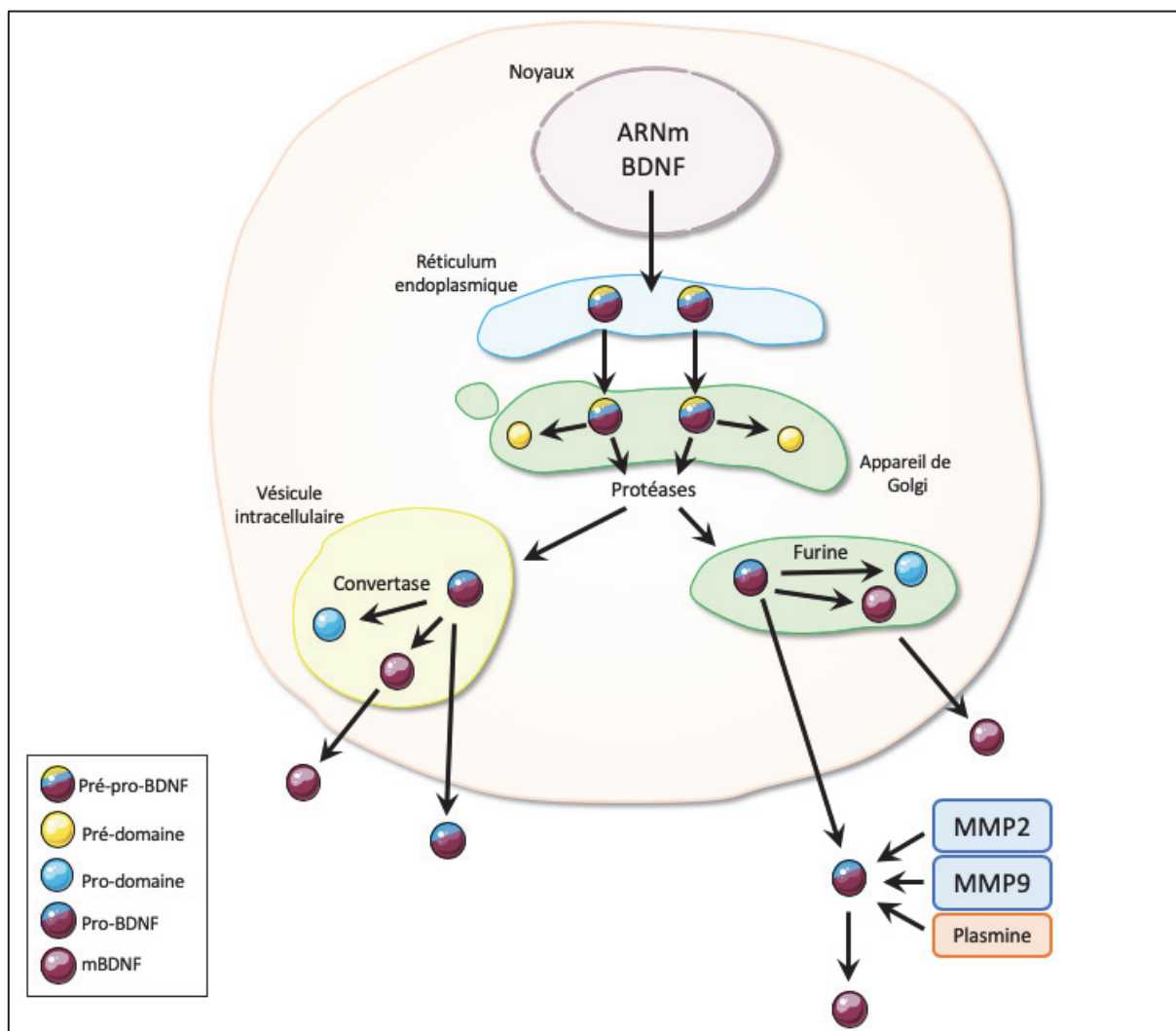


Figure 18 : Représentation schématique de la maturation du BDNF. Le pré-pro-BDNF est d'abord converti en pro-BDNF par les protéases intracellulaires puis en BDNF. Cette dernière conversion peut se faire au niveau intracellulaire par les furines et les convertases ou au niveau extracellulaire grâce aux métalloprotéase et à la plasmine. (Adapté de Kowianski et al., 2018)

C- Les récepteurs au BDNF

1) Les récepteurs Trk (Tropomyosine Related Kinase)

Les principaux récepteurs aux neurotrophines sont les récepteurs Trk (Tropomyosine-related Kinase) qui sont des récepteurs à activité tyrosine kinase. La liaison des neurotrophines sur le domaine extracellulaire de leur récepteur induit leur dimérisation, ce qui entraîne l'activation du domaine intracellulaire tyrosine kinase (Huang and Reichardt, 2001). Il existe trois récepteurs Trk et chaque neurotrophine se fixe spécifiquement à un de ces récepteurs ; le NGF se fixe spécifiquement sur TrkA, BDNF et NT-4 sur TrkB et NT-3 sur TrkC.

Le récepteur TrkB est composé d'un domaine extracellulaire liant le BDNF et NT-4, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire contenant le domaine tyrosine kinase (**Figure 19**). Le domaine extracellulaire est composé de trois domaines riches en leucines entourés par des domaines riches en cystéines, ainsi que deux domaines de la famille

des immunoglobulines (Ig1 et 2) (**Figure 19**). L'interaction des récepteurs et de leurs ligands se fait entre l'Ig2 et la structure en boucle de la neurotrophine (Allen et al., 2013; Banfield et al., 2001; Naylor et al., 2002; Wiesmann et al., 1999) (**Figure 19**). Suite à la fixation du BDNF, TrkB forme un dimère et les deux récepteurs homodimérisés autophosphorylent les résidus tyrosine de leur partie intracytoplasmique.

Le récepteur TrkB existe sous trois isoformes : une forme longue et deux formes tronquées TrkB.T1 et T2 (Middlemas et al., 1991). Les deux isoformes tronquées ne présentent pas de domaine tyrosine kinase (**Figure 19**). La forme tronquée T1 provient d'un épissage alternatif de l'ARNm de TrkB au cours duquel l'exon codant pour le domaine kinase est éliminé, excluant ainsi les sites d'autophosphorylations de TrkB. Cette forme est plus particulièrement exprimée dans les cellules gliales (Rose et al., 2003). La forme tronquée T1 peut agir comme inhibiteur dominant négatif du BDNF. En effet, TrkB.T1 se lie à l'isoforme longue de TrkB afin de créer un hétérodimère diminuant ainsi la proportion de TrkB capable de former des homodimères et inhibant à son tour la signalisation BDNF (Biffo et al., 1995; Eide et al., 1996). Ainsi, TrkB.T1 possède un rôle de régulateur de TrkB (Carim-Todd et al., 2009). Cependant, des travaux ont montré que ce récepteur pouvait avoir des effets propres (Ohira et al., 2006; Rose et al., 2003). Par exemple, TrkB.T1 est impliqué dans le remodelage du cytosquelette par la régulation de RhoA dans les cellules gliales (Ohira et al., 2006). Une étude récente montre que la forme tronquée TrkB.T1 est la forme la plus exprimée dans les astrocytes et que la signalisation BDNF/TrkB.T1 permet la mise en place de la morphologie des astrocytes (Holt et al., 2019). De plus, une diminution de l'expression de TrkB.T1 dans les souris induit une perte de la maturation des astrocytes (Holt et al., 2019). Ainsi, l'ensemble de ces résultats montrent que la forme tronquée de TrkB induit ses propres effets biologiques.

Très récemment, il a été montré que l'ARNm codant pour le récepteur TrkB existe sous différentes isoformes dépendantes de la longueur de la région 3'UTR (tout comme le BDNF). Cette étude montre que la distribution des récepteurs TrkB dans les neurones corticaux est dépendante de la longueur de la région 3'UTR (Chen et al., 2020). En effet, si globalement les ARNm de TrkB sont plus présents dans le soma, les auteurs montrent que les ARNm de TrkB avec un long 3'UTR sont plus présents dans les dendrites que la forme possédant une courte région 3'UTR. La même expérience a été réalisée avec la forme tronquée TrkB.T1 et montre à nouveau que les transcrits possédant une longue région 3'UTR sont préférentiellement dans les dendrites par rapport aux transcrits avec une courte région 3'UTR (Chen et al., 2020).

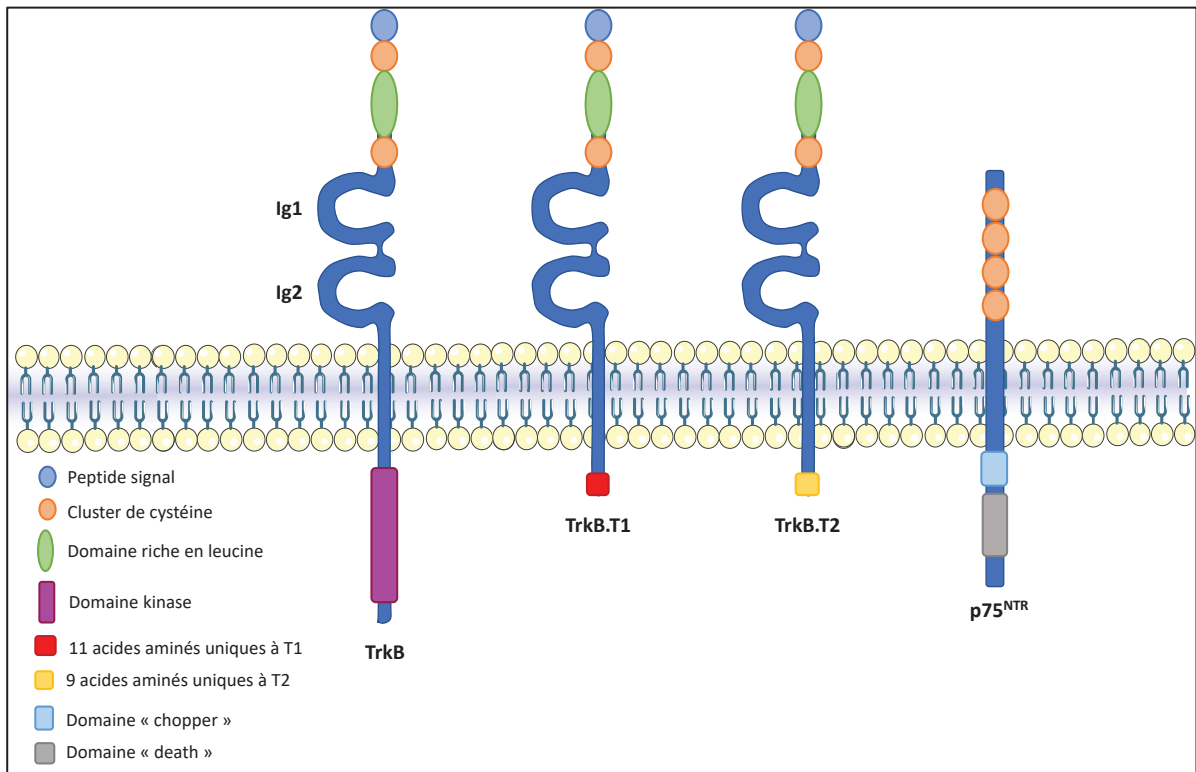


Figure 19 : Schéma des différentes isoformes du récepteur TrkB et du récepteur p75^{NTR}. Le récepteur TrkB possède un domaine kinase et deux domaines Ig, les deux isoformes tronquées n'ont pas de domaine kinase et possèdent des petites séquences spécifiques d'acides aminés. Le récepteur p75^{NTR} possède deux domaines intracellulaires "chopper" et "death" par lesquels il va induire différentes signalisations.

2) Le récepteur p75^{NTR}

Le deuxième récepteur au BDNF, p75^{NTR} (p75 Neurotrophin Receptor) est membre de la famille des récepteurs aux TNF (tumor necrosis factor). Le récepteur p75^{NTR} est un récepteur pan-neurotrophique, qui a la capacité de fixer toutes les neurotrophines (Chao, 1994). Ce récepteur est composé de quatre répétitions de cystéines négativement chargées, les deux dernières permettant la liaison aux ligands. Le domaine juxta-membranaire "chopper" est requis et suffisant pour induire la mort cellulaire neuronale (Coulson et al., 1999, 2000) (**Figure 19**). L'activité pro-apoptose du domaine « chopper » requiert sa partie transmembranaire. Un mutant "chopper" dépourvu de son domaine d'ancrage dans la membrane est capable d'inhiber la mort cellulaire induite par une surexpression de p75^{NTR}. La dernière partie intracellulaire de p75^{NTR} est un domaine « TNFR-like death domain ».

Les différentes isoformes du BDNF ont des affinités différentes pour les récepteurs TrkB et p75^{NTR} (**Figure 20**). Le pro-BDNF et le BDNF mature se fixent et sont capables d'activer p75^{NTR} tandis que seul le BDNF mature se fixe et active TrkB. Par conséquent, le taux de clivage, soit dans le trans Golgi, soit après sécrétion, détermine les niveaux d'activation respectifs de p75^{NTR} et de TrkB et donc l'action biologique du BDNF à un endroit précis de la cellule neuronale par exemple. Il est important de noter que le pro-domaine du BDNF généré après clivage est très stable et permet l'activation de différentes voies de signalisation indépendamment du BDNF. En effet, le pro-BDNF peut également moduler les circuits

neuronaux en développement ou matures (Lee et al., 2001; Lu et al., 2005; Teng et al., 2005; Yang et al., 2009). La signalisation issue des deux récepteurs après fixation de leurs ligands est influencée par des co-récepteurs dont la sortiline. La sortiline est une protéine d'environ 100 kDa qui possède un unique domaine transmembranaire qui s'associe à d'autres récepteurs membranaires. Elle ne possède pas d'activité catalytique. Elle intervient dans la fixation extracellulaire du pro-BDNF au récepteur p75^{NTR}. Le pro-domaine du pro-BDNF se fixe à la sortiline et le BDNF à p75^{NTR} (Leloup et al., 2018; Teng et al., 2005) (**Figure 20**). Il est intéressant de noter que les deux co-récepteurs à p75^{NTR} sont aussi impliqués dans l'action de TrkB. En effet, il a été montré que l'interaction entre TrkB et SorCS2 (Sortilin Related VPS10 Domain Containing Receptor 2) induit le transfert de TrkB dans les domaines post-synaptiques et contribue au maintien de la LTP (Glerup et al., 2016).

L'interaction du pro-BDNF avec p75^{NTR} active de nombreuses voies de signalisation intracellulaires différentes de celles activées par la liaison TrkB-BDNF (Teng et al., 2005). L'activité intracellulaire induite par l'interaction proBDNF-p75^{NTR} est souvent opposée à celle du BDNF. A titre d'illustration, dans un cerveau adulte, l'activation de TrkB par le BDNF renforce les connexions synaptiques et augmente la LTP, à l'inverse, l'activation de p75^{NTR} par le pro-BDNF inhibe les connexions synaptiques et induit la LTD (dépression à long terme) (Lu et al., 2005). Les différentes voies de signalisation et les effets biologiques correspondants seront développés dans les paragraphes suivants.

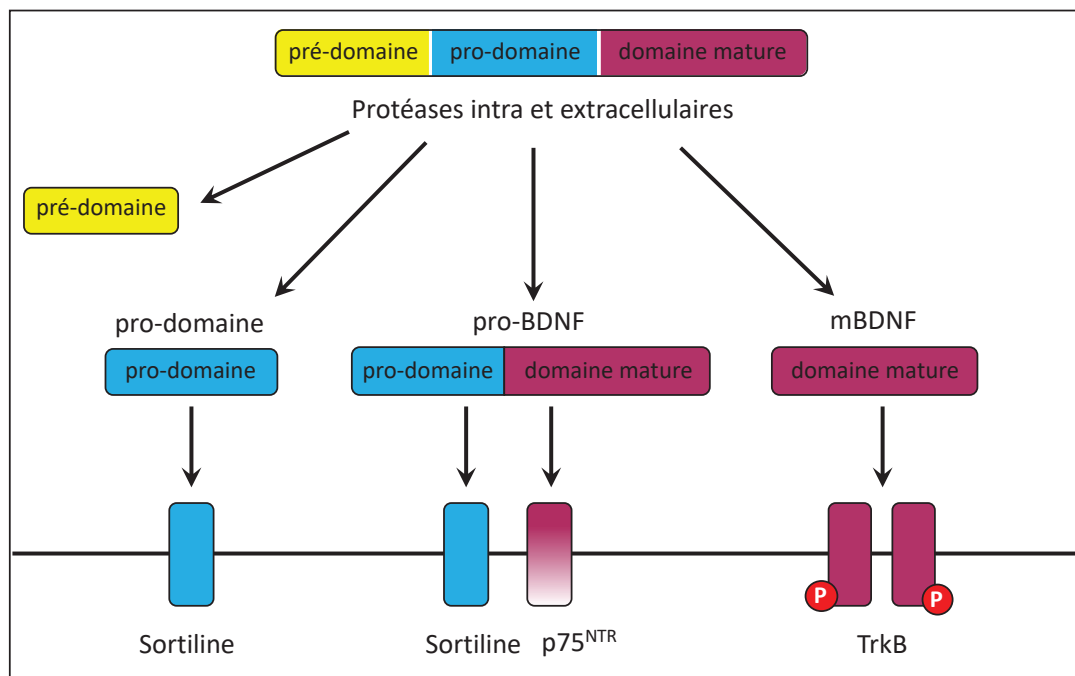


Figure 20: Représentation schématique de la fixation des différentes formes du BDNF sur leurs récepteurs. La maturation du BDNF passe par le clivage des différents domaines. Après clivage, 4 formes de BDNF sont formées. Le pré-domaine qui va être éliminé, et trois formes qui vont activer différents récepteurs. Le pro-domaine se fixe sur la sortiline, le pro-BDNF se fixe sur le récepteur p75^{NTR} et sur son corécepteur sortiline, alors que le BDNF mature va se fixer sur TrkB et induire sa dimérisation par autophosphorylation. (Adapté de Kowianski et al., 2018)

3) Le récepteur TrkB : de l'expression membranaire à la signalisation

a. Transport du récepteur à la membrane

Afin d'être disponible pour la fixation des neurotrophines, les récepteurs TrkB doivent être exprimés à la membrane plasmique. Pour cela, le récepteur est transporté depuis le soma vers les membranes de façon antérograde.

Le transport antérograde est permis par deux mécanismes. Le premier mécanisme implique la protéine Rab27B. Rab27B est une protéine présente dans les vésicules de sécrétion (Chiang et al., 2011), ce qui laisse à penser que le trafic par Rab27B contribue au trafic des récepteurs TrkB nouvellement synthétisés. Rab27B permet le transport de TrkB par la création d'un complexe qui implique Slp1 (ou exophilin 7) et CRMP-2 (collapsin response mediator protein-2). Dans ce contexte, Rab27B permet l'interaction de TrkB sur son domaine intracellulaire à Slp1 qui lui-même interagit avec CRMP-2. Ce complexe interagit avec la kinesine-1 *via* la protéine CRMP-2, ce qui va permettre le transport de TrkB dans l'axone (Arimura et al., 2009). Le deuxième mécanisme permettant le transport antérograde de TrkB est permis par la protéine JIP3 (c-Jun NH2-terminal kinase interacting protein 3). L'implication de JIP3 dans le transport de TrkB est indépendante du transport par Rab27B (Huang et al., 2011). JIP3 est une protéine elle aussi présente sur les vésicules et elle permet le recrutement de la protéine de transport kinésine 1 (Bowman et al., 2000; Marchesin et al., 2015). TrkB est transporté de façon antérograde par les deux mécanismes en parallèle. Cependant, une déplétion de JIP3 induit une diminution du transport vers l'axone mais pas vers les dendrites. Cela indique donc que le transport par JIP3 est spécifique au transport de TrkB vers les axones.

De plus, lorsque l'expression de l'une des protéines du complexe Rab27B-Slp1-CRMP-2 est inhibée ou que l'expression de JIP3 est inhibée, une diminution de la phosphorylation de ERK par BDNF-TrkB est observée (Arimura et al., 2009; Huang et al., 2011), indiquant que le transport antérograde est nécessaire à la signalisation de TrkB.

b. Régulation du transport à la membrane

L'insertion de TrkB à la membrane est principalement régulée par l'activité neuronale. En effet, il a été montré qu'une dépolarisation des membranes induite par du K^+ augmente la concentration de TrkB à la surface de cellules rétinienne ganglionnaires et des neurones de la moelle épinière (Meyer-Franke et al., 1998). Cependant, cette insertion peut se produire par l'effet des neurotrophines. Dans les neurones hippocampaux, une exposition aiguë au BDNF induit l'augmentation de l'expression de TrkB en quelques secondes (15s) à la surface des membranes (Haapasalo et al., 2002).

En outre, cAMP (adenosine monophosphate cyclique) régule la signalisation TrkB par deux mécanismes. Premièrement, le cAMP contrôle la phosphorylation de TrkB induite par la fixation du BDNF sur ce dernier. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de cAMP diminue la phosphorylation de TrkB sur le site 785, alors que celle-ci est augmentée avec des analogues

de cAMP. Deuxièmement, cAMP induit la localisation de TrkB dans les zones de forte densité post-synaptique en facilitant l'interaction entre TrkB et de la protéine d'échafaudage PSD-95 (Ji et al., 2005).

Enfin, une fois insérés à la membrane, les récepteurs Trk sont transloqués dans les rafts lipidiques. Les zones de rafts lipidiques sont des zones avec une forte concentration de lipides et de protéines de signalisation comme les protéines possédant une ancre GPI (Rietveld et al., 1999), les protéines liées au cholestérol et palmitoylées comme Hedgehog (Rietveld et al., 1999) ou encore les protéines doublement acétylées comme certaines protéines G de la famille des kinases Src ou les sous-unités α des protéines G (Resh, 1999). Les rafts sont enrichis au niveau des synapses, des dendrites et des axones terminaux.

Dans les rafts, la proximité des récepteurs TrkB et des protéines de signalisation permet de rendre les récepteurs plus effectifs pour transduire les signaux.

La translocation de TrkB dans les rafts lipidiques se fait grâce à la fixation du BDNF sur son récepteur. TrkB est initialement présent dans les rafts cependant, l'exposition au BDNF augmente sa translocation dans les rafts. Celle-ci est transitoire, *in vitro* elle atteint un pic entre 30min et 120min après le traitement puis diminue progressivement jusqu'à un retour au taux normal de TrkB dans les rafts, 6h après traitement (Suzuki et al., 2004). L'utilisation d'un inhibiteur de l'autophosphorylation de TrkB (K252a) induit une diminution de la quantité de Trk dans les rafts après traitement au BDNF, ce qui montre que l'activité tyrosine kinase de TrkB est nécessaire à sa translocation dans les rafts (Suzuki et al., 2004). Enfin, cette même étude montre la translocation de TrkB dans ces rafts est nécessaire à la croissance des dendrites par le BDNF. En effet, l'utilisation de mevastatine (qui permet l'épuisement des rafts) n'a pas d'effet sur le nombre de dendrites, en revanche lorsque les neurones sont traités avec du BDNF, la mevastatine bloque l'effet du BDNF et ainsi l'augmentation du nombre de dendrites (Suzuki et al., 2004). Pour conclure, cette étude montre que la translocation des récepteurs TrkB dans les rafts par le BDNF est nécessaire pour la signalisation TrkB.

Ainsi, la présence de TrkB au niveau des membranes est régulée par des mécanismes de transports des endosomes aux membranes. Une fois aux membranes, les récepteurs sont transloqués dans des zones de rafts lipidiques afin d'induire différentes signalisations. Cette signalisation peut être activée directement à la membrane plasmique mais les complexes BDNF-TrkB peuvent aussi être endocytés afin d'induire une signalisation spatialement régulée.

c. Endocytose des complexes BDNF-TrkB

Les récepteurs TrkB sont transportés de façon rétrograde par la création de vésicules d'endocytose nommées "endosomes de signalisation" et permettent d'activer des voies de signalisation à distance de l'endroit où le BDNF s'est fixé sur le récepteur. Cela permet une régulation spatiale de l'activation des voies de signalisation. L'endocytose des facteurs de

croissance neuronaux comme le BDNF permet de réguler où et quand les cascades de signalisation sont activées (Cosker and Segal, 2014).

Le transport rétrograde nécessite tout d'abord l'internalisation des récepteurs par la clathrine. Beattie a montré en 2000 que dans les neurones hippocampaux, la présence de BDNF induit une relocalisation de la protéine adaptatrice AP2 et de clathrine au niveau des membranes plasmiques. En plus de la relocalisation d'AP2 au niveau des membranes, l'utilisation d'ARN interférent montre qu'AP2 est nécessaire à l'endocytose de TrkB médiée par la clathrine (Zheng et al., 2008). Enfin, il a été observé en présence de BDNF, que TrkB est internalisé après 30min de traitement *in vitro*. Dans ce contexte, une inhibition de l'endocytose induit une inhibition de l'internalisation (Liu et al., 2015; Zheng et al., 2008). Cette endocytose est régulée par GSK3 β . En présence d'un inhibiteur de GSK3 β , la stimulation au BDNF n'induit plus l'internalisation de TrkB. Afin de vérifier la spécificité de l'inhibition, la même expérience a été effectuée dans des souris mutantes GSK3 β et permet d'observer le même résultat (Liu et al., 2015). De plus, GSK3 β permet l'internalisation de TrkB par la régulation de la dynéine 1. Une forte activité de GSK3 β induit la phosphorylation de la dynéine 1 sur le site S774 et, lorsque cette phosphorylation est inhibée, il y a une augmentation de l'internalisation de TrkB.

Deux Rab GTPases sont nécessaires pour la régulation des endosomes de signalisation : Rab5 et Rab11. Rab5 régule la fonction de fusion des endosomes alors que Rab11 régule le recyclage des vésicules. Le BDNF induit une augmentation du nombre de vésicules Rab5 et 11, en revanche il diminue la mobilité des vésicules Rab11 pour permettre un recyclage local (Lazo et al., 2013; Moya-Alvarado et al., 2018). La mobilité des vésicules Rab5 augmente après traitement au BDNF, Moya-Alaró et ses collègues montrent que l'activité des vésicules Rab5 est dépendante du temps d'exposition au BDNF et suggèrent qu'il existe deux populations de vésicules Rab5 avec des fonctions différentes. La première population serait nécessaire pour le recyclage des vésicules alors que la deuxième population serait impliquée dans le trafic à longue distance entre les dendrites et le soma afin de permettre la croissance des dendrites *via* leur interaction avec les myosines (Moya-Alvarado et al., 2018)

Après endocytose, les endosomes de signalisation contenant le récepteur TrkB sont transportés le long des microtubules par la dynéine. Le premier mécanisme intervenant dans le transport rétrograde des endosomes de signalisation est le couplage snapsine-dynéine. Zhou et al., 2012 a montré que l'interaction entre la snapsine et la dynéine permet le transport rétrograde de TrkB (Zhou et al., 2012). Une deuxième étude montre que le BDNF induit la phosphorylation de la chaîne intermédiaire de la dynéine *via* l'activation de ERK1/2 ce qui permet d'augmenter la liaison de la dynéine avec l'endosome (Mitchell et al., 2012). Ces deux études montrent que le transport des endosomes de TrkB se fait *via* la dynéine qui est recrutée par la snapsine et phosphorylée par ERK1/2 sur sa chaîne intermédiaire par un mécanisme BDNF-dépendant.

Ainsi, tous ces résultats montrent que l'endocytose et le transport des récepteurs sont très régulés. De plus, l'activité de certaines protéines en aval de la signalisation BDNF-TrkB dépend de cette internalisation. En effet, une inhibition de l'endocytose de TrkB induit une diminution de la phosphorylation de AKT, ce qui montre que la phosphorylation de la protéine AKT est dépendante de cette internalisation (Liu et al., 2015).

En outre, *in vitro*, le transport du BDNF est régulé par la protéine Huntingtin (HTT) et TrkB colocalise avec HTT et la dynéine. Une mutation HTT induit une diminution du trafic des vésicules contenant TrkB (Liot et al., 2013). Le transport rétrograde des vésicules permet l'activation de la phosphorylation de ERK et l'induction de l'expression de c-fos (Liot et al., 2013). Ainsi, la protéine HTT n'est pas seulement nécessaire au trafic des vésicules mais aussi la signalisation par ERK est elle aussi dépendante du transport de vésicules.

Ainsi, ces résultats montrent que l'endocytose des vésicules BDNF-TrkB sont nécessaires à l'activation diverses voies de signalisation.

D- La signalisation par le BDNF

1) Sécrétion du BDNF

Le BDNF est chargé positivement dans des conditions physiologiques (Barde et al., 1982). Cette charge positive induit une interaction électrostatique avec les protéines de surface cellulaire, cela limite sa diffusion et facilite la signalisation cellule autonome.

La sécrétion autocrine du BDNF fait intervenir deux mécanismes distincts : un relargage constitutif indépendant de l'activité et un relargage régulé dépendant de l'activité électrique neuronale (Edelmann et al., 2014; Leßmann and Brigadski, 2009). La sécrétion constitutive se déroule la plupart du temps dans le soma alors que la sécrétion régulée se déroule principalement de façon distale du soma (Brigadski et al., 2005). Cependant, la majorité du BDNF intracellulaire est relargué de façon activité dépendante. Les vésicules sécrétées de façon dépendante de l'activité (Brigadski et al., 2005) sont des vésicules assez larges de 100-300nm, la sécrétion se déroule au niveau des rafts lipidiques (Lang et al., 2001) et est permise par les protéines SNAREs (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor): Syb2 et SNAP25, SNAP47 qui permettent le positionnement des vésicules à la membrane. Le relargage du BDNF mature se fait de façon dépendante de l'activité depuis les dendrites et l'axone.

Le relargage constitutif fait intervenir de petites vésicules de 50-100nm qui fusionnent à la membrane de façon calcium indépendante et c'est un mécanisme minoritaire pour le relargage du BDNF (Brigadski et al., 2005).

Ainsi, deux types de sécrétion du BDNF ont été mis en évidence, cependant, l'effet du BDNF est-il pré ou postsynaptique ? La surexpression de TrkB.T1 dans les neurones permet d'inhiber l'effet présynaptique du BDNF (Marshak et al., 2007). *In vivo*, une surexpression de TrkB.T1 dans les neurones visuels de xénope induit une diminution du branchement axonal par rapport aux neurones contrôles après 24h de surexpression (Marshak et al., 2007). Ces résultats indiquent que l'effet présynaptique du BDNF est nécessaire au branchement axonal *in vivo* (Marshak et al., 2007).

La vitesse de sécrétion du BDNF est importante pour l'action du BDNF. Deux modes de sécrétions ont été démontrés, une sécrétion aiguë ("acute mode") et une sécrétion graduelle ("gradual mode") (Ji et al., 2010). La sécrétion aiguë induit une activation de TrkB rapide et forte mais transitoire (environ 2h) alors que la sécrétion graduelle induit une activation lente mais qui perdure dans le temps (environ 8h) (**Figure 21**). La sécrétion rapide correspond à une sécrétion induite par l'activité neuronale, proche des synapses. La sécrétion graduelle quant-à-elle correspond à la sécrétion par les cellules gliales ou la sécrétion par des neurones à distance. Cette différence de sécrétion est importante puisqu'elle n'induit pas les mêmes actions, par exemple l'augmentation aiguë induit une augmentation rapide de la transmission synaptique alors que l'augmentation graduelle facilite la LTP (Ji et al., 2010). De plus, cette différence de sécrétion mène à une différence dans la cinétique d'activation des voies de signalisation et dans l'activation de la transcription. La sécrétion aiguë induit une phosphorylation rapide et transitoire de ERK alors que la sécrétion graduelle induit une augmentation de phosphorylation lente et durable. Cette différence est permise par l'activation de GTPase différentes : Ras et Raf qui induisent respectivement une phosphorylation transitoire et maintenue (York et al., 1998). Cette différence d'activation induit des phénotypes différents tels que l'augmentation de la longueur des neurites pour une exposition aiguë et l'augmentation du branchement des neurites pour l'exposition graduelle (Ji et al., 2010)(**Figure 21**). L'ensemble de ces résultats indique que la signalisation de TrkB par le BDNF est dépendante de la vitesse de sécrétion du BDNF.

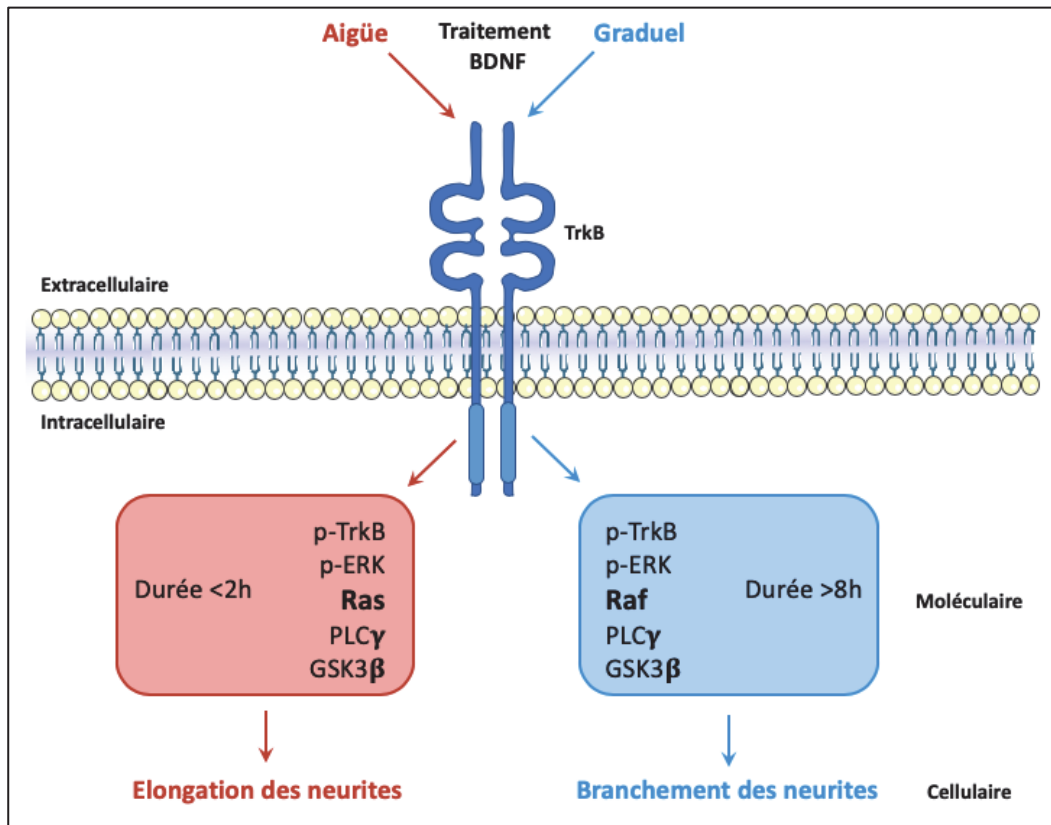


Figure 21 : Schéma de l'activation des récepteurs TrkB par deux modes d'exposition au BDNF : aiguë ou graduelle. Les traitements aiguë ou graduel au BDNF induisent l'activation, transitoire ou durable, de différentes kinases. L'activation de différentes voies moléculaires engendre un phénotype différent au niveau des dendrites. (Adapté de Guo et al., 2018)

2) La signalisation neuronale du BDNF

Dans les neurones, la régulation de la morphologie est en partie contrôlée par le BDNF. Cette neurotrophine est impliquée dans différents mécanismes détaillés dans la première partie tels que : la polarité neuronale et le branchement axonal.

In vitro, le BDNF régule la polarité neuronale par la régulation de la phosphorylation de LKB1 sur son site S431 (Shelly et al., 2007). Lors du branchement neuronale, il permet la régulation de la protéine MKP-1 qui induit une dérégulation de JNK ce qui affecte la stabilité des microtubules (Jeanneteau et al., 2010). *In vivo*, une diminution de l'expression du BDNF induit une diminution du branchement terminal des neurones pyramidaux de la couche II/III (Shimojo et al., 2015). L'ensemble de ces processus sont régulés par la fixation du BDNF sur son récepteur TrkB qui engendre l'activation de différentes voies de signalisation.

Dans les paragraphes suivants, je vais détailler les processus moléculaires permettant l'activation de différentes voies de signalisation durant le développement neuronal en fonction de l'isoforme du BDNF.

a. La signalisation pro-BDNF

La signalisation par le pro-BDNF se déroule *via* le récepteur p75^{NTR} et son co-récepteur SorCS2. Le récepteur p75^{NTR} induit l'activation de trois voies de signalisation JNK et NFκB et RhoA (**Figure 22**). L'activation des voies de signalisation NFκB et RhoA permet la survie et régule le développement neuronal alors que l'activation de JNK induit la mort cellulaire (Kowiański et al., 2018). L'activation de p75^{NTR} permet l'interaction avec les protéines NRAGE (Salehi et al., 2000), TRAF6 (Khursigara et al., 1999) et NRIF (Linggi et al., 2005) ; cette interaction induit l'activation de la kinase Cdc42, ce qui stimule le facteur de transcription c-Jun et la protéine p53. La stimulation de c-Jun implique l'activation des kinases ASK1 et MKK7 (Kanamoto et al., 2000) qui permettent l'activation de JNK qui est l'activateur de p53 (Dhanasekaran and Reddy, 2008). Ainsi le pro-BDNF *via* son récepteur régule l'expression de gènes pro-apoptotiques et des caspases qui causent la mort cellulaire (MacLachlan and El-Deiry, 2002; Miyashita and Reed, 1995).

La signalisation NFκB est elle aussi permise par l'activation de TRAF6. Son activation permet la formation d'un complexe avec la protéine IRAK ainsi que PKC et p62 (Vandenplas et al., 2002; Wooten et al., 2001). Ce complexe permet la phosphorylation de IKK-β, ce qui induit le relargage de NFκB.

Enfin la GTPase RhoA est activée par son interaction avec le récepteur p75^{NTR} et RhoGDI, cette interaction induit une inhibition de la croissance des neurites par dépolymérisation de l'actine qui ne nécessite pas la fixation de neurotrophines sur le récepteur (Wong et al., 2002; Yamashita et al., 1999, 2002). L'effet de p75^{NTR} sur l'activité de RhoA varie en fonction du ligand associé au récepteur. En effet, lorsque le BDNF est lié à p75^{NTR}, RhoGDI se dissocie de p75^{NTR}, ce qui diminue l'activité de RhoA et favorise la croissance des neurites (Gehler, 2004; Yamashita et al., 1999). En revanche, lorsque le pro-BDNF est lié à p75^{NTR} cela entraîne une augmentation de l'activité de RhoA de manière dose dépendante, induisant ainsi une augmentation de la rétraction du cône de croissance et la diminution de la croissance des neurites (Sun et al., 2012) (**Figure 22**).

De hauts niveaux d'expression de p75^{NTR} ont été observés dans des neurones apoptotiques (Roux et al., 1999). De plus, *in vitro*, des cellules musculaires sécrètent du pro-BDNF, qui en se fixant sur son récepteur à la surface des motoneurones, induit la mort cellulaire (Taylor et al., 2012). L'activation de RhoA en revanche, réduit la croissance du cône de croissance et sa mobilité (Reichardt, 2006). L'activation de NFκB promeut la survie et le maintien du bon nombre de neurones pendant le développement (Reichardt, 2006).

L'activation des voies de survie ou de mort cellulaire est dépendante de la concentration de pro-BDNF et de BDNF. Lorsqu'il y a une forte concentration de pro-BDNF comme dans les cas de dégénérescence neuronale ou de blessure, ou une faible concentration de BDNF, les neurones touchés ont tendance à être éliminés (Bamji et al., 1998; Lu et al., 2005)

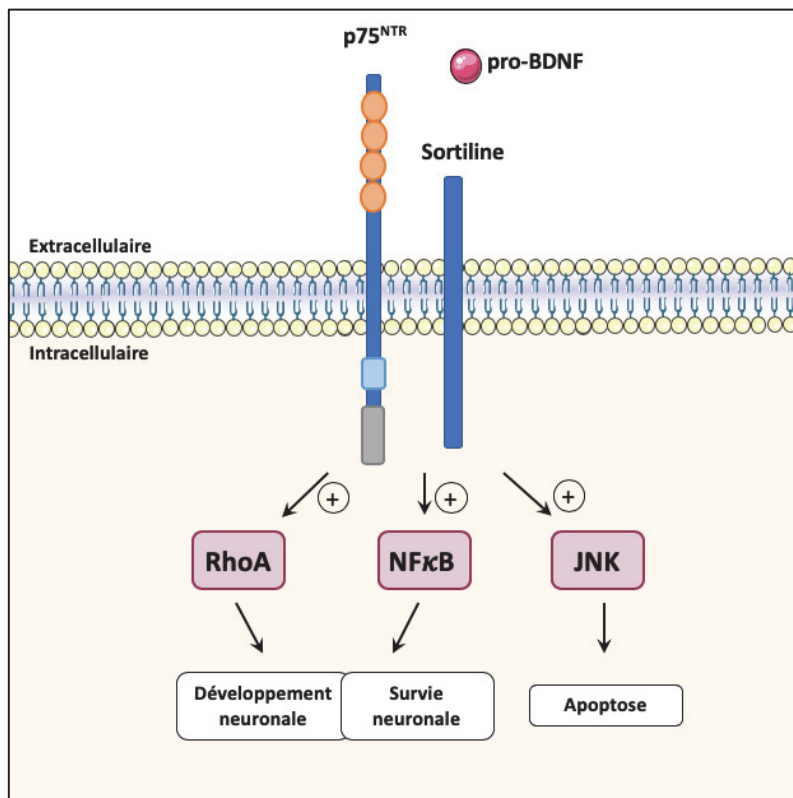


Figure 22 : Représentation schématique de la signalisation induite par le pro-BDNF sur le récepteur $p75^{NTR}$. Le pro-BDNF permet l'activation de trois voies de signalisation intracellulaires majeures : RhoA, NFκB, et JNK. Ces voies de signalisation induisent deux processus distincts, la mort cellulaire ou la survie et le développement neuronal.

b. La signalisation BDNF mature

Le BDNF mature se fixe sur les récepteurs TrkB qui se dimérisent. La dimérisation des récepteurs permet l'autophosphorylation de sites tyrosinés et activent des cascades de signalisation intracellulaires (Chao, 2003; Huang and Reichardt, 2003; Minichiello, 2009). Les récepteurs Trk possèdent deux sites d'autophosphorylation (Tyr515 et Tyr816) qui induisent l'activation de voies de signalisation différentes. Le BDNF, peut donc induire différentes signalisations et par conséquent différentes fonctions. La **figure 23** récapitule les différentes signalisations abordées dans ce paragraphe ainsi que les conséquences cellulaires engendrées par l'activation de ces voies de signalisation.

La phosphorylation de la tyrosine 515 permet le recrutement de la protéine adaptatrice SHC *via* ces domaines PTB (phosphotyrosine-binding) (Kavanaugh and Williams, 1994). Ce recrutement est en compétition avec la protéine adaptatrice FRS2 (fibroblast growth factor receptor substrate 2) (Kouhara et al., 1997; Meakin et al., 1992). Le recrutement et l'activation de ces protéines adaptatrices engendrent la liaison et l'activation des protéines GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2) et SOS (son of sevenless) (Minichiello, 2009) (**Figure 23**). Cette signalisation permet l'activation de la Rho GTPase Ras liée à la membrane plasmique, *via* l'activation de GRB2 et SOS pour *in fine* aboutir sur la voie des MAP kinases (Huang and Reichardt, 2003). La voie des MAP kinase va permettre la phosphorylation de la protéine $p90^{RSK}$, cette protéine nécessite la phosphorylation d'un deuxième site par PDK1 pour être

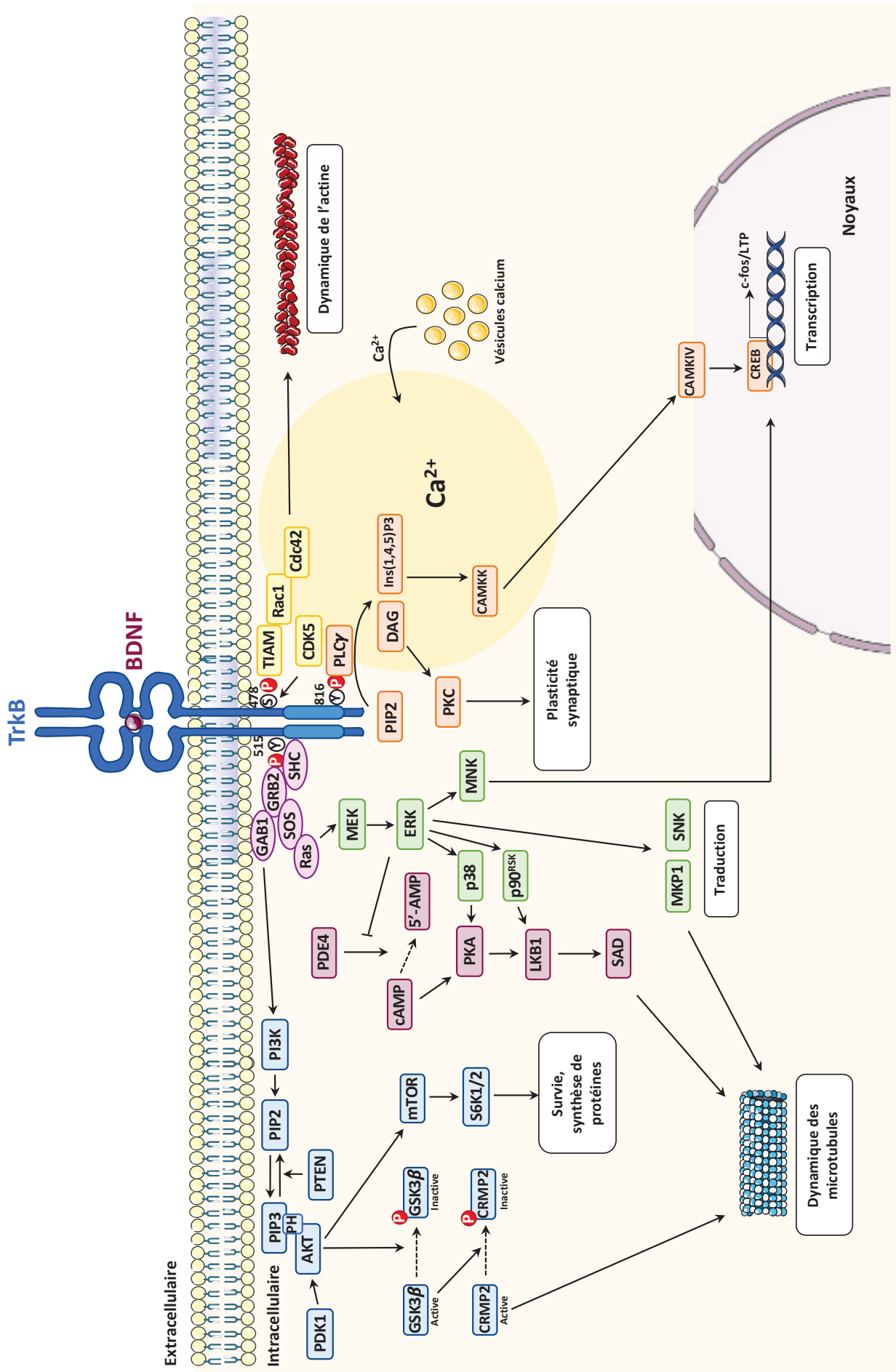
activée (Jensen et al., 1999). Une fois activée, elle engendre la phosphorylation de la kinase LKB1 sur le site S431 (Sapkota et al., 2001). Ainsi, la voie des MAP kinases est activée en réponse à la fixation du BDNF sur son récepteur TrkB et peut induire la phosphorylation de LKB1 sur le site S431.

L'activation de GRB2 induit le recrutement d'autres protéines adaptatrices comme GAB1 (GRB-associated binder-1), IRS1 et IRS2 (insulin-receptor substrate). Ce recrutement permet la liaison et l'activation d'une autre protéine de signalisation par son domaine SH2 : la PI3K qui aboutit à la régulation de la polymérisation des microtubules (Holgado-Madruga et al., 1997; Yamada et al., 1997) (**Figure 23**).

En outre, la phosphorylation de la tyrosine 816 permet le recrutement de PLC- γ par son domaine SH2 (Src-homology 2). Le recrutement de PLC- γ engendre sa phosphorylation par le récepteur actif (Kaplan and Miller, 2000). L'activation de PLC- γ induit la génération d'inositol-1,4,5-trisphosphate (Ins(1,4,5)P3) et de diacylglycerol (DAG) par conversion de PIP2. La génération d'IP3 promeut le relargage de calcium intracellulaire ce qui active les kinases CAMKII, CAMKK et CAMKIV et *in fine* CREB (Reichardt, 2006).

De plus, l'activation de PLC- γ engendre la phosphorylation de TrkB sur la Ser478 par CDK5. Cette phosphorylation permet l'interaction de TrkB et TIAM1 qui active la RhoGTPase Rac1 ce qui induit une régulation de la dynamique de l'actine par Cdc42 (Lai et al., 2012)(**Figure 23**).

De plus, le BDNF induit une augmentation de cAMP intracellulaire. Cette augmentation de cAMP par le BDNF est permise par l'inhibition transitoire de PDE4 (phosphodiesterase) par ERK (Shelly et al., 2007). PDE4 permet la conversion de cAMP en 5'-AMP, son inhibition transitoire permet donc une élévation de cAMP intracellulaire (Gao et al., 2003; Shelly et al., 2010). Cette élévation de cAMP induit l'insertion de TrkB aux membranes plasmiques, son transport dans l'axone ainsi que la sécrétion de BDNF (Cheng et al., 2011). Cette augmentation de cAMP par le BDNF produit une boucle de rétroaction positive qui permet une régulation autocrine de BDNF et assure une stabilité de l'activité de cAMP/PKA permettant la différenciation axonale (Cheng et al., 2011) (**Figure 23**). Une autre voie est impliquée dans l'activation de PKA par le BDNF ; dans les neurones du ganglion trigeminal, la PI3K permet de stimuler la protéine p38 qui elle-même active PKA (Wang et al., 2019). En outre, l'activation de PKA par cAMP ou p38 permet la phosphorylation de la kinase LKB1 nécessaire à la spécification, la croissance et le branchement de l'axone (**Figure 23**).



intracellulaires majeures : PI3K/AKT, les MAP kinases, PLCγ

E- Régulation du métabolisme par le BDNF

L'activation du récepteur TrkB par le BDNF n'induit pas seulement des modifications du cytosquelette mais aussi des changements métaboliques.

1) Régulation du métabolisme des mitochondries

La régulation des mitochondries par le BDNF est intimement liée à l'activation de voies de signalisation par le récepteur TrkB. *In vitro*, dans des neurones hippocampaux, une exposition de 15min au BDNF induit une diminution du nombre de mitochondries mobiles dans les axones alors qu'il n'a pas d'effet sur le trafic des endosomes (Su et al., 2014). Ceci montre que la régulation du trafic par le BDNF est spécifique aux mitochondries. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques a permis d'identifier les kinases TrkB, PI3K et PLC- γ comme médiatrices de l'effet du BDNF sur le trafic des mitochondries (Su et al., 2014) (**Figure 24**). L'inhibition de la kinase ERK en revanche, n'a pas d'effet sur le trafic des mitochondries. La kinase ERK ne semble donc pas participer à la régulation du trafic des mitochondries par la BDNF (Su et al., 2014).

Dans les neurones, le calcium est un régulateur de la mobilité mitochondrial (MacAskill et al., 2009), et le BDNF régule l'activité calcique (Amaral and Pozzo-Miller, 2007). La surexpression d'une protéine mitochondriale sensible au calcium : Miro1, induit une diminution du nombre de mitochondries mobiles (Su et al., 2014). Avec une diminution de l'expression de Miro1, le BDNF n'est plus capable d'arrêter les mitochondries. Ces résultats montrent que Miro1 régule l'arrêt des mitochondries par le BDNF via sa liaison avec le calcium (**Figure 24**).

L'observation de l'effet du BDNF sur le trafic des mitochondries mène à se demander si le BDNF possède aussi un rôle de régulation des fonctions mitochondriales comme la respiration ou le potentiel de membrane.

Un traitement de 15min au BDNF de neurones hippocampaux *in vitro* n'induit pas d'effet sur le potentiel de membrane des mitochondries. En revanche, après 24 à 72h de traitement les mitochondries montrent une augmentation de leur potentiel membranaire et de la production d'ATP (Su et al., 2014).

Dans les cerveaux de rat, le BDNF induit une augmentation de la respiration mitochondriale par le complexe I de la chaîne respiratoire mais pas par le complexe II (Markham et al., 2004). L'utilisation d'inhibiteur de MEK, bloque la capacité du BDNF à augmenter la respiration. Ce qui montre que l'effet du BDNF sur la respiration mitochondriale est médié par la voie des MAP kinases (**Figure 24**) (Markham et al., 2004).

En revanche, dans ces cerveaux, le BDNF n'a pas d'effet sur l'activité ATPase du complexe V (Markham et al., 2004). Ainsi ces résultats montrent que le BDNF induit une augmentation de l'ATP par augmentation de la respiration mitochondriale par le complexe I de la chaîne respiratoire.

Dans la première partie de cette introduction, j'ai expliqué le rôle de la biogénèse des mitochondries sur la morphogénèse neuronale. La morphogénèse neuronale est en partie régulée par le facteur PGC1- α . La régulation de PGC1- α est rendue possible par l'action du BDNF (Cheng et al., 2012). En effet, dans les neurones hippocampaux, la présence de BDNF induit une augmentation de l'activation du promoteur de *Pgc1- α* , ainsi que de la quantité d'ARNm et de protéines PGC1- α . Cette augmentation est médiée par l'activation de la signalisation des MAP kinases et du facteur de transcription CREB activés par la fixation du BDNF sur son récepteur TrkB (Cheng et al., 2012). PGC-1 α induit l'activation de gènes comme NRF1 qui contrôle l'expression de protéines mitochondriales comme le cytochrome c et TFAM qui, eux-mêmes, sont nécessaires à l'initiation de la transcription et de la réplication de l'ADN mitochondrial. Une augmentation des niveaux d'expression de NRF1 et TFAM est observée en présence de BDNF (Cheng et al., 2012). Enfin, après 7 jours de traitement au BDNF, la quantité d'ADN mitochondriale et la masse mitochondriale augmentent dans les neurones hippocampaux (Cheng et al., 2012). Ainsi, ces résultats montrent que le BDNF régule la biogénèse des mitochondries nécessaire à la morphogénèse neuronale (**Figure 24**).

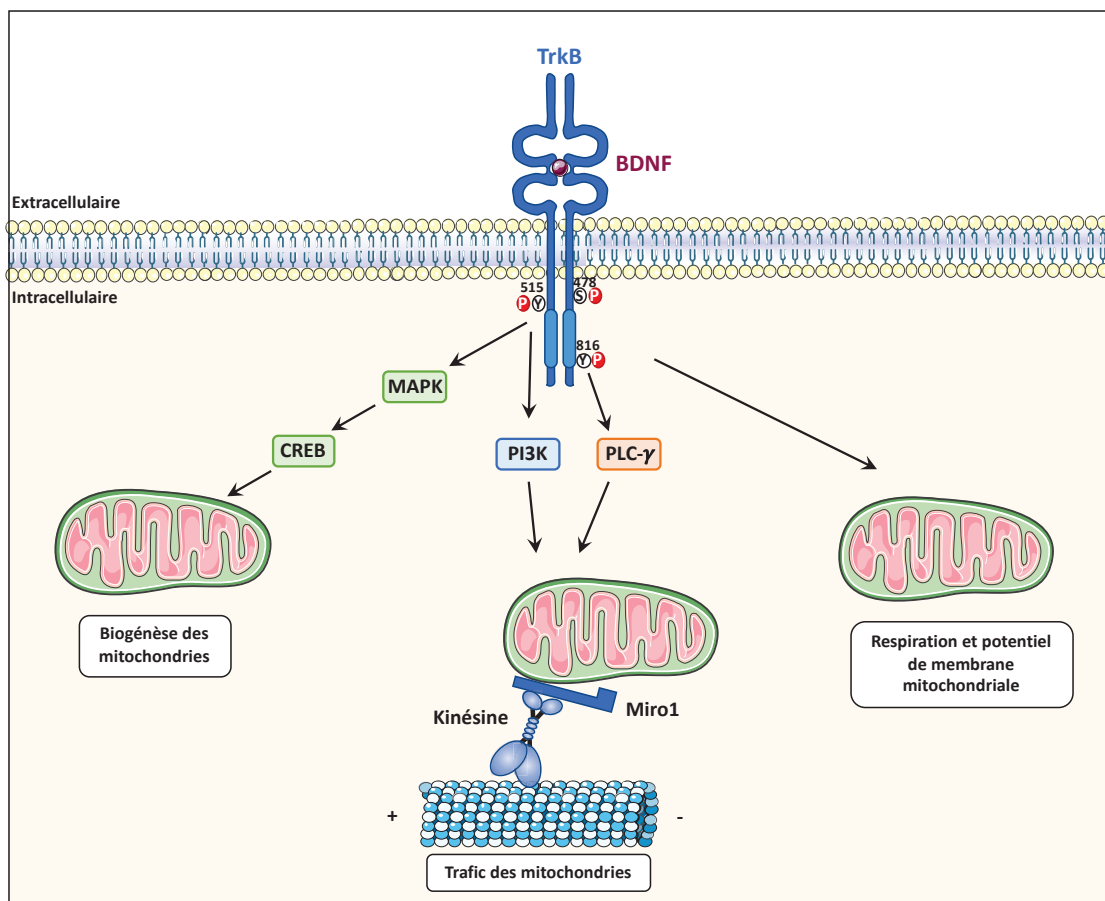


Figure 24 : Schéma représentant la régulation des mitochondries par le BDNF. Le BDNF permet l'activation de trois voies de signalisation intracellulaires majeures : PI3K/AKT, les MAP kinases, PLC γ . L'activation de ces voies de signalisation mène à différents processus biologiques tels que la biogénèse des mitochondries, le trafic des mitochondries ou encore une augmentation du métabolisme mitochondrial. (Adapté de Su et al., 2014 ; Cheng et al., 2012 ; Markham et al., 2004)

2) Régulation du métabolisme du glucose

Le BDNF régule la synthèse de protéine dans les neurones (Manadas et al., 2009; Takei et al., 2009), cette synthèse de protéines nécessite un apport d'énergie qui peut être procurer sous forme de glucose, qui est le substrat prédominant dans le cerveau pour l'apport énergétique. Dans des cultures de neurones corticaux, un traitement de 20min au BDNF induit une augmentation de l'influx de 2-DG (analogue du glucose) qui atteint un maximum après 2h de traitement et cet effet est annulé en présence d'un inhibiteur de TrkB (Burkhalter et al., 2003). Ce qui montre que le BDNF a la capacité d'augmenter l'influx de glucose dans les cellules. L'utilisation d'inhibiteurs contre les kinases activées par le récepteurs TrkB a permis de définir l'implication de la signalisation par la kinase PLC- γ dans l'augmentation de l'influx de glucose induit par le BDNF dans les neurones corticaux (Burkhalter et al., 2003). L'influx de glucose dans les neurones est assuré par l'augmentation de l'expression de GLUT3 (transporteur au glucose) induite par le BDNF (Burkhalter et al., 2003). Cette augmentation du glucose est corrélée avec une élévation de la synthèse protéique.

3) Régulation du métabolisme des lipides

Le cholestérol est un composant majeur des rafts lipidiques dont la composition en TrkB est régulé par le BDNF (voir partie II-C-1-c). Ainsi, la question s'est posée de savoir si le BDNF était lié à la synthèse de cholestérol.

Une exposition des neurones corticaux ou hippocampaux au BDNF augmente le cholestérol dans les neurones (Suzuki et al., 2007). Cette augmentation est régulée de façon dose-dépendante par le BDNF et une inhibition du récepteur TrkB engendre une perte de l'augmentation du cholestérol. Ce qui montre que l'activation de TrkB est nécessaire pour l'augmentation de cholestérol (Suzuki et al., 2007). L'augmentation de cholestérol dans ces neurones est rendue possible par l'augmentation de la synthèse d'enzymes (HMG-CoA, MPV) responsables de la biosynthèse du cholestérol. Le BDNF permet l'augmentation de la synthèse de cholestérol par régulation de la transcription des ARNm codant pour ces enzymes (Suzuki et al., 2007). De plus, cette augmentation de cholestérol est spécifique aux rafts lipidiques, elle ne se produit pas dans les zones sans raft. Cette hausse des lipides dans les rafts est accompagnée d'une augmentation des protéines dans les zones sans raft (Suzuki et al., 2007). Ainsi ces résultats montrent que le BDNF promeut la synthèse de lipides dans les rafts qui sont les plateformes de signalisation de son récepteur TrkB.

Pour conclure, l'effet du BDNF sur la morphogénèse axonale est permis par l'interaction avec de nombreux effecteurs comme les protéines de signalisation et les mitochondries. L'ensemble des voies de signalisation activées par le BDNF sont des voies impliquées dans la morphologie neuronale vue dans la première partie de cette introduction. La capacité du BDNF à induire différents processus, dépendant de sa localisation, sa vitesse de sécrétion ou

de son isoforme, montre que le BDNF est une neurotrophine majeure dans le développement neuronal. Le BDNF est donc un facteur extracellulaire qui utilise des messagers intracellulaires pour réguler différents processus biologiques permettant le contrôle de la morphologie neuronale. L'un de ces messagers est la kinase LKB1 à laquelle je vais plus particulièrement m'intéresser dans la prochaine partie.

III- LKB1

A- Historique et syndrome Peutz-Jeghers

1) Clinique du syndrome Peutz-Jeghers

L'étude du syndrome Peutz-Jeghers (PJS) a permis l'identification de LKB1. En effet, la première analyse génétique effectuée sur le PJS a mis en évidence l'implication du chromosome 19p dans ce syndrome (Hemminki et al., 1997). C'est par la suite en 1998 que la même équipe a montré l'implication de LKB1 dans le PJS (Hemminki et al., 1998). Quatre loci spécifiques (D19S886, D19S565, D19S894, D19S413) impliqués dans les PJS ont été identifiés par hybridation génomique et analyse de lignées génétiques (Hemminki et al., 1997).

Le PJS est une pathologie autosomique dominante caractérisée par la présence de polypes bénins dans le tractus gastro-intestinal et une pigmentation anormale de la peau et des muqueuses (**Figure 25**). Cette apparition de polype conduit, pour la moitié des patients atteints par cette maladie, à une obstruction de l'intestin. Par conséquent, les patients subissent des interventions chirurgicales répétées (Utsunomiya et al., 1975). Cependant, la mortalité de cette maladie n'est pas due aux nombreux polypes mais au taux de malignité, en effet, le risque de développer un cancer est de 85% chez les patients atteints par le PJS (Hearle et al., 2006). Les cancers les plus développés par les patients sont les cancers des poumons, du petit intestin, de l'estomac et du pancréas (Lier et al., 2010).

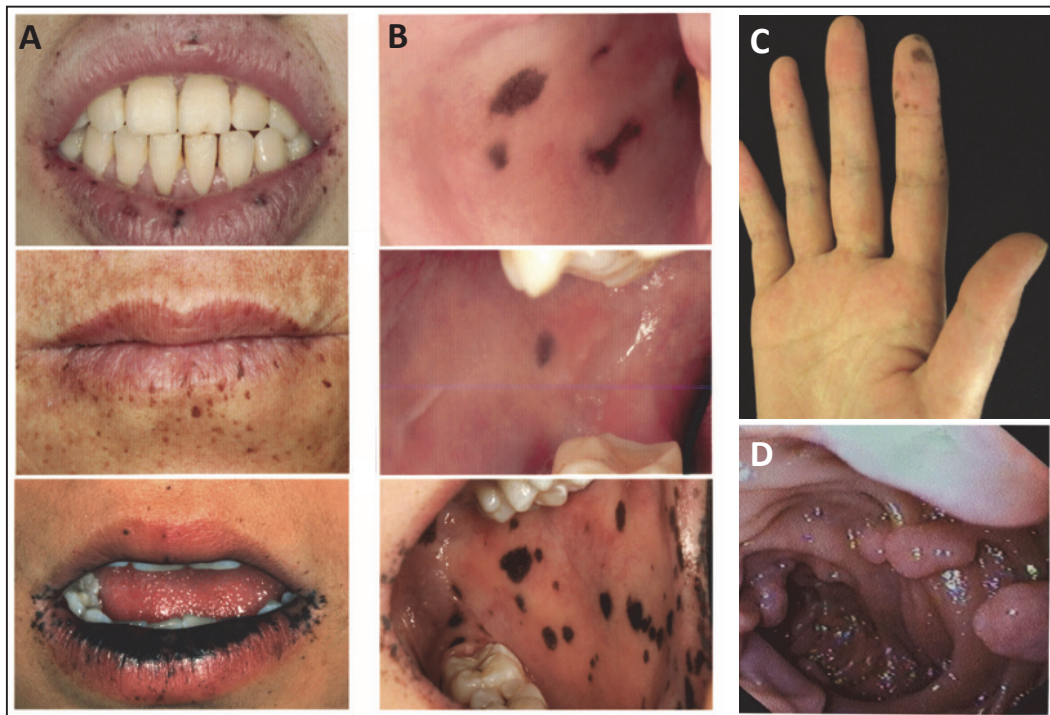


Figure 25 : Caractéristiques phénotypiques de patients atteints par le syndrome Peutz-Jeghers.

A-B : Les patients atteints présentent une pigmentation anormale principalement buccale se caractérisant par la présence de zone riche en mélanine autour (A) et dans la bouche (B). (C) Ces zones peuvent aussi être présentes sur leur corps comme en témoigne ici la photo d'une main de patient PJS. (D) Enfin la formation de polype intestinaux est la deuxième caractéristique de ce syndrome. (Images provenant de : Zhang et al., 2017)

2) Fonctions et mutations de LKB1

LKB1 est une serine-thréonine kinase LKB1 aussi connue sous le nom de STK11. C'est une kinase qui permet l'activation de 14 kinases de la famille de l'AMPK. Elle est essentielle pour le développement neuronal comme je l'ai détaillé dans la première partie. Cependant cette protéine est aussi impliquée dans de nombreuses autres fonctions comme le maintien cellulaire de la balance énergétique (Tamás et al., 2010), la régulation de la division cellulaire (Jansen et al., 2009) ainsi que la polarité cellulaire (Barnes et al., 2007; Shelly et al., 2007a). En outre, LKB1 a été une des premières kinases caractérisée comme suppresseur de tumeur (Hemminki et al., 1998; Jenne et al., 1998). Un gène suppresseur de tumeur est un gène codant pour une protéine dont l'activité bloque la prolifération anarchique des cellules cancéreuses.

Des mutations germinales de LKB1 ont été retrouvées dans 66 à 94% des patients PJS (Aretz et al., 2005; Hearle et al., 2006; Volikos, 2005). Exactement 144 mutations ont pu être identifiées et sont pour la plupart situées dans le domaine kinase de LKB1. Ces mutations comportent des mutations stop, des mutations induisant un changement du cadre de lecture, des mutations ponctuelles, ainsi que des délétions de courtes séquences (Alessi et al., 2006). La majorité de ces mutations induisent une coupure du domaine catalytique ce qui modifie l'activité de la kinase. Aucune mutation ponctuelle n'a été retrouvée dans le domaine N-terminal, ce qui a permis de suggérer que le domaine N-terminal n'était pas nécessaire pour la fonction suppresseur de tumeur de LKB1 (Alessi et al., 2006).

Les souris homozygote LKB1^{-/-} ne sont pas viables et décèdent au milieu de la gestation vers le stade embryonnaire E11 (Jishage et al., 2002; Miyoshi et al., 2002; Ylikorkala, 2001). Les embryons LKB1^{-/-} montrent de multiples défauts du développement à E8 comme un défaut de fermeture du tube neural, et un développement anormal de l'aorte (Ylikorkala, 2001). Cela montre que LKB1 est nécessaire au développement embryonnaire. Les souris hétérozygotes pour LKB1 sont viables et ne présentent pas de phénotype particulier jusqu'à l'âge adulte. Cependant, à partir de 45 semaines, la plupart des souris développent des polypes gastro-intestinaux dans l'estomac (Nakau et al., 2002).

B- Du gène à la protéine

1) Gène de LKB1

La protéine LKB1 est codée par le gène *Stk11* sur le chromosome humain 19p13.3 (Mehenni et al., 1998; Shah et al., 2008). Il est composé de 10 exons, dont 9 codants. C'est un gène de 23kb qui est transcrit du télomère vers le centromère (Alessi et al., 2006). C'est un fort homologue du gène *Lkb1* de la souris, situé sur le chromosome 10, composé lui aussi de 10 exons et mesurant 15kb (Smith et al., 1999). Un orthologue de *Lkb1* est retrouvé chez *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Watts et al., 2000) et la drosophile (Martin and St

Johnston, 2003) : le gène *Par-4*, chez le xenope, l'orthologue de *Lkb1* est *XEEK1* (Xenopus laevis egg and embryonic kinase 1) (Su et al., 1996).

2) Différentes isoformes de LKB1

LKB1 a d'abord été caractérisée sous deux isoformes, une forme longue (LKB1-FL) et une forme courte (LKB1-S) produite par un épissage alternatif de l'ARN (**Figure 26**). Les protéines codées par ces isoformes diffèrent par la perte 63 acides aminés. L'isoforme courte est principalement exprimée dans les testicules (Denison et al., 2009; Towler et al., 2008) et est essentielle pour la spermatogénèse. En effet, une diminution de l'expression de LKB1-S chez les souris mâles provoque la stérilité de ces derniers (Towler et al., 2008).

Une nouvelle isoforme a par la suite été caractérisée en 2015, c'est une isoforme privée du domaine N-terminal (Δ N-LKB1) (**Figure 26**). Cette isoforme est principalement exprimée dans les tissus cardiaques et muscles squelettiques et augmente l'activité de l'AMPK (Dahmani et al., 2015) et elle est catalytiquement inactive. Une co-expression de LKB1-FL et Δ N-LKB1 induit une augmentation de l'activité de AMPK par rapport à une surexpression de LKB1-FL seul. Ce qui montre que Δ N-LKB1 régule l'activité de LKB1-FL. En revanche, une co-expression Δ N-LKB1 et LKB1 avec son domaine kinase inactivé (LKB1 KD) n'induit pas d'augmentation de l'activité d'AMPK. Ces résultats montrent que Δ N-LKB1 n'est pas responsable de l'augmentation de l'activité de l'AMPK et que l'activation de l'AMPK nécessite au moins une forme fonctionnelle de LKB1 (Dahmani et al., 2015). La forme Δ N-LKB1 de LKB1 peut donc affecter les fonctions de LKB1-FL comme le métabolisme énergétique, la polarité et la croissance cellulaire (Dahmani et al., 2015).

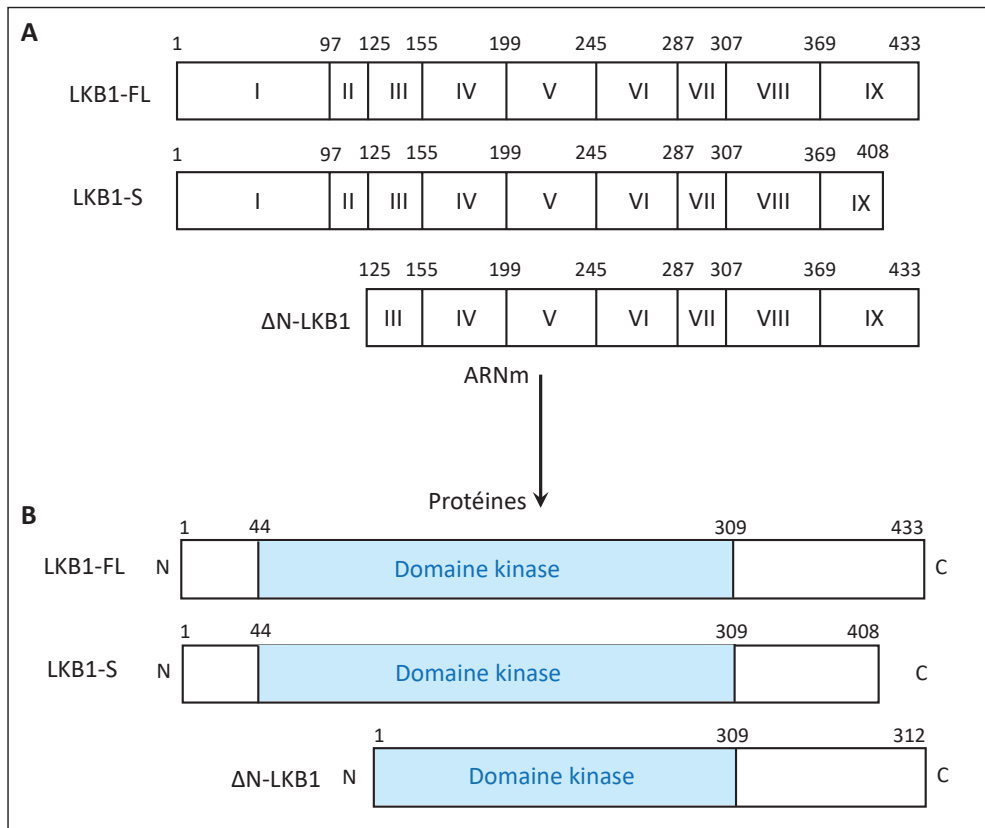


Figure 26 : Représentation des différentes formes de LKB1. (A) Résultats de l'épissage alternatif des trois ARNm pour LKB1. **(B)** Représentation des trois protéines codées par les trois différents ARNm. LKB1-FL est la forme complète de LKB1, les deux autres isoformes LKB1-S et Δ N-LKB1 sont deux isoformes tronquées. LKB1-S est une forme tronquée active qui a perdu avec une perte en C-terminal alors que l'isoforme Δ N-LKB1 a perdu son activité kinase. (Inspiré de Alessi et al. 2006)

3) Localisation de la protéine LKB1

LKB1 est un gène exprimé dans les tissus adultes et fœtaux. Durant le développement de la souris, LKB1 est particulièrement présent dans le tractus gastro-intestinal, les poumons et les testicules (Luukko et al., 1999). Chez l'homme, elle a été observée de façon similaire dans les tubes séminifères et de façon plus importante chez l'embryon que chez l'adulte (Rowan et al., 2000). Chez l'adulte LKB1 est particulièrement présent dans le cortex cérébral, les ovaires et les glandes salivaires (**Figure 27**).

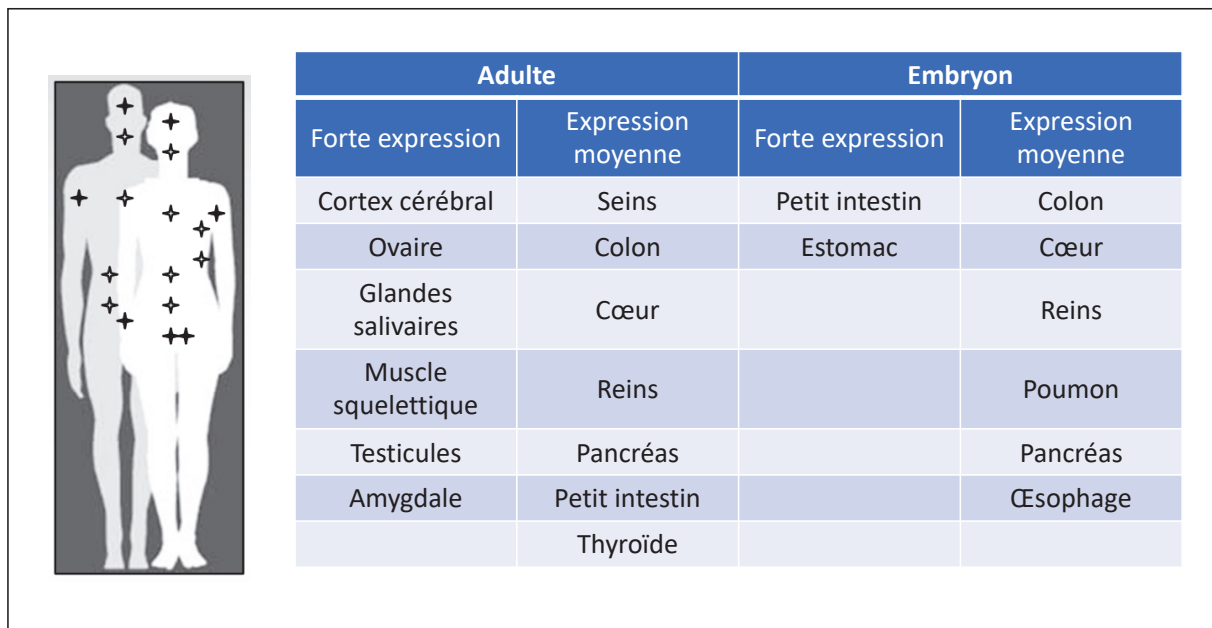


Figure 27 : Représentation des différentes zones d'expression de LKB1 à l'état embryonnaire et adulte. (Adapté de Sanchez-Cespedes 2007)

LKB1 est distribuée dans le noyau grâce à une séquence NLS (signal de localisation nucléaire) et le cytoplasme. La localisation de la séquence NLS dans la protéine a été déterminée par l'utilisation de la protéine mutante SL26 (possédant une deletion de 9bp des codons 303 à 306) qui a tout d'abord été caractérisée chez un patient PJS en 1998 (Hemminki et al., 1998). Cette mutation n'induit pas de perte de l'activité kinase mais induit en revanche un changement de localisation intracellulaire (Nezu et al., 1999). L'utilisation de différentes constructions a permis, dans un premier temps de définir la région 1-88 comme contenant la séquence NLS, la séquence a ensuite été affinée et il a été déterminé que la séquence NLS se situe entre les acides aminés 43 et 88. (Nezu et al., 1999).

De par son domaine NLS, LKB1 est préférentiellement localisée dans le noyau. Pour sortir du noyau et être activée, elle interagit avec une autre protéine la protéine STRAD qui est composée de deux dimers α et β . C'est l'hétérodimérisation qui permet la sortie du noyau, en absence de STRAD α , la protéine LKB1 est incapable de sortir du noyau. STRAD va interagir avec deux exportines : CRM1 et l'exportine 7 afin de transloquer LKB1 dans le cytoplasme (Dorfman and Macara, 2008) (**Figure 28**). En plus de son rôle d'export de LKB1, STRAD α bloque la relocalisation de LKB1 dans le noyau par fixation compétitive sur l'importine- α (**Figure 28**). Une troisième protéine interagit avec le complexe LKB1/STRAD : la protéine MO25. Cette protéine interagit préférentiellement avec STRAD. C'est la liaison de STRAD sur LKB1 qui va créer un nouveau site de fixation pour MO25 sur STRAD (**Figure 28**). Cette interaction est nécessaire à la stabilisation de STRAD/LKB1 dans le cytoplasme (Boudeau et al., 2003). Dans le noyau, la fixation de RanGTP à l'importine β permet la désolidarisation du complexe

d'import, dans le cytoplasme l'enzyme RanGAP hydrolyse le RanGTP en RanGDP ce qui provoque le désassemblage du complexe d'export (Dorfman and Macara, 2008).

Une fois sortie du noyau la protéine LKB1 peut donc agir dans le cytoplasme sur ces 14 kinases cibles (Lizcano et al., 2004).

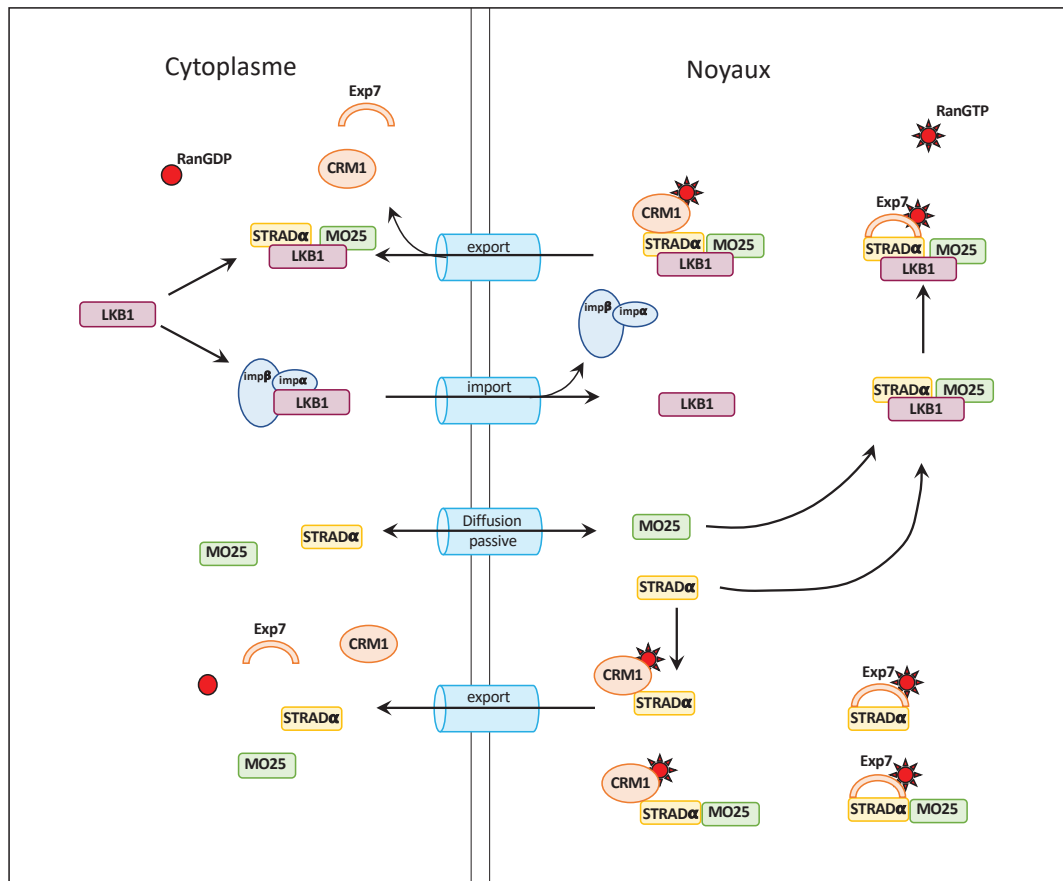


Figure 28 : Représentation du mécanisme d'export de LKB1 du noyau. La kinase LKB1 nécessite l'interaction avec ses partenaires STRAD et MO25 pour sortir du noyau. L'interaction de STRAD avec les exportines CRM1 et exportine 7 (Exp7) permet l'export du noyau. L'entrée de MO25 est STRAD dans le noyau se fait par diffusion passive. (Adapté de Dorfman and Macara 2008)

Un dernier complexe protéique intervient dans la stabilisation cytoplasmique de LKB1. LKB1 peut interagir avec le complexe de protéines chaperonnes Hsp90-CDC37 (**Figure 29**). Cette interaction stabilise LKB1 dans le cytoplasme (Boudeau et al., 2003; Nony et al., 2003) Hsp90 ne se fixe que sur deux isoformes de LKB1 : la forme longue et la forme courte mais pas la forme Δ N-LKB1 ce qui montre que le domaine N-terminal est nécessaire pour cette interaction (Gaude et al., 2012). Cette interaction a une fonction inhibitrice de l'activité kinase de LKB1. En outre, une disruption de ce complexe facilite le recrutement des protéines chaperonnes Hsp/Hsc70 et de l'enzyme E3 ubiquitine ligase ce qui induit la dégradation de LKB1 (Gaude et al., 2012) (**Figure 29**).

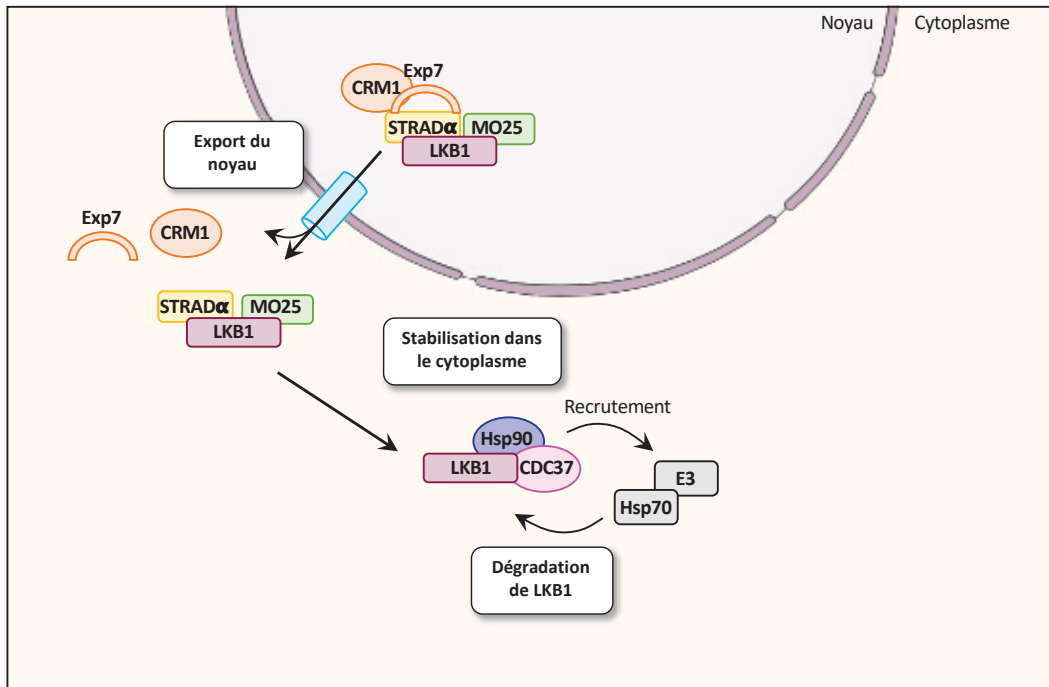


Figure 29 : Mécanismes de régulation de la localisation intracellulaire de LKB1. La sortie du noyau de LKB1 est permise par l'action de ces co-activateurs : STRAD α /MO25 ou par LIP1. Dans le cadre de cellules cancéreuses, LKB1, une fois dans le cytoplasme, peut être stabilisé par les protéines chaperonnes Hsp90/CDC37 et dégradé par le recrutement de l'E3 ubiquitine ligase et Hsp70.

4) Régulation post-traductionnelle de LKB1

Seulement 4 mutations ponctuelles de LKB1 ont été reportées pour modifier l'activité kinase de la protéine : K78I, D17GN, W308C, et L67P (Mehenni et al., 1998; Ylikorkala, 1999). La protéine de souris partage 90% d'identité avec la protéine humaine (Collins et al., 2000). LKB1 est une protéine qui subit de nombreuses modifications post-traductionnelles comme des phosphorylations, acétylations, ainsi que des farnésylations. Ces modifications sont résumées dans la **figure 30**.

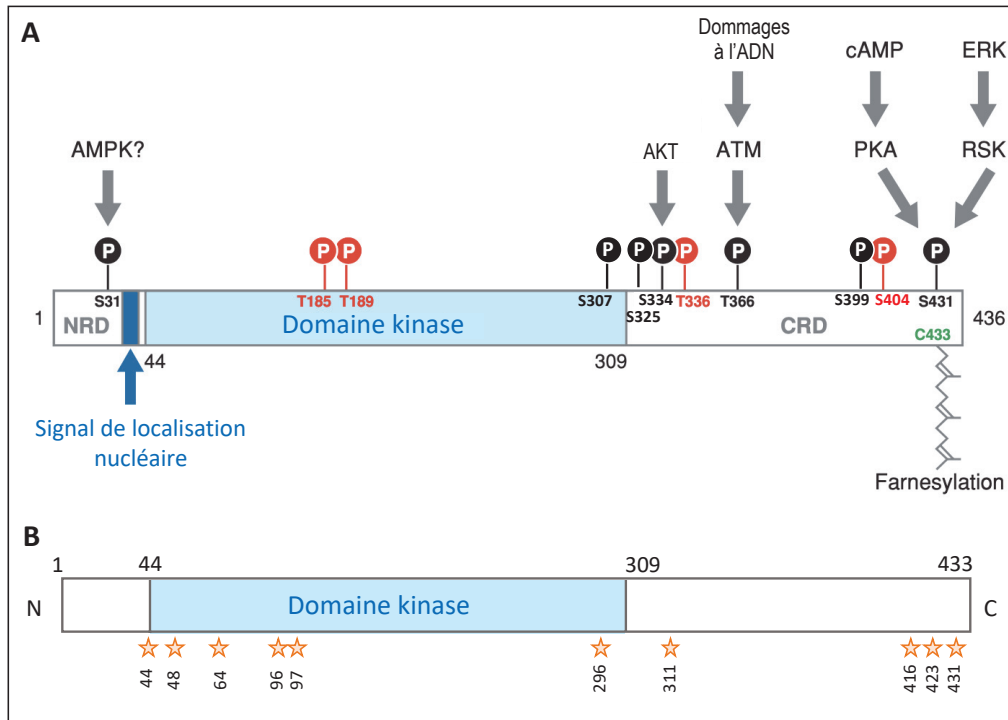


Figure 30 : Représentation des différentes modifications post-traductionnelles de LKB1.

(A) Représentation de la forme murine de LKB1. Les différents sites de phosphorylation sont représentés, les sites en rouge sont des sites d'autophosphorylation alors que les sites représentés en noir sont des sites phosphorylés par les différentes kinases indiquées. Le site de localisation nucléaire est représenté dans le domaine N-terminal. Le site C433 est un site de farnésylation représenté en vert. S : serine, T : thréonine, C : cystéine **(B)** Représentation de la forme humaine de LKB1 avec les différents sites d'acétylation possible (Lan et al., 2008; Bai et al., 2016) (Inspiré de Alessi et al., 2006)

a. Les phosphorylations

LKB1 est une protéine contenant divers sites de modifications post-traductionnelles induisant diverses régulations. Ainsi, elle possède 4 sites d'autophosphorylations (T185, T189, T336 et T402) et 6 sites de phosphorylation par d'autres kinases (S31, S307, S325, S334, T366, S399 and S431) (Alessi et al., 2006; Liu et al., 2012a; Xie et al., 2009; Zhu et al., 2013) **(Figure 30)**. Des mutations phospho-mimétiques ou phospho-déficientes des sites S31, S325, T366, S431 n'ont pas d'effet sur l'activité catalytique *in vitro* (Houde et al., 2014; Sapkota et al., 2002). Le site d'autophosphorylation **T336** chez l'Homme (S334 chez la souris) est nécessaire à la fonction de croissance de LKB1. En effet, une mutation phospho-mimétique T336E rend la protéine mutée plus active que LKB1 WT bloque l'activité de LKB1 sur la croissance de lignée cellulaire maligne humaine (G361) (Sapkota et al., 2002). Ces résultats indiquent que l'autophosphorylation de ce site permet une auto-inhibition de la kinase. Plus tard il a été montré que le site T336 phosphorylé se lie à 14-3-3 ce qui bloque l'interaction entre LKB1 et AMPK α (Bai et al., 2012). Ainsi ces résultats montrent que la phosphorylation sur le site T336 est nécessaire à l'auto-régulation de la kinase LKB1.

Le site **S431** est phosphorylé par trois protéines p90^{RSK}, PKA, et PKC ζ (Sapkota et al., 2001; Xie et al., 2006)(**Figure 30**). Cette phosphorylation est induite par la fixation des facteurs extracellulaires sur leur récepteurs comme la forskoline ou EGF/IGF1 et permet la croissance des fibroblastes embryonnaires (Sapkota et al., 2001). La forskoline permet l'activation de PKA par augmentation de cAMP intracellulaire ce qui permet la phosphorylation du site S431. La fixation de IGF1 permet l'activation de la PI3K qui induit l'activation de PDK1 pour *in fine* aboutir à l'activation p90^{RSK}. La fixation de EGF, quant-à elle, permet l'activation de RAF puis ERK et finalement p90^{RSK} qui phosphoryle le site S431. La phosphorylation du site S431 par PKC ζ a été démontrée dans des cellules endothéliales. Cette phosphorylation est induite par le peroxy-nitrite et la metformine et engendre la phosphorylation d'AMPK sur le site T172. La phosphorylation de LKB1 sur le site S431 permet l'augmentation de son interaction avec la kinase AMPK (Xie et al., 2006, 2008).

Par la suite, il a été démontré chez la drosophile que la phosphorylation du site S431 par PKA mais aussi la farnésylation du site C433 sont nécessaires pour la polarité cellulaire (Martin and St Johnston, 2003). C'est à partir de 2007 que cette fonction a été découverte chez les mammifères dans les neurones où il a été montré que la phosphorylation du site S431 était nécessaire pour la polarisation des neurones (Barnes et al., 2007; Shelly et al., 2007b).

La fonction du site S431 est controversée, en effet, de études montrent que la phosphorylation du site S431 n'a pas d'effet sur l'activité kinase de la protéine (Fogarty and Hardie, 2009; Houde et al., 2014; Sapkota et al., 2001) Cependant, diverses études montrent que cette phosphorylation est nécessaire pour induire la phosphorylation d'AMPK-RK comme les SAD (Barnes et al., 2007; Shelly et al., 2007a) ou encore la phosphorylation de l'AMPK induite par la metformine (Xie et al., 2008). Enfin, des études suggèrent que la phosphorylation de ce site est nécessaire pour la translocation de LKB1 dans le cytoplasme (Lan et al., 2017; Xie et al., 2008), à sa localisation dans les synapses excitatrices (Bernard and Zhang, 2015) ou encore nécessaire à la localisation asymétrique d'une autre protéine : Par-3 à l'interface entre les neurones et les cellules de Schwann (Shen et al., 2014).

Les souris LKB1^{S431A/S431A} sont viables, fertiles et aucun phénotype particulier n'a été observé (Houde et al., 2014).

PKC peut induire la phosphorylation du site **S307**, cette phosphorylation est importante pour le transport de LKB1 entre le noyau et le cytoplasme (Xie et al., 2009). En effet, une perte de la phosphorylation des sites S307 et S428 diminue son association avec STRAD α et CRM1 qui sont nécessaires pour l'export de LKB1 (Dorfman and Macara, 2008) (**Figure 28,30**). Ainsi, deux sites de phosphorylations sont nécessaires à l'export de LKB1 depuis le noyau.

Le site **S325** est lui phosphorylé par ERK et le complexe cycline D1-Cdk4/6 (Casimiro et al., 2017; Zheng et al., 2009). En effet dans les cellules de mélanomes une activation constitutive de ERK phosphoryle LKB1 sur ce résidu. Ces cellules expriment un variant de B-raf qui induit

l'activation de ERK. La phosphorylation de LKB1 sur S325 diminue l'activation d'AMPK (Zheng et al., 2009). En outre, la phosphorylation du site S325 par la cycline D1-Cdk4/6 induit elle-même aussi une diminution de l'activation de AMPK (Casimiro et al., 2017). Les premières études sur ce site montraient qu'il n'était pas impliqué dans l'activité catalytique de la protéine (Sapkota et al., 2002). Ces résultats suggèrent donc que l'activité n'est pas modifiée mais que ce site module l'interaction avec d'autres protéines (Zheng et al., 2009).

b. Farnésylation

En plus de ces sites de phosphorylation, LKB1 possède un site unique de farnésylation en C433 (**Figure 30**), ce site est conservé chez les orthologues de LKB1 de la drosophile et du xénope mais pas chez *C. elegans*. Les farnésylations sont l'ajout d'un groupement alcool (farnésol) au niveau d'une cystéine sur une protéine. Dans le cas de LKB1, une mutation de ce site n'induit pas de défaut de son activité kinase *in vitro* (Sapkota et al., 2001). En revanche, la mutation de ce site induit un défaut de localisation membranaire de LKB1 (Sapkota et al., 2001). Ainsi, la farnésylation du site C433 permet une localisation de LKB1 à la membrane plasmique.

Le site C433 est placé proche du site de phosphorylation S431, une mutation de ce site n'affecte pas le site C433 malgré sa proximité (Sapkota et al., 2001).

Les souris homozygotes déficientes pour le site C433 n'ont pas de phénotype particulier (Houde et al., 2014) hormis un changement de localisation. Dans les souris mutantes, la localisation de LKB1 est affectée, en effet, dans les souris WT, LKB1 est fortement exprimé dans le cytoplasme et dans la fraction membranaire alors que peu de LKB1 est retrouvé dans le noyau. Dans les souris mutantes en revanche, une faible concentration de LKB1 est retrouvé dans les fractions membranaire et nucléaire (Houde et al., 2014). Bien qu'il ait précédemment été démontré que le site C433 n'avait pas d'effet sur l'activité de LKB1, en 2014, il a été montré que dans les hépatocytes embryonnaires mais aussi dans les muscles extraits des souris mutantes C433, l'activation de l'AMPK est diminuée dans les souris mutantes ce qui a pour conséquence une diminution de la synthèse de lipides (Houde et al., 2014).

c. Acétylations

LKB1 est une protéine acétylée sur au moins 10 lysines identifiées : K44, 48, 64, 96, 97, 296, 311, 416, 423, and 431 (Bai et al., 2016; Lan et al., 2008) (**Figure 30**). La protéine SIRT1 est une déacétylase qui déacétyle spécifiquement la lysine 48 (K48) de LKB1. Cette déacétylation permet d'augmenter son interaction avec STRAD α et ainsi d'augmenter la fraction cytoplasmique de LKB1 dans les HEK293T (Lan et al., 2008). Cette augmentation de LKB1 dans le cytoplasme induit l'activation de l'AMPK. En outre, une surexpression de SIRT1 ou une augmentation de l'activité de SIRT1 induisent une augmentation de l'activité de l'AMPK par la déacétylation de LKB1 (Hou et al., 2008; Price et al., 2012). L'AMPK n'est pas la seule cible de

LKB1 touchée par ce processus, en effet la même étude montre que MARK1 est aussi plus ou moins phosphorylée en présence ou en absence de SIRT1 (Lan et al., 2008).

Cependant, dans les cellules endothéliales du foie, la déacétylation de LKB1 induit sa dégradation. En effet, dans le foie, SIRT1 possède une activité de protéine chaperonne qui ne dépend pas de son activité de déacétylation. Ainsi, SIRT1 se lie à K64 et recrute l'ubiquitine ligase E3 HERC2, HERC2 ubiquitine LKB1 dans le noyaux et diminue ainsi la quantité de LKB1 acétylée (Bai et al., 2016). La dégradation de LKB1 promeut la prolifération et inhibe la senescence endothéliale (Zu et al., 2010). De la même façon, SIRT2 promeut la déacétylation de LKB1 sur K48 dans les cardiomyocytes (Tang et al., 2017). En effet l'expression de SIRT2 est diminuée dans les souris avec une hypertrophie cardiaque, il en résulte une diminution de l'activation d'AMPK par LKB1 qui mène à l'hypertrophie. A contrario, une surexpression de SIRT2 augmente l'activité d'AMPK dans ces modèles de souris (Tang et al., 2017).

Ainsi l'ensemble de ces résultats montrent que la régulation de l'acétylation de la protéine est un processus majeur de sa régulation et celle-ci est cellule dépendante.

C- Fonctions de LKB1

1) LKB1 et cancer

Des mutations somatiques de LKB1 sont associées à divers cancers comme le cancer des poumons (Carretero et al., 2010; Sanchez-Cespedes et al., 2002), les mélanomes (Liu et al., 2012b), les cancers du pancréas (Morton et al., 2010) ou encore le cancer de l'endomètre (Contreras et al., 2010). Trois grandes fonctions, résumées **figure 31**, sont attribuées à LKB1 sur les cellules cancéreuses : la suppression de la croissance des cellules cancéreuses, la régulation de la mort cellulaire et l'inhibition de la formation de métastases.

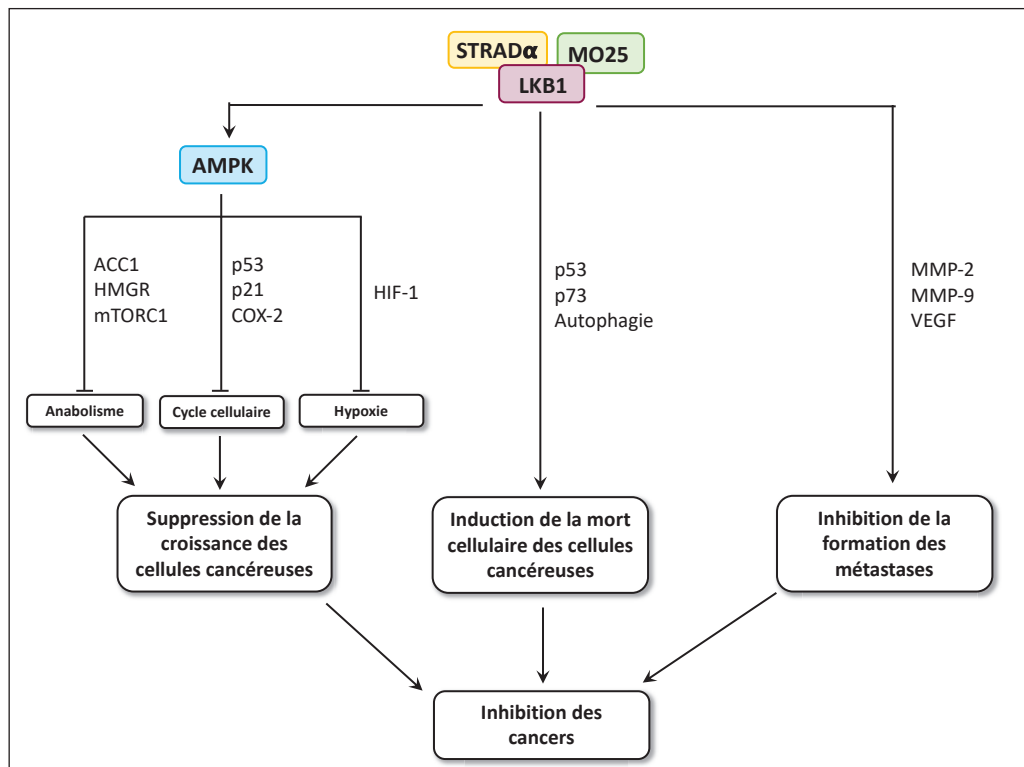


Figure 31 : Représentation schématique des différents processus régulés par LKB1 dans sa fonction de suppresseur de tumeur. L'activité de LKB1 sur l'AMPK permet la régulation de la croissance des cellules cancéreuses. En effet, la phosphorylation de l'AMPK sur la T172 permet d'inhiber différentes fonctions nécessaires à la croissance comme l'anabolisme, le cycle cellulaire et l'hypoxie. De plus, LKB1 est capable d'induire la mort cellulaire des cellules cancéreuses par le biais des protéines p53 et p73 mais aussi d'inhiber la formation des métastases par l'activation des métalloprotéases MMP-2 et 9. (Adapté de Gan et Li, 2014)

La suppression de la croissance des cellules cancéreuses est permise par l'augmentation du stress métabolique dans ces cellules. Dans ce contexte la voie LKB1/AMPK est activée pour inhiber l'anabolisme (synthèse de lipides, cholestérol et protéine), arrêter le cycle cellulaire et inhiber la croissance. Les mécanismes aboutissant à la suppression de la croissance par l'AMPK seront abordés dans un futur paragraphe.

Outre la régulation de l'AMPK par l'augmentation du stress métabolique, LKB1 régule les protéines p21 et p53 afin d'induire l'arrêt du cycle cellulaire. En effet, l'arrêt du cycle cellulaire par LKB1 est permis par une régulation de l'expression de p21, un inhibiteur de CDK (Tainen et al., 2002; Zeng and Berger, 2006). Cet effet est indépendant de p53 (Setogawa et al., 2006), cependant, LKB1 interagit avec p53 dans le noyau pour la stabiliser et induit la phosphorylation de p53 sur les serines 15 et 392 qui sont nécessaires pour l'arrêt du cycle cellulaire par LKB1 (Zeng and Berger, 2006). Ainsi, LKB1 *via* l'activation de p53 permet l'induction de l'apoptose (Karuman et al., 2001). **(Figure 31).**

Dans certains types cellulaire comme des cellules cancéreuses du pancréas (AsPC-1), p53 n'est pas exprimée et ces cellules cancéreuses ont un défaut de l'expression de LKB1 (Qanungo et

al., 2003). Dans ce contexte, l'expression de LKB1 peut-être restaurer par l'utilisation d'un inhibiteur de méthylation ce qui induit l'apoptose médiée par les mitochondries par relargage du cytochrome C et les auteurs suggèrent que cela est rendu possible par l'activation de p53 (Qanungo et al., 2003).

Pour finir, l'inhibition de la formation des métastases par LKB1 a été démontrée *in vitro* et *in vivo* dans des cancers du sein. Une surexpression de LKB1 dans ces cellules induit l'inhibition de la formation de métastase. Cette inhibition est associée à une diminution de l'expression des métalloprotéases MMP-2 et MMP-9 ainsi que du facteur de croissance VEGF et de la taille de vaisseau sanguin (Zhuang et al., 2006) (**Figure 31**). Les métalloprotéases sont des enzymes importantes pour la dégradation de composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène ou les protéoglycans (Iurlaro et al., 1999). Cette dégradation est nécessaire pour l'invasion des carcinomes. Ainsi l'inhibition de ces enzymes par LKB1 permet l'inhibition de la formation de métastases (Zhuang et al., 2006).

2) Régulation de l'AMPK

L'AMPK est un senseur métabolique de la cellule, c'est une kinase qui modifie son activité en fonction du niveau d'ATP dans la cellule. L'activation de l'AMPK permet de restaurer le niveau d'énergie dans la cellule par la stimulation de voies cataboliques comme la glycolyse, l'oxydation des acides gras ou l'inhibition de processus anaboliques comme la synthèse de protéines, de lipides ou encore la néoglucogénèse (Alessi et al., 2006; Herzig and Shaw, 2018).

L'AMPK est composé d'un complexe hétérotrimérique comprenant la sous-unité catalytique AMPK α , et les deux sous-unités régulatrices AMPK β et AMPK γ . L'AMP permet l'activation de l'AMPK par la liaison sur la sous-unité AMPK γ (Scott et al., 2004). La stimulation de l'AMPK se fait sur la Thr172 sur les deux sous-unités catalytiques AMPK α 1 et α 2. LKB1 permet la phosphorylation de l'AMPK T172 *in vitro* lorsque le niveau d'ATP cellulaire est diminué (Hawley et al., 2003; Shaw et al., 2004; Woods et al., 2003). La capacité de LKB1 à phosphoryler AMPK est permise par son association avec le complexe STRAD/MO25 (Hawley et al., 2003). Les deux processus majeurs régulés par l'AMPK sont les processus anaboliques et cataboliques que je vais détailler dans les paragraphes suivants.

a. Inhibition de l'anabolisme

Dans les cellules cancéreuses, la croissance anarchique des cellules peut être inhibée par l'action de LKB1. Ceci est expliqué en partie par le stress métabolique induit dans les cellules cancéreuses comme l'hypoxie ou le stress métabolique. Dans ce contexte, la voie de signalisation LKB1/AMPK est activée (Hardie and Alessi, 2013), ce qui permet d'inhiber

l'anabolisme et d'induire l'arrêt du cycle cellulaire pour finalement aboutir à la suppression de la cellule cancéreuse.

Pour permettre l'inhibition de l'anabolisme des cellules cancéreuses, la voie de signalisation LKB1-AMPK inhibe différents processus métaboliques comme la production d'acide gras par l'inhibition de l'acétyl-CoA carboxylase 1 (ACC1), la synthèse des stérols grâce à l'inhibition de 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase (HMGR) et la synthèse de protéine par l'inhibition de mTORC1 (Hardie and Alessi, 2013) (**Figure 31-32**).

La régulation de l'arrêt du cycle cellulaire par LKB1/AMPK est médiée par diverses protéines comme TSC2, p53 ou COX-2. Dans les cellules cancéreuses, l'activation de l'AMPK inhibe la croissance cellulaire et induit l'arrêt du cycle cellulaire, de plus cet effet est corrélé avec la suppression de l'anabolisme par l'inhibition de TSC2 (Hardie, 2005; Shaw, 2009; Xiang et al., 2004; Zakikhani et al., 2006). De plus, LKB1 inhibe la croissance des cellules cancéreuses par l'inhibition de COX-2. En effet, une inhibition de COX-2 permet l'arrêt du cycle cellulaire et l'inhibition de la croissance. De plus, l'activation d'AMPK induit une diminution de l'expression de COX-2 et de la prolifération cellulaire (Hwang et al., 2006). En outre, une surexpression de LKB1 induit une diminution de l'expression de COX-2 dans les cellules cancéreuses de poumons (Upadhyay et al., 2006). Ainsi l'ensemble de ces résultats montrent que la voie de signalisation LKB1-AMPK-COX2 est impliquée dans l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuse (**Figure 31**).

Enfin, LKB1 inhibe la croissance des cellules cancéreuses en régulant HIF-1, un facteur de transcription suractivé dans des conditions d'hypoxie. HIF-1 active des gènes permettant la survie des cellules cancéreuses (Powis and Kirkpatrick, 2004). La voie de signalisation LKB1-AMPK régule négativement mTORC1 (Shaw et al., 2004), alors que HIF-1 est régulé positivement par mTORC1 (Thomas et al., 2006). Dans les tumeurs où l'expression de LKB1 est diminuée, il a été observé une augmentation de mTORC1 et HIF-1 (Shackelford et al., 2009). Ainsi, ces résultats montrent que LKB1-AMPK-mTORC1 inhibe l'expression de HIF-1 et de ces gènes cibles (responsable de la survie cellulaire) ce qui permet la suppression de la croissance des cellules cancéreuses dans des conditions hypoxiques (**Figure 31**).

En outre, l'AMPK a aussi pour fonction d'inhiber le stockage du glycogène (**Figure 32**), ce processus est permis par l'inhibition de la phosphorylation de GYS1 et 2, des glycoènes synthases (Bultot et al., 2012). De plus, elle phosphoryle la protéine GFAT1 qui inhibe la synthèse des hexosamines et les modifications O-GlcNAc (Eguchi et al., 2009; Zibrova et al., 2017) afin de limiter la consommation d'ATP.

Comme la croissance cellulaire et la synthèse de protéines sont des mécanismes à forte consommation d'ATP, l'AMPK peut être activé lors de ces processus et régule dans ce cas la kinase mTOR. En effet, l'activation de l'AMPK induit l'inhibition de mTORC1 par deux mécanismes indépendants : 1) l'activation du régulateur négatif de mTORC1 : TSC2 (Inoki et

al., 2003), 2) l'inhibition de Raptor une sous unité de mTORC1 (Gwinn et al., 2008). Dans des conditions riches en nutriments, l'AMPK est inactif et mTOR est actif, alors que dans le cas inverse, l'augmentation de l'activité de l'AMPK induit la diminution de l'activité de mTOR. Une autre façon de réguler la synthèse de protéine pour AMPK est la phosphorylation de eEF2K. En effet, eEF2K est un inhibiteur de l'élongation protéique (Leprivier et al., 2013), ainsi, sa phosphorylation par l'AMPK permet d'inhiber la synthèse de protéine. En conclusion, l'inhibition de l'anabolisme par l'AMPK permet de diminuer la consommation d'ATP dans des conditions de stress énergétique (**Figure 32**).

b. La stimulation des voies cataboliques

La stimulation de la production d'ATP est permise par la promotion de l'utilisation du glucose, la mobilisation des lipides et de l'autophagie afin de permettre le roulement des macromolécules (**Figure 32**).

L'activation de l'AMPK permet d'induire la phosphorylation de TXNIP (Wu et al., 2013) et TBCD1 (Chavez et al., 2008) des protéines impliquées dans le trafic des transporteurs du glucose, afin de permettre l'augmentation du glucose intracellulaire. Ainsi, TXNIP et TBCD1 permettent, respectivement, l'augmentation à la surface membranaire des transporteurs GLUT1 et GLUT4. La stimulation de l'utilisation du glucose est aussi permise par la phosphorylation de la phospholipase D1 (PLD1) par AMPK 102. Enfin, la glycolyse est stimulée par l'AMPK grâce à la phosphorylation de PFKFB1 qui inhibe PFK1, une enzyme limitant la vitesse de la glycolyse (Bando et al., 2005).

L'utilisation des lipides par la cellule est aussi permise par l'AMPK (**Figure 32**). En effet, l'utilisation des lipides est induite par la stimulation d'enzyme de relargage des acides gras comme la lipase triglycéride adipeuse (ATGL) (Ahmadian et al., 2011). Le relargage des acides gras permet ensuite leur transport dans les mitochondries pour la β -oxydation qui engendre *in fine* la production d'ATP.

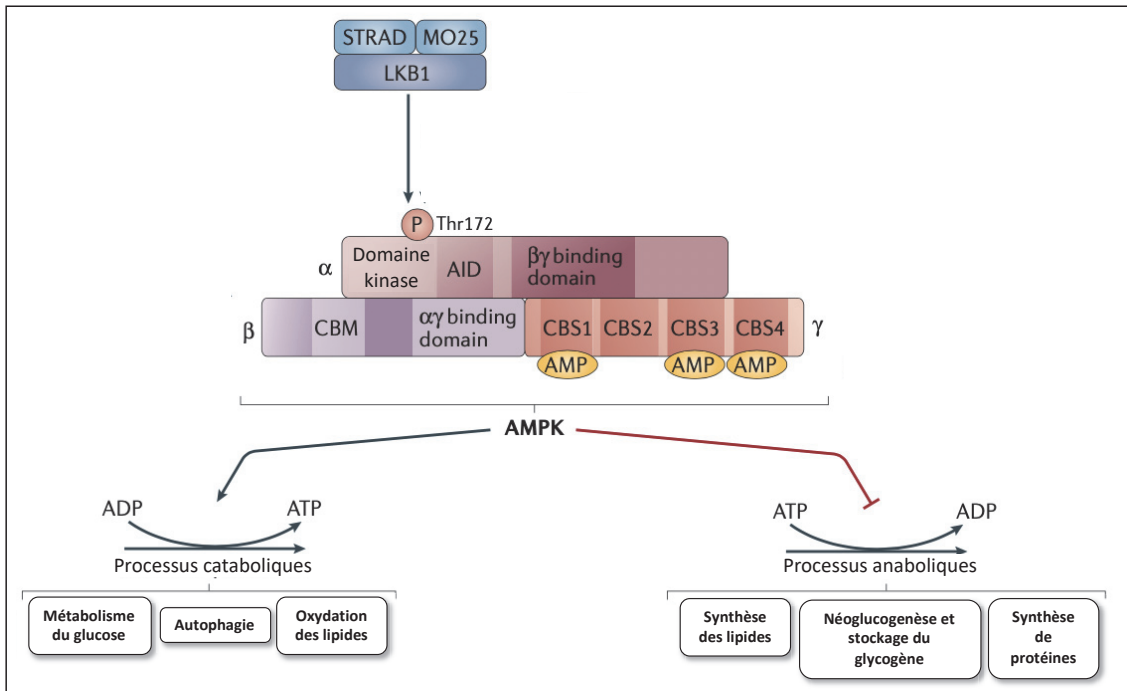


Figure 32 : Représentation des fonctions de l'AMPK permises par la phosphorylation de LKB1. Via la kinase AMPK, LKB1 permet la régulation métabolique des cellules. AMPK permet de conserver un équilibre métabolique en stimulant les processus cataboliques permettant de produire de l'ATP tels que : le métabolisme du glucose, l'autophagie et l'oxydation des lipides et en inhibant les processus anaboliques qui consomment de l'ATP tels que la synthèse des lipides, la néoglucogenèse et la synthèse de protéines. (Herzig and Shaw, 2017)

3) Régulation des autres AMPK-RK

LKB1 permet la régulation des kinases de la famille des AMPK-RK. Elle permet l'activation de 14 kinases de la famille de l'AMPK (AMPK α 1, AMPK α 2, NUAK1, NUAK2, SAD-A, SAD-B, SIK1-3 et MARK1-4, SNRK) (Lizcano et al., 2004) (**Figure 33**). Toutes ces kinases sont composées d'un domaine catalytique en N-terminal, suivies d'un domaine d'ubiquitination et partagent une séquence conservée (T-loop) qui est phosphorylée par LKB1 afin d'augmenter l'activité de ces kinases (Lizcano et al., 2004) et de contrôler des mécanismes intracellulaires tels que le métabolisme, la croissance et la polarité (George et al., 2016; Miyoshi et al., 2002; Tanwar et al., 2014). Les AMPK-RK sont les seules kinases possédant un domaine d'ubiquitination localisé dans la partie C-terminale de leur domaine catalytique (Manning et al., 2002). Ce domaine est nécessaire aux AMPK-RK pour la phosphorylation et l'activation par LKB1 (Jaleel et al., 2006), il a été proposé que ce domaine permet l'interaction des domaines catalytiques ce qui induit un changement de conformation nécessaire à la phosphorylation par LKB1 (Jaleel et al., 2006). La séquence commune des AMPK-RK est composée de 29 acides aminés : DFGØsnXØXXgX--XLXTØCGSPXYAaPE avec ; Ø indiquant un résidu hydrophobique, X tout acide aminé, s, n, g et a des préférences respectives pour Ser, Asn, Gly et Ala (Lizcano et al., 2004). Bien que ces

protéines puissent être phosphorylées par d'autres kinases sur cette séquence, seule LKB1 est capable de phosphoryler l'ensemble des kinases de la famille de l'AMPK (Bright et al., 2009). En outre, des cellules déficientes pour LKB1 montrent une diminution de l'expression des kinases NUAks, SIKs et MARKs (Lizcano et al., 2004).

Malgré leurs ressemblances, seules les kinases MARK 1, MARK4, SAD-A ainsi que SAD-B sont exprimées uniquement dans le cerveau (Bright et al., 2009). Hormis les kinases SIK1 et 2 qui sont exprimées respectivement dans les glandes surrénales et le tissu adipeux, toutes les autres kinases sont ubiquitaires (Bright et al., 2009).

Dans le cerveau toutes ces kinases ont un rôle dans la régulation des microtubules par la protéine associée aux microtubules Tau. Les sites de phosphorylation de Tau sont dépendants de ces kinases. MARK1, SIK, SAD-A/B induisent des phosphorylations de Tau d'intensités différentes sur les sites S262, S356 ainsi que T212 (Yoshida and Goedert, 2012). MARK1, SAD-A et SIK induisent aussi la phosphorylation du site S214 (Yoshida and Goedert, 2012) alors que NUAk1 permet la phosphorylation de Tau sur le site S356 pour induire sa stabilisation (Lasagna-Reeves et al., 2016). **(Figure 33)**

La phosphorylation de Tau par ces diverses kinases mène à la dissociation de celle-ci des microtubules, ce qui induit *in fine* la déstabilisation des microtubules (Biernat et al., 2002; Kojima et al., 2007) et interfère avec l'activité des protéines moteurs (Stamer et al., 2002).

Dans les paragraphes précédents j'ai détaillé le rôle de l'AMPK, je vais donc dans ce paragraphe développer l'activité des autres kinases de la famille de l'AMPK induite par LKB1.

Diverses AMPK-RK sont nécessaires à la morphologie neuronale. Comme vu dans la 1^{ère} partie, les kinases **SAD-A et B** aussi connues sous le nom de BRSK1 (SAD-B) et BRSK2 (SAD-A) sont nécessaires à la polarité neuronale. Ce sont des orthologues des kinases SAD de la souris et de *C. elegans*. Cependant, elles ont aussi un rôle dans l'activité synaptique. En effet, SAD-B est associée à des vésicules synaptiques dans les neurones de l'hippocampe et permet le relargage des vésicules synaptiques par la phosphorylation de RIM1 (Inoue et al., 2006).

Les kinases **MARKs** sont elles aussi impliquées dans la polarité cellulaire, ce sont des orthologues de Par-1 chez *C. elegans*. Elles ont été purifiées dans le cerveau et ont pour rôle la phosphorylation de protéines associées aux microtubules (MAPs) telles que MAP2, MAP4, tau ou encore la doublecortine afin de provoquer leur détachement des microtubules (Drewes et al., 1997). Elles sont localisées de façon asymétriques dans les cellules épithéliales et les kinases MARK1 et 2 sont nécessaires pour la polarité des cellules rénales et hépatiques (Cohen et al., 2004). Chez la drosophile, la phosphorylation de Par-1 par LKB1 est nécessaire pour promouvoir la phosphorylation de tau (Wang et al., 2007b).

Ainsi, ces deux groupes de kinases SAD et MARK peuvent réguler la polarité cellulaire par le biais de l'activation par LKB1 **(Figure 33)**.

Une autre étape de la morphogénèse axonale régulée par les AMPK-RK, est la formation de branches axonales. La famille des protéines **NUAKs** est composée de deux membres NUAK1 (ou ARK5) et NUAK2 (ou SNARK). La localisation de **NUAK1** a récemment été étudiée dans différentes lignées cellulaires qui montre une localisation nucléaire de la protéine (Palma et al., 2019). Plus précisément, NUAK1 est localisée dans la chromatine dans les cellules d'ostéosarcome U2OS (Cossa et al., 2020). Durant plusieurs années un seul interacteur de NUAK1 était connu : MYPT1. A travers cette interaction, NUAK1 régule la myosine par la phosphorylation de MYPT1, cette phosphorylation est rendue possible par la phosphorylation de NUAK1 par LKB1 (Zagorska et al., 2010) (**Figure 33**). MYPT1 est une sous-unité de la myosine phosphatase qui permet la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (Ito et al., 2004). Récemment, deux nouveaux interacteurs ont été identifiés : la phosphatase PP1 et PNUTS une sous-unité régulatrice de PP1 (Cossa et al., 2020) et lui confère un rôle de régulateur du spliceosome. En effet, un défaut de NUAK1 induit un défaut de phosphorylation de nombreuses protéines nucléaires ce qui montre que NUAK1 protège leur déphosphorylation (Cossa et al., 2020). La régulation de PNUTS par NUAK1 permet de promouvoir l'activité du spliceosome. Ainsi, par le biais de PNUTS, NUAK1 est capable de réguler l'épissage alternatif dans les cellules (**Figure 33**).

NUAK2 à un rôle de protection contre le cancer (**Figure 33**) elle est activée de façon cellule spécifique par des stress hyper-osmotiques, les dommages à l'ADN, le stress oxydatif ou encore l'AMP (Lefebvre and Rosen, 2005; Lefebvre et al., 2001). Dans le cerveau humain, une perte de fonction de NUAK2 provoque une anencéphalie fœtale par dérégulation du réseau d'actomyosine apicale ce qui bloque la fermeture du tube neural (Bonnard et al., 2020). Dans les muscles, les mécanismes induisant l'augmentation du transport de glucose sont encore mal compris. Lors de la contraction musculaire NUAK2 est augmentée et cet effet est perdu dans des muscles où l'expression de LKB1 est diminuée (Koh et al., 2010). Un seul substrat de NUAK2 est connu à ce jour, MYPT1, qui a été identifié par essai kinase *in vitro* (Yamamoto et al., 2008). (**Figure 33**).

Les kinases **SIK** sont les premières kinases découvertes dans les glandes surrénales de rat possédant un régime fort en sel (Wang et al., 1999). L'activation de **SIK1** par LKB1 induit la phosphorylation de TORC pour aboutir à l'export et l'inhibition de CREB (Kato et al., 2006). (**Figure 33**). **SIK2** aussi connue sous le nom de QIK, a un rôle de phosphorylation sur deux protéines aussi phosphorylées par l'AMPK sur le même résidu : un substrat à l'insuline (IRS1) (Horike et al., 2003; Jakobsen et al., 2001) et TORC2 le coactivateur de CREB. TORC est un co-activateur de CREB permettant d'augmenter l'activité de CREB dans le noyau. Cette phosphorylation permet l'interaction de TORC2 et la protéine chaperonne 14-3-3 et permet

ainsi la séquestration de TORC2 dans le cytoplasme afin de bloquer la transcription de gènes dépendants de CREB (Screaton et al., 2004; Shaw et al., 2005). Dans ce contexte, LKB1 permet la régulation de la localisation de la protéine. En effet, dans des souris invalidées pour le gène LKB1 dans le foie, TORC2 est localisée dans le noyau et n'est pas phosphorylée par SIK2/AMPK (Shaw et al., 2005). Ainsi, l'activité de LKB1 est nécessaire pour la fonction de SIK. Enfin, **SIK3** est une kinase nécessaire à la prolifération cellulaire, en effet, chez la drosophile, une diminution de l'expression de SIK3 induit des défauts d'alignement des chromosomes (Bettencourt-Dias et al., 2004). En outre, l'activation de SIK3 par LKB1 est permise par l'interaction avec la protéine 14-3-3. Cette interaction permet la régulation de la localisation cellulaire de SIK3 (Al-Hakim, 2005) (**Figure 33**).

SNRK est une kinase exprimée uniquement dans les testicules et sa fonction est peu connue. Cependant, nous savons que la forme tronquée de LKB1 est elle aussi exprimée dans les testicules et est essentielle à la spermatogénèse. En effet, les mâles avec une diminution de l'expression de LKB1 et de sa forme tronquée sont stériles (Sakamoto et al., 2005). Ainsi, il est proposé que le rôle de LKB1 dans les testicules est médié par SNRK (Jaleel et al., 2005) (**Figure 33**).

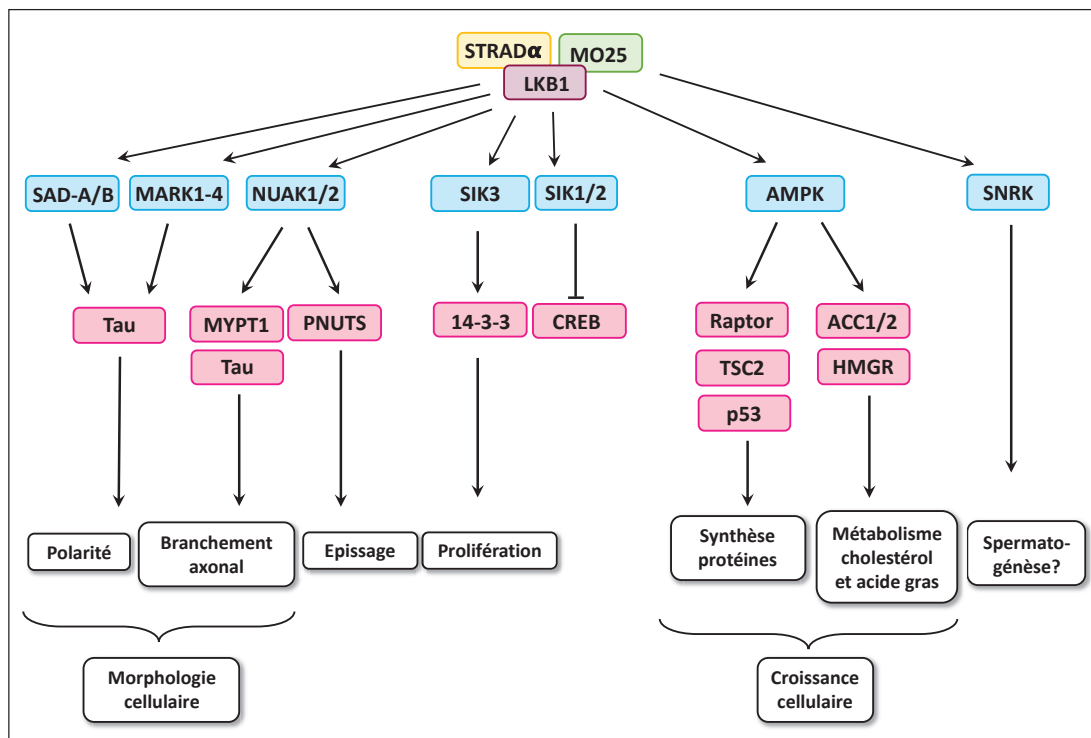


Figure 33 : Représentation des fonctions des différentes kinases de la famille de l'AMPK activées par LKB1. LKB1 permet la régulation de nombreux processus biologiques à travers des kinases intermédiaires appartenant à la famille de l'AMPK. L'activation de ces kinases induit la régulation d'autres protéines intermédiaires qui agissent sur des fonctions telles que : la spermatogénèse, la morphologie cellulaire, la prolifération cellulaire, la transcription, le métabolisme et la croissance cellulaire. (Bleue : kinases de la famille de l'AMPK, Rose : protéines activées par les AMPK-RK)

4) Rôle de la protéine LKB1 dans le développement neuronal

a. Morphologie axonale

LKB1 est une protéine majeure dans le développement neuronale, en effet elle est impliquée dans de nombreux processus comme la migration (Asada et al., 2007), la polarité, la croissance axonale, le branchement terminal ou encore les processus de croissance, d'orientation et d'espacement des dendrites (Kuwako and Okano, 2018a).

La fonction de polarisation par LKB1 nécessite la phosphorylation de son site S431 ciblé par PKA et p90RSK (Barnes et al., 2007; Shelly et al., 2007a) (**Figure 34, 35**). Une fois phosphorylée, elle active différentes kinases pour induire l'initiation axonale (**Figure 34, 35**). En effet, LKB1 va phosphoryler les kinases SAD-A et B (Barnes et al., 2007; Kishi, 2005) qui sont nécessaires à la polarité neuronale par leur activité de phosphorylation de protéines associées aux microtubules comme Tau, MAP2 et 4 (**Figure 34**). La phosphorylation de ces protéines associées aux microtubules va induire une perte d'affinité pour l'extrémité positive des microtubule et par conséquent augmenter la déstabilisation des microtubules (Drewes et al., 1997). De plus, *in vitro* dans les neurones corticaux avec une diminution de l'expression LKB1, la formation de l'axone est inhibée alors qu'une surexpression de LKB1 induit la formation de multiples axones (Asada et al., 2007; Barnes et al., 2007; Shelly et al., 2007b). En outre, cette formation d'axones multiples est inhibée lorsque l'on inhibe l'expression de SAD par ARN interférents (Barnes et al., 2007). *In vivo*, une diminution de l'expression de LKB1 spécifiquement dans les progéniteurs du télencéphale dorsal induit une diminution de l'épaisseur du cortex qui reflète la mort de neurones post-mitotiques. Au niveau axonal, une agénésie du corps calleux a été observé ainsi qu'un faible nombre d'axones corticofugaux. Un marquage axonal a permis d'observer une forte diminution des axones corticaux en condition d'inhibition de l'expression de LKB1. L'observation de coupes organotypiques, après électroporation *ex vivo* induisant une inhibition de l'expression de LKB1, montre une diminution du nombre de neurones polarisés. Ces résultats montrent que LKB1 est nécessaire à la polarisation des neurones corticaux *in vivo* pendant la migration neuronale dans la zone intermédiaire (Barnes et al., 2007).

La diminution de l'expression de LKB1 et de SAD A/B ciblée dans tous les progéniteurs neuronaux montrent des effets similaires à la précédente étude de l'équipe de F. Polleux au niveau cortical (Lilley et al., 2013). En revanche, les axones des autres zones du système nerveux ne sont pas affectés par cette diminution démontrant ainsi que la voie de signalisation LKB1/SAD est nécessaire uniquement dans les neurones corticaux (Lilley et al., 2013).

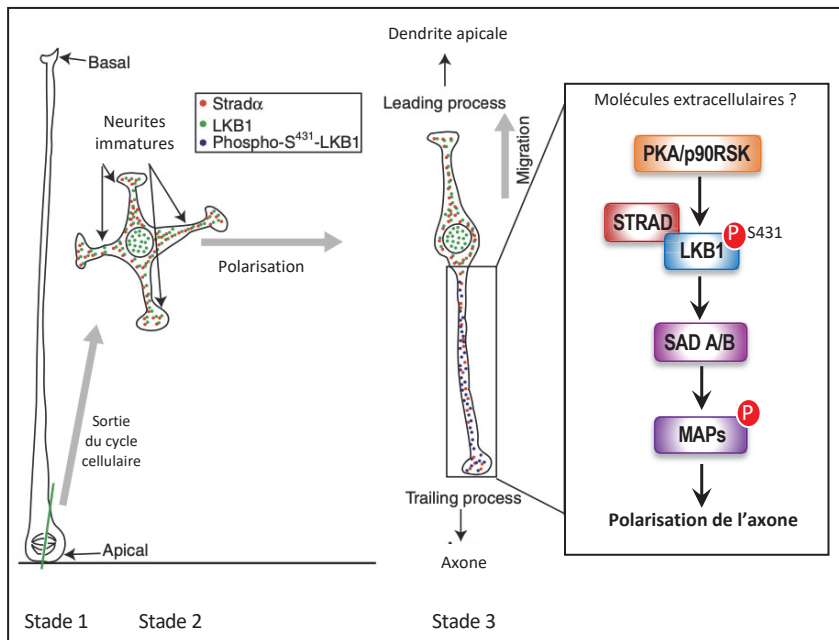


Figure 34 : Polarisation de l'axone par LKB1. Après sortie du cycle cellulaire, au stade 2 le neurone immature possède de multiples neurites, l'export de LKB1 du noyau vers le cytoplasme est permis par l'action de STRAD. LKB1 est ensuite phosphorylée sur le site S431 et sous cette forme, se localise dans l'axone, pour activer SAD A/B afin de permettre la polarisation de l'axone. (Adapté de Barnes and Polleux 2009)

En plus de l'activation des SAD, LKB1 est aussi impliquée dans la polarité neuronale par régulation de la distribution de l'appareil de Golgi. Bien que le rôle de la protéine STK25 soit majoritairement décrit dans la polarité des cellules épithéliales, un rôle de cette protéine dans les neurones d'hippocampe a été décrit (Matsuki et al., 2010). *In vitro*, une surexpression de la protéine STK25 induit une condensation de l'appareil de Golgi et la formation de multiples axones (Matsuki et al., 2010). De plus, une diminution de l'expression de STK25 par ARN interférent inhibe la spécification de l'axone. Cette même étude montre que STK25 interagit avec STRAD α (co-activateur de LKB1) ainsi qu'une protéine de la matrice de l'appareil de Golgi, GM130. Cette interaction permet la régulation de LKB1 par STK25. Ainsi, la surexpression de Stk25 dans des cellules simultanément à la diminution de l'expression de LKB1 permet de restaurer la polarité des cellules épithéliales (Matsuki et al., 2010). STK25 est connue pour réguler la morphologie de l'appareil de Golgi, ainsi, les auteurs proposent que son interaction avec STRAD α et LKB1 permet la condensation de l'appareil de Golgi au niveau du futur axone et inhibe le croissance de Golgi dans les dendrites (Matsuki et al., 2010). C'est l'export de LKB1 hors du noyau, médié par RanBP1, qui permet son action sur l'appareil de Golgi (Mencarelli et al., 2018). En effet, *in vitro*, dans les neurones corticaux de rats, une inhibition de l'expression de RanBP1 induit une diminution du nombre de neurones polarisés après 72h de culture. Ce résultat montre que RanBP1 est nécessaire à la polarisation. En outre, une surexpression de RanBP1 dans les neurones induit une augmentation de l'accumulation de LKB1 dans le cytoplasme (Mencarelli et al., 2018). Enfin, le phénotype observé dans les neurones présentant une diminution de l'expression de RanBP1 peut être restauré par la surexpression de STK25, ce qui montre que la fonction de RanBP1 durant l'axogénèse est médiée par LKB1.

Par ailleurs, LKB1 est également impliquée dans la croissance axonale (Courchet et al., 2013; Vaarmann et al., 2016). En absence de LKB1, la croissance des axones diminue *in vitro* (Courchet et al., 2013). LKB1 régule la croissance axonale par l'activation de PGC-1 α qui est un régulateur mitochondrial. En effet, l'activation de PGC-1 α favorise la biogénèse des mitochondries afin de subvenir aux besoins énergétique nécessaires à la croissance (Vaarmann et al., 2016) **(Figure 35)**. Par ailleurs, LKB1 est impliquée dans la régulation du calcium des mitochondries (Kwon et al., 2016).

Une fois l'axone formé LKB1 intervient dans la formation des branches axonales **(Figure 35)**. En effet, une diminution de l'expression de LKB1 ou de NUAK1 dans les neurones corticaux ayant déjà établi leur polarité diminue la formation des branchements terminaux *in vitro* et *in vivo* (Courchet et al., 2013). A l'inverse, une surexpression de LKB1 ou de NUAK1 induit une augmentation du branchement axonal *in vitro*. En outre, une surexpression de LKB1 en présence d'un ARN interférent ciblant *Nuak1* ne montre pas d'augmentation du nombre de branches ce qui n'est pas le cas lorsque l'expérience inverse est effectuée. Ce résultat indique que LKB1 contrôle le branchement axonale par la régulation de NUAK1 (Courchet et al., 2013). De plus, dans les neurones présentant une diminution de l'expression de LKB1 ou de NUAK1, la mobilité des mitochondries est augmentée et cela corrèle avec une diminution du branchement. En effet, une surexpression SNPH afin d'immobiliser les mitochondries dans les neurones KO LKB1 ou NUAK1 permet la restauration du branchement (Courchet et al., 2013). Enfin cette étude montre que les mitochondries ne s'arrêtent pas de façon aléatoire le long de l'axone mais se stabilisent au niveau des sites présynaptiques (Courchet et al., 2013) qui régule positivement la stabilisation des branches (Meyer and Smith, 2006; Ruthazer et al., 2006).

b. Morphologie dendritique

Tous ces résultats montrent que LKB1 est fortement impliquée dans le développement axonal, toutefois elle est également impliquée dans le développement des dendrites de différents types neuronaux. Chez *C. elegans*, l'orthologue de LKB1, Par-4, favorise la croissance dendritiques des motoneurones sous le contrôle de UNC6, orthologue de la netrine (Teichmann and Shen, 2011) **(Figure 35)**.

Dans les cellules granulaires se formant à l'âge adulte dans l'hippocampe, LKB1 régule la position de l'appareil de Golgi à la base de la dendrite primaire (Huang et al., 2014). Récemment il a été proposé que le positionnement asymétrique de l'appareil de Golgi médié par LKB1 pourrait aussi être responsable de l'orientation des dendrites par la stabilisation du complexe STK25-STRAD α -GM130 (Rao et al., 2018) **(Figure 35)**. Enfin, dans les cellules de Purkinje, un mécanisme permet aux dendrites de ne pas s'entrecroiser les unes les autres, ce mécanisme est appelé "dendrite self-avoidance" (Lawrence Zipursky and Grueber, 2013). Ce mécanisme est en partie contrôlé par le complexe de surface Slit2/Robo2 qui permet la

répulsion des dendrites dans les cellules de Purkinje (Gibson et al., 2014). Dans ces mêmes cellules, une diminution de l'expression de LKB1 induit une forte diminution de l'expression de Robo2 et augmente les croisements dendritiques. Cette diminution est régulée par les kinases SIK1 et SIK2 dont l'activité réduit l'expression membranaire de Robo2 (Kuwako and Okano, 2018b) (**Figure 35**).

L'implication de LKB1 dans toutes ces étapes de la formation neuronale en fait donc une protéine majeure pour l'étude de la morphogénèse neuronale.

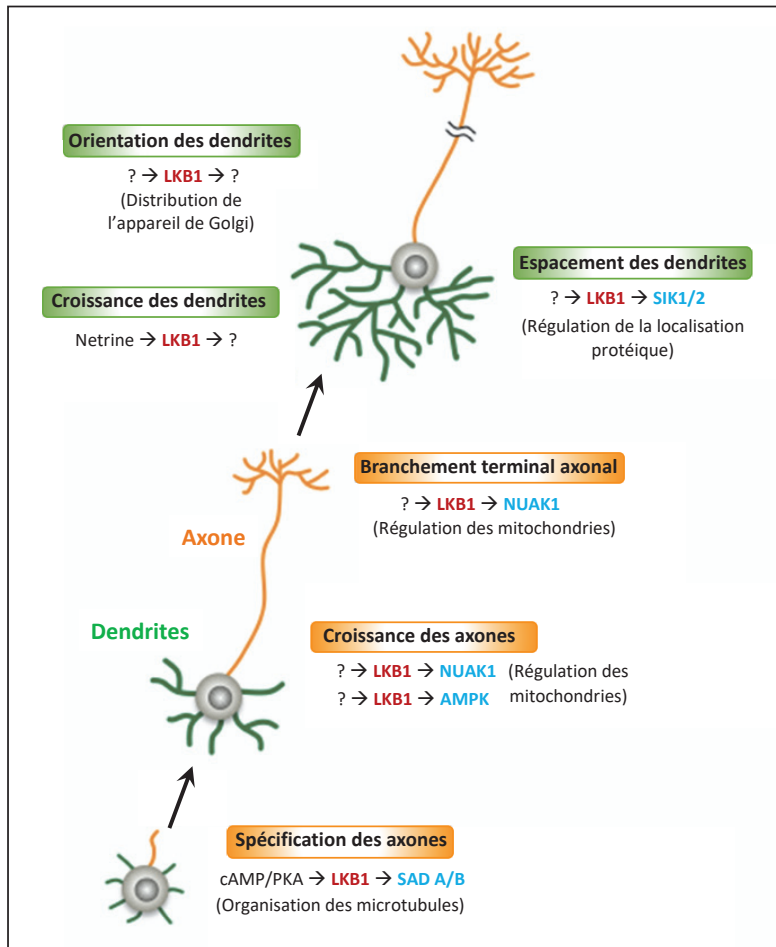


Figure 35 : Différents rôles de LKB1 dans le développement neuronal.

LKB1 est impliquée dans le développement neuronal depuis le neurone immature jusqu'au neurone mature. Il induit des modifications dans la morphologie axonale par la polarisation de l'axone, la croissance et le branchement terminal. Au niveau dendritique, LKB1 est impliquée dans leur croissance, leur orientation et leur espacement.

Pour ses différents rôles dans le développement neuronal, LKB1 induit l'activation de protéines de la famille de l'AMPK comme AMPK, NUAK1, SAD ou SIK. (Adapté de Kuwako and Okano 2018a)

OBJECTIFS ET PROBLEMATIQUE

La formation des branches axonales *in vivo* est régulée spatio-temporellement et des défauts de branchements terminaux mènent à des dysfonctionnements du système nerveux qui induisent des pathologies telles que des troubles du spectre autistique ou la schizophrénie. La question fondamentale de ma thèse a été de comprendre comment se forment les branches axonales en étudiant les mécanismes moléculaires aboutissant à leur formation. Dans l'introduction, j'ai montré que le mécanisme de branchement pouvait être contrôlé par des facteurs intracellulaires et des facteurs extracellulaires. Ainsi, nous avons cherché à comprendre comment les facteurs extracellulaires régulent les voies de signalisation intracellulaires lors du branchement axonal.

Je me suis intéressée à un facteur extracellulaire : le BDNF dont la fonction de branchement est connue, et un facteur intracellulaire : LKB1, en tant que messager du BDNF. La kinase LKB1 est associée à la régulation de différents stades de l'acquisition de la morphologie axonale comme le branchement par la régulation de l'AMPK-RK : NUAK1 ou encore la polarité par l'activation de SAD-A/B. Dans le contexte de polarité neuronale, LKB1 est régulée par le BDNF pour induire l'activation de SAD-A/B et plus précisément, l'acquisition de la polarité requière la phosphorylation d'un site précis de LKB1, le site S431, induite par le BDNF. Ainsi, l'hypothèse de ma thèse est que le BDNF régule le branchement axonal par l'intermédiaire de la phosphorylation de LKB1 sur le site S431.

Les travaux menés durant ma thèse ont permis la production d'un article scientifique présenté ci-après :

- 1) Le premier objectif de ma thèse a été de mettre en évidence l'implication de LKB1 et NUAK1 pour le branchement axonal des neurones corticaux induit par le BDNF. Pour cela, j'ai réalisé des cultures primaires de neurones *in vitro* dans des neurones KO LKB1 ou NUAK1 que j'ai traité ou non avec du BDNF. J'ai pu observer grâce à ces cultures que l'absence de LKB1 ou NUAK1 ne permet pas l'augmentation du branchement axonal par le BDNF. Ainsi, ces expériences m'ont permis d'affirmer que les kinases LKB1 et NUAK1 sont nécessaires à la formation de branches axonales par le BDNF *in vitro*.
- 2) Des études présentées dans l'introduction mettent en évidence le rôle de LKB1/NUAK1 et de BDNF sur le trafic et la régulation du métabolisme mitochondrial. Dans le cadre de ma thèse le 2^e objectif a donc été de comprendre si LKB1 et NUAK1 étaient nécessaires la régulation du trafic des mitochondries par le BDNF. Pour cela, j'ai réalisé des expériences de trafic de mitochondries, dans des neurones corticaux traités ou non avec du BDNF et montré que le BDNF induit un arrêt des mitochondries. Par la suite, j'ai voulu savoir si la régulation du métabolisme mitochondrial par le BDNF était médiée par LKB1/NUAK1. Pour cela nous avons réalisé des expériences d'imagerie en temps réel avec la sonde métabolique Perceval-HR afin de mesurer les ratios ATP:ADP. Nous avons pu montrer que

le BDNF augmente le ratio ATP:ADP et que cette augmentation est dépendante de la présence de LKB1. De plus, des expériences de Seahorse réalisées dans l'équipe ont permis de montrer que NUAK1 est nécessaire à l'augmentation de la respiration mitochondriale par le BDNF.

- 3) Le 3^e objectif de ma thèse a été de comprendre par quel mécanisme moléculaire la fixation du BDNF sur son récepteur pouvait réguler la kinase LKB1. Pour cela, j'ai réalisé des cultures primaires de neurones corticaux embryonnaires au stade E15,5, et utilisé différents inhibiteurs chimiques afin de bloquer la signalisation de certaines kinases. Ainsi, nous avons mis en évidence que le BDNF par l'intermédiaire de son récepteur TrkB permet l'activation de la kinase ERK ce qui permet la phosphorylation de LKB1 sur le site S431. Afin de comprendre l'implication du site S431 dans le branchement axonal, j'ai utilisé une stratégie de remplacement de gènes. Ces expériences m'ont permis de montrer que le site S431 de LKB1 est nécessaire à la formation de branches axonales et au trafic des mitochondries dans les neurones corticaux.
- 4) Enfin, le dernier objectif de mon projet de thèse a été de vérifier si les défauts morphologiques observés *in vitro* étaient reproductibles *in vivo*. Pour cela, nous avons réalisé des expériences d'électroporation *in utero* et une stratégie de remplacement de gènes afin de surexprimer des protéines mutantes pour LKB1. Ainsi, nous avons pu observer que l'activité de LKB1 est nécessaire à la formation des branches axonales *in vivo*. De façon intéressante, nous avons montré que la surexpression du mutant S431A induit une restauration du branchement en ipsilatéral mais pas en contralatéral, montrant ainsi que le site S431 est nécessaire pour la formation de branches terminales. Afin de vérifier que cet effet ne s'explique pas seulement par une quantité trop importante de protéines mutantes, nous avons générés deux lignées de souris mutantes S431A et confirmé le phénotype induit par la surexpression de S431A. Enfin, nous avons cherché à savoir si le phénotype induit par la mutation S431A avait une conséquence comportementale sur les individus. Pour cela, des tests de comportement ont été effectués par l'équipe. Les résultats préliminaires montrent que le S431 est nécessaire pour la préférence de nouveauté sociale et la mémoire spatiale.

L'ensemble de ces travaux ont permis une avancée dans la compréhension de la régulation du branchement axonal des neurones corticaux. Ainsi, nous avons mis en évidence une nouvelle signalisation du BDNF pour le branchement axonal des neurones corticaux. Et nous pouvons suggérer que le BDNF promeut le branchement axonal par la régulation locale de l'activité métabolique pour induire un effet différentiel du branchement en ipsilatéral et contralatéral.

RÉSULTATS

ARTICLE 1

Spatial control of callosal axons branching through a BDNF/LKB1/NUAK1 signaling pathway

Audrey Garcia, Géraldine Meyer-Dilhet, Evelyne Goillot, Julien Courchet

Spatial control of callosal axons branching through a BDNF/LKB1/NUAK1 signaling pathway

Audrey Garcia¹, Géraldine Meyer-Dilhet¹, Evelyne Goillot¹, Julien Courchet¹

¹ Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR-5310, INSERM U-1217, Institut NeuroMyoGène, F-69622, Villeurbanne, France

Address correspondence to:

Julien Courchet, DVM, Ph.D.
Institut NeuroMyoGène
UMR5310 – U1217
Université Claude Bernard Lyon 1
Faculté de Médecine
8 avenue Rockefeller
F-69008 Lyon
France
Phone: +33 (0) 426-688-259
Email: julien.courchet@univ-lyon1.fr

SUMMARY

The correct patterning of long-range axonal connections rely on the coordinated activation of cell-intrinsic signaling pathways in response to environmental cues such as trophic factors, guidance molecules and synaptic activity. The kinase LKB1 has been linked to several aspects of axon development through the sequential activation of intracellular signaling pathways involving AMPK and related kinases. Previous studies suggested that LKB1-mediated neuronal polarization depends upon neurotrophin signaling induced by the branch-inducing BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor). We now gathered evidence that BDNF is also a potent activator of LKB1-dependent signaling pathways at the time of axon elongation and branching. Acute treatment of primary neuronal cultures with BDNF, but not other neurotrophins, induced LKB1 phosphorylation on the C-terminal Serine 431. Conversely, downregulation of the LKB1 effector NUAK1 impaired the formation of collateral axonal branches in response to BDNF treatment in cultured cortical neurons. We furthermore obtained evidence that BDNF stimulation affects mitochondria trafficking and metabolic activity in the axon through the upregulation of NUAK1 signaling. Finally through a gene-replacement strategy and *in utero* plasmid electroporation, we observed that S431 phosphorylation is necessary for terminal axonal branching of layer 2/3 pyramidal cortical neurons *in vivo*. Interestingly, branch formation on other regions of the brain such as the layer 5 ipsilateral plexus was largely unaffected by S431 mutation, suggesting some spatial specificity to the effect of BDNF-mediated signaling on LKB1. Therefore our results suggest that a LKB1/NUAK1 signaling pathway integrates extracellular BDNF signaling to promote axon branching and suggest that a local regulation of metabolic activity participates in the balance between ipsilateral and contralateral axonal projections.

INTRODUCTION

The formation of functional cortical circuits relies on the coordinated action of extracellular cues from target-derived trophic and guidance factors (Cohen-Cory et al., 2010; Lewis et al., 2013), as well as spontaneous and target-derived synaptic activity, ensuring the balance between ipsilateral and contralateral wiring (Mizuno et al., 2010; 2007; Suárez et al., 2014; Wang et al., 2007). An important effort focused on the identification of signaling pathways serving as intracellular relays to these extracellular cues to mediate neuronal morphogenesis (Arimura and Kaibuchi, 2007; Barnes and Polleux, 2009; Namba et al., 2015; Polleux and Snider, 2010). Strikingly, the same pathways are often involved in several, sequential morphogenetic events such as axon specification, outgrowth, guidance, and ultimately axonal branching and synapse formation, raising the question of how these pathways are regulated to modulate distinct steps of axon development. One example is given by the Serine/Threonine Kinase B1 (LKB1), an evolutionary conserved regulator of the apicobasal polarity (Baas et al., 2004; Kemphues et al., 1988; Martin and St Johnston, 2003). The cellular functions of LKB1 come from the phosphorylation and activation of the metabolic regulator AMP-activated Kinase (AMPK) (Hawley et al., 2003; Hong et al., 2003; Shaw et al., 2004; Woods et al., 2003), as well as a family of 12 other AMPK-related kinases (AMPK-RK) (Jaleel et al., 2005; Lizcano et al., 2004). In neurons, LKB1 plays multiple roles in axonal development through the sequential activation of distinct AMPK-RKs (Sato and Arber, 2013). First, LKB1 positively regulates neuronal polarity and axon specification through the activation of the downstream Brain Specific Kinases (BSK)1/2 and the phosphorylation of Microtubule Associated Proteins (MAPs) (Barnes et al., 2007; Kishi et al., 2005; Shelly et al., 2007). Subsequently, LKB1 acts through phosphorylation of the NUAK1 kinase to mediate axon outgrowth and branching through the control of mitochondria capture at nascent presynaptic sites (J.

Courchet et al., 2013). In parallel, LKB1 has been involved in synaptic calcium regulation (Kwon et al., 2016), dendritic development (Kuwako and Okano, 2018), axon (Beirowski et al., 2014; Sun et al., 2011) and synapse maintenance (Samuel et al., 2014).

In contrast to the pleiotropic functions of LKB1, little is known of the signals regulating its activity and downstream pathways in neurons. Association of LKB1 to the pseudokinase STE20-related kinase adapter (STRAD) and the adaptor protein MO25 upregulates LKB1-signaling through conformational change and anchoring of LKB1 in the cytosol (Baas et al., 2003; Boudeau et al., 2003; Hawley et al., 2003). The formation of this heterotrimeric complex is at least required for LKB1-mediated neuronal polarization (Barnes et al., 2007). In parallel, exposure of newborn neurons to extracellular cues such as Brain Derived Neurotrophic factor (BDNF) (Shelly et al., 2007) or cell-cell interactions with migrating interneurons (Bony et al., 2013) results in the local phosphorylation on one Serine residue of the C-terminal extremity of LKB1 (mouse S431, human S428). The phosphorylation of Ser431 is restricted to the nascent axon where it presumably correlates with the local activation of LKB1-mediated signaling (Barnes et al., 2007; Shelly et al., 2007). Although it is clear that LKB1 phosphorylation on S431 is important for neuronal polarization, its functional relevance remain poorly understood. Indeed a phospho-defective mutation of S431 to Alanine (S431A) has no impact on LKB1 catalytic activity or association to STRAD/MO25 (Sapkota et al., 2001). Furthermore mice bearing a targeted S431A mutation are viable and have no overt metabolic phenotype (Houde et al., 2014).

To get insight into the physiological roles of LKB1 S431 phosphorylation, we focused on the branch-inducing neurotrophin BDNF. Inactivation of BDNF or its receptor Tropomyosin-Related Kinase B (TrkB) decreased terminal axon branching in callosal-

projecting neurons of the mouse cortex (Shimojo et al., 2015), a phenotype reminiscent of the inactivation of LKB1 or NUAK1 (J. Courchet et al., 2013). Furthermore recent evidence demonstrated that BDNF treatment induces changes in axonal mitochondria trafficking and morphology (Armijo-Weingart et al., 2019; Guo et al., 2016; Su et al., 2014). These observations strongly argue that BDNF could be a physiologically-relevant upstream regulators of LKB1-dependent pathways in the context of axon branching.

Here we present evidence that LKB1 and its downstream effector NUAK1 convey BDNF signaling-dependent axon branching through mitochondrial regulation. We observed that LKB1 and its effector NUAK1 are necessary for BDNF-induced axon branching in cortical pyramidal neurons. Acute treatment with BDNF caused mitochondrial arrest and an increased metabolic activity in a NUAK1-dependent manner. Furthermore we provide evidence that BDNF acts through the activation of its receptor TrkB and the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway to phosphorylate LKB1 on the C-terminal S431 residue. LKB1 phosphorylation was necessary to induce collateral branch formation and mitochondria arrest in the axon. Strikingly a phospho-defective (S431A) mutant of LKB1 failed to rescue terminal axon branching on the contralateral hemisphere *in vivo*, whereas it was competent to restore axonal branching on the ipsilateral layer V plexus. Finally we report that mice harboring a knock-in S431A mutation have altered cortical connectivity and behavior.

RESULTS

LKB1 and NUAK1 are required for BDNF-induced axonal branching

The extracellular factors converging on LKB1/NUAK1 to mediate axon morphogenesis are largely unknown. As a candidate-approach, we focused on BDNF, a branch-inducing neurotrophin that has been proposed as an upstream regulator of LKB1 signaling in the context of neuronal polarization (Shelly et al., 2007). BDNF has a well-characterized branch-promoting activity (Cao et al., 2007; Cheng et al., 2011; Cohen-Cory, 1999; Cohen-Cory and Fraser, 1995; Jeanneteau et al., 2010). As expected, bath treatment of primary cortical neurons culture with 50nM recombinant BDNF led to a marked upregulation of axonal branching (**Fig. S1A**). Single axon morphology quantification revealed that BDNF markedly increased collateral branch formation, without any effect on axon length (**Fig. S1B-C, E**). As a result, total axonal length was significantly increased (**Fig. S1D**).

To test if LKB1 is necessary for BDNF-mediated axonal branching, we performed Ex Vivo Cortical Electroporations (EVCE) of LKB1^{F/F} embryos with either an empty vector, or a plasmid expressing CRE under a CAG promoter, together with a plasmid expressing mVenus. Neurons were treated with BDNF after 1 day of culture in vitro (DIV) to avoid an effect on neuronal polarity (Barnes et al., 2007; Shelly et al., 2007), then fixed at 5DIV and imaged to analyze axonal morphology. In control conditions and as expected, BDNF treatment had a marked positive effect on collateral branches formation (**Fig. 1A-B**). Upon LKB1 knockout, axons were shorter and less branched, as described previously (**Fig. 1C**) (J. Courchet et al., 2013). Strikingly, BDNF treatment failed to induce axonal branching (**Fig. 1D**).

We similarly tested the role of NUAK1 downstream of BDNF by performing EVCE in NUAK1^{F/F} embryos, followed by BDNF treatment at DIV2. As was the case for LKB1, we observed no effect of BDNF on axonal branching in NUAK1 knockout neurons (**Fig.**

1E-H). Quantifications confirmed that BDNF markedly increased collateral branch formation, without affecting the main length of the axon (**Fig. 1I-N**). However upon deletion of LKB1 or NUAK1, BDNF failed to increase collateral branch formation (**Fig. 1K, N**). Taken together our results indicate that LKB1 and NUAK1 are necessary for BDNF-induced axonal branching and suggest that BDNF signals through this kinase pathway to regulate axon morphogenesis.

BDNF upregulates axonal metabolic activity in developing cortical neurons

Mitochondria trafficking, fusion/fission dynamics and activity have been connected to extracellular neurotrophin signaling including the Nerve Growth Factor (NGF) or BDNF (Armijo-Weingart et al., 2019; Su et al., 2014). Since the LKB1/NUAK1 signaling pathways supports axon branching through the control of axonal mitochondria trafficking (J. Courchet et al., 2013), we tested the effects of BDNF on axonal mitochondria. Following EVCE of mitochondria-targeted DsRed protein (mito-DsRed), axonal mitochondria trafficking was imaged by time-lapse microscopy over 90 minutes (**Fig. 2A**). At 30 minutes, neurons were treated with either BDNF (50nM) or HBSS medium as a control. We then compared mitochondria motility before treatment, or 30 minutes after drug treatment (**Fig. 2A, B**). Although HBSS addition to the medium had a slight impact on mitochondria motility most likely due to phototoxicity over 90 minutes imaging sessions, we observed that BDNF treatment led to a significant arrest of mitochondria trafficking in the axon (**Fig. 2C**).

NGF treatment of sensory neurons increased mitochondria fission (Armijo-Weingart et al., 2019). In cortical PNs, short-term treatment with BDNF had no significant impact on mitochondria dynamics and morphology. On the contrary, prolonged (DIV1 to DIV5) BDNF exposure led to the accumulation in the axon of smaller in size mitochondria,

with the net effect of increasing axonal mitochondria density (**Fig. S2A-B**, quantified in **S2E-F**). Interestingly, this effect was abolished in LKB1-deficient neurons (**Fig. S2C-D**, quantified in **S2E-F**), suggesting that BDNF signaling to mitochondria involves the LKB1/NUAK1 pathway.

BDNF has a marked pro-metabolic activity (Burkhalter et al., 2003; Markham et al., 2004). This prompted us to assess axonal metabolic activity in cortical neurons. At first we measured the local changes in the ATP:ADP ratio with the genetically-encoded biosensor PercevalHR (Tantama et al., 2013). At DIV5, neurons were imaged at 1 frame per minute for 10 minutes to establish a baseline (F₀) (**Fig. 2D**). We then added HBSS (vehicle) and measured fluorescence for 60 minutes, before adding 50nM BDNF and imaging for another 60 minutes (**Fig. 2E-F**). Finally, FCCP was added at 1 μ M to determine a minimum signal (F_{min}) (**Fig. 2G**). We then defined Regions of Interest (ROI) in the cell body and in the axon, and followed the changes in fluorescence (F) over time. HBSS addition had little impact on PercevalHR signal (**Fig. 2H**). On the contrary, we observed an immediate and sustained increase of PercevalHR signal upon BDNF addition (**Fig. 2E-F**, quantified in **2H-I**). PercevalHR signal peaked after 6 minutes of BDNF exposure (Average \pm 95%CI: Soma +52.3 \pm 45.2%, Axon +72.2 \pm 54.5%), then reached a lasting plateau of increased activity (Soma +31.0 \pm 9.9%, Axon +50.6 \pm 38.8% after 60 minutes) (**Fig. 2H-I**). Interestingly, the effect of BDNF on PercevalHR signal was completely abolished upon deletion of LKB1 (**Fig. 2J-K**) (Soma -7.9 \pm 12.7%, Axon -1.4 \pm 13.6%) suggesting that BDNF-induced increase in neuronal metabolic activity was dependent upon LKB1-signaling.

In parallel, we measured the oxygen consumption rate (OCR) of primary neuronal cultures using the Seahorse mitochondria stress test. Immediately prior to measuring the basal respiration rate, we injected either HBSS or BDNF to a final concentration of

50nM. BDNF led to an increase of the maximal respiratory capacity of mitochondria upon BDNF exposure (**Fig. S3A**). We also observed an immediate increase of the basal respiration rate (**Fig. S3A-B**), although this effect was not statistically significant. Interestingly, the basal respiratory rate was virtually identical between the control and BDNF-treated condition in NUAK1 depleted neurons (**Fig. S3A-B**). Taken together, our results indicate that BDNF upregulates neuronal metabolic activity and mitochondrial function and suggest that BDNF exerts its pro-metabolic activity through the LKB1/NUAK1 pathway.

LKB1 S431 phosphorylation integrates BDNF-mediated signaling

LKB1 is phosphorylated on a C-terminal Serine residue (mouse S431, human S428) upon BDNF exposure *in vitro* (Shelly et al., 2007). S431-phosphorylated LKB1 is enriched in the axon (Barnes et al., 2007) and has been linked to neuronal polarity (Barnes et al., 2007; Shelly et al., 2007) but its relevance for subsequent steps of axon morphogenesis is unknown. We first checked whether BDNF modulate LKB1 S431 phosphorylation in primary neuronal cultures at 7 days in vitro (DIV), a time corresponding to axon elongation and collateral branch formation (J. Courchet et al., 2013). Primary mouse cortical neurons were obtained from E15.5 wild-type mice. On DIV7, neurons were starved for 30 minutes by replacing the culture medium by fresh medium without supplements (see methods). We treated neurons with 50nM BDNF, collected samples after 30 minutes then analyzed LKB1 phosphorylation by Western-blot (**Fig. 3A**). In parallel, we tested the effect of alternative trophic factors that were also identified as positive regulators of axon formation: TGF- β 1-3 (Yi et al., 2010) and IGF-1 (Sosa et al., 2006). Furthermore IGF-1 and BDNF have complementary roles on axon elongation and collateral branch formation, respectively (Ozdinler and Macklis,

2006). Whereas TGF- β 1-3 and IGF-1 had no effect on LKB1 phosphorylation, BDNF treatment specifically increased the phosphorylation of LKB1 on Ser431 (**Fig. 3A**). The effect of BDNF on LKB1 phosphorylation was rapid (<10 minutes) and reached a plateau 30 minutes following exposure (**Fig. 3B-C**). Furthermore, we observed an increased phosphorylation of NUAK1 on the T-loop T212 residue, indicating that BDNF treatment increases LKB1 catalytic activity (**Fig. 3B-C**).

We next sought to identify the signaling cascade linking BDNF to the phosphorylation of LKB1. We first used K252a, a specific inhibitor of the BDNF-receptor tyrosine kinase TrkB. As expected K252a treatment abolished TrkB autophosphorylation on Y516 in response to BDNF treatment (**Fig. 3D-E**). In parallel, BDNF failed to induce LKB1 phosphorylation in K252a treated neurons (**Fig. 3D-E**). Interestingly, K252a did not decrease the basal phosphorylation level of LKB1 in control condition, suggesting that BDNF can trigger an increased activation of LKB1-dependent pathways but is not required for some basal activity of LKB1 in neurons.

Previous studies demonstrated that LKB1 S431 can be phosphorylated by the ERK downstream effector P90 Ribosomal S6 Kinase (p90RSK) and by the cAMP-dependent Protein Kinase (PKA) (Collins et al., 2000; Sapkota et al., 2001). Thus to identify which is the upstream LKB1 kinase in embryonic cortical neurons we treated cultures with the ERK1/2 inhibitor U0126, or with the PKA inhibitors H89 or KT5720. Contrary to previous studies in hippocampal neurons (Shelly et al., 2007), PKA inhibition had no effect of LKB1 S431 phosphorylation in response to BDNF treatment (**Fig. 3F-G**). On the contrary, U0126 largely abolished BDNF-dependent LKB1 phosphorylation (**Fig. 3D-E**), suggesting that p90RSK is the relevant LKB1-kinase in cortical neurons in the context of axon growth/branching.

LKB1 S431 phosphorylation is necessary for axonal branching

To test the physiological relevance of BDNF-mediated LKB1 phosphorylation on S431, we adopted a gene-replacement strategy in primary cortical neurons cultured *in vitro* (**Fig 4**). Single-cell deletion of LKB1 was achieved by CRE electroporation in LKB1^{F/F} embryos, together with plasmids encoding either wild-type (WT), or mutant LKB1 protein. At DIV5, we observed axonal morphology. As observed previously, LKB1 inactivation led to a decrease of collateral branches as compared to wild-type conditions (**Fig 4A-B**). Re-expression of WT LKB1 protein fully rescued the branching defect (**Fig 4C**). On the contrary, a phospho-defective (S431A) mutant of LKB1 failed to rescue collateral branch formation and was rather comparable to a kinase-dead (K78A) form of the protein (**Fig 4D-E**). Although quantifications did not reveal any significant effect on axon length of LKB1 deletion or re-expression (**Fig 4K**), we observed a marked, significant reduction in collateral branch formation in knockout neuron (**Fig 4L-M**). Furthermore, axon branching was not different from the knockout condition for both the kinase-dead (K78A) and phospho-defective (S431A) mutants of LKB1 (**Fig 4L-M**), indicating that LKB1 phosphorylation on S431A is needed for collateral branch formation.

Because LKB1-dependent axon branching relies on mitochondria capture at nascent presynaptic sites (J. Courchet et al., 2013), we quantified mitochondria trafficking upon LKB1 re-expression (**Fig 4F-J**). We performed time-lapse imaging of axonal mitochondria (marked with mito-DsRed) in LKB1^{F/F} neurons expressing CRE together with the indicated LKB1 proteins. As expected LKB1 deletion markedly increased the fraction of motile mitochondria over a 30 minutes imaging session (**Fig 4F-G**, quantified in **4N**). Unlike WT LKB1 which fully restored the pool of stationary mitochondria, LKB1 S431A mutant only partially restored the pool of stationary mitochondria (**Fig 4H-J**,

quantified in **4N**). Taken together, our data shows that S431 phosphorylation is necessary for LKB1 function in axon branching.

Phosphorylation of the polarity kinase LKB1 regulates the balance between ipsilateral and contralateral axonal branching

Initially, *Lkb1* loss-of-function (LOF) has been achieved through a complete deletion in the Radial Glial progenitors of the dorsal telencephalon using the EMX1-CRE driver (Gorski et al., 2002), leading to a lack of axon formation and widespread neuronal death (Barnes et al., 2007). Yet the conditional inactivation of *Lkb1* in intermediate progenitors with the Nex-CRE driver (Goebbels et al., 2006) leads to a milder phenotype (J. Courchet et al., 2013), suggesting that LKB1 has sequential, temporally-controlled functions in neuronal development (Sato and Arber, 2013). We first performed sparse *Lkb1* inactivation through In Utero Cortical Electroporations (IUCE) of a mixture of plasmid encoding CRE under a strong, ubiquitous CAG promoter together with a plasmid expressing the fluorescent protein mVenus in floxed LKB1 embryos ($LKB1^{F/F}$). As reported previously, CRE expression (hereafter noted LKB1 cKO) induced a strong, compound phenotype with a decrease of axonal branching on layer V in the ipsilateral hemisphere and a decreased of terminal branching on layer II/III and layer V in the contralateral cortex ((J. Courchet et al., 2013) and **Fig S4A-F**). Furthermore we could observe an increased spread of axonal projections in the contralateral hemisphere (**Fig S4B**, green arrowhead) and a shortening of the apical dendrite of neurons (**Fig S4B**, blue arrowhead, and **S4E**) in LKB1 cKO neurons. These phenotypes persisted up to P90, indicating that they result from a permanent alteration of cortical circuits development and not a delay in circuit formation/maturation (**Fig S4G-J**). Interestingly silencing of *Nuak1*, the main effector for LKB1 in axon branching,

phenocopies the *Lkb1* phenotype on contralateral axonal branching, but has no effect on ipsilateral branching (J. Courchet et al., 2013; V. Courchet et al., 2018) suggesting a distinct cellular mechanism controlling ipsilateral and contralateral axonal branching. To get a comprehensive view of the functions of LKB1 on axon development and of the importance of S431 phosphorylation, we initiated a rescue experiment of the LKB1 phenotypes *in vivo* in LKB1 cKO conditions (**Fig 5**). Re-expression of LKB1 induced a complete rescue of all phenotypes in LKB1 cKO conditions (**Fig 5A-B**). On the contrary, the expression of a catalytically-inactive LKB1 protein failed to rescue branching in ipsilateral or contralateral, and the spread of axons (**Fig 5C-D**), indicating that all phenotypes are dependent upon the kinase activity of LKB1. Interestingly the reexpression of LKB1 S431A only partially rescued the LKB1 KO phenotype. Specifically, ipsilateral layer V axon branching was comparable upon expression of wild-type or S431A mutant LKB1 (**Fig 5E**, quantified in **G**). On the contrary, LKB1 S431A expression failed to rescue contralateral axon branching (**Fig 5F**, quantified in **H**). Taken together, our results indicate that although both ipsilateral and contralateral axon branching rely on LKB1 function, one phosphorylation site on LKB1 can control the balance between ipsilateral and contralateral branching.

Axonal and behavioral abnormalities in LKB1 S431A transgenic mice

Finally, we sought to test the consequences of LKB1 S431A mutation *in vivo*. A transgenic, S431A mouse line has been established (Houde et al., 2014). Interestingly, this line displays very little phenotype compared to LKB1 knockout. However brain anatomy and cortical connectivity has not been investigated in detail. Based on our results, we predicted that LKB1 S431A mice might have subtle changes in cortical connectivity. To test this hypothesis, we crossed LKB1^{F/F} mice with LKB1^{S431A/+} mice,

then performed IUCE of CRE-coding plasmids into the brain of embryos. With this cross, all embryos have one Floxed allele, which conveys normal expression of *Lkb1* (**Fig. 6A**). Upon CRE-expression and inactivation of the conditional allele, the remaining allele is either wild-type (+) or mutant (S431A). Hence, our strategy allows to conditionally generate sparse populations of neurons with a mutant LKB1 protein (S431A) within a brain that expressed the wild-type LKB1 protein. As was the case for our rescue experiments (**Fig. 5**), we observed that S431A mutation differentially affected axon branching on the ipsilateral and contralateral side. Indeed, layer V axon branching on the ipsilateral side in the F/S431A condition was essentially the same as branching in the control condition (**Fig. 6B, C**). On the contrary, terminal axon branching on the contralateral side was strongly decreased in F/S431A condition (**Fig. 6D, E**).

We previously described that *Nuak1* inactivation in the cortex leads to a specific decrease of terminal axon branching without affecting layer V branching on the ipsilateral side (J. Courchet et al., 2013; V. Courchet et al., 2018), a phenotype reminiscent of the LKB1 S431A mutant phenotype (this study, **Fig. 6**). We furthermore characterized behavioral alterations upon deletion of *Nuak1* in cortical PNs (V. Courchet et al., 2018). We thus performed similar exploration of mouse behavior in mice harboring two (S431A/S431A) mutant LKB1 alleles. First we assessed spatial memory through the Y-maze assay (Dellu et al., 2000). Following a training period during which the access to one arm of the apparatus is blocked, mice go through a test period where they have access to the whole apparatus. Despite an important variability, there was a trend for WT mice to preferentially explore the novel arm, indicating a proper spatial memory (**Fig. S5A**). On the contrary, S431A/S431A mice

failed to discriminate the novel arm, suggesting that they have impaired spatial memory.

In parallel we assessed mice sociability using the 3-chamber assay (Moy et al., 2004). In the first phase when we test the preference for a conspecific over an inanimate object (**Fig. S5B**), we observed an overall significant effect of the time spent in each chamber ($F(2,24)=21.72$, $p<0.0001$) without interaction with genotype ($F(2,24)=4.275$, $p=0.22$). Thus S431A/S431A mice displayed the same preference as WT littermates for another mouse over an inanimate object, although post-test revealed that the preference for the mouse is less marked in S431A/S431A mice (**Fig. S5B**). In the second phase of the test, mice were offered a choice between a familiar mouse or a novel individual to test for the preference for social novelty (**Fig. S5C**). In this case there was a significant effect of the time spent in each chamber ($F(2,24)=20.12$, $p<0.0001$) as well as a significant interaction with genotype ($F(2,24)=3.371$, $p=0.05$). S431A/S431A displayed no preference between the familiar and novel mouse, indicating a deficit in the preference for social memory (**Fig. S5C**). Altogether, our results indicate that LKB1 S431A mutation disrupts cortical circuits development and behavior to a similar extent as the mutation of *Nuak1* (V. Courchet et al., 2018).

DISCUSSION

Our study demonstrates that BDNF mediates axonal branching in part through activation of a LKB1/NUAK1 pathway converging on mitochondria trafficking and metabolic activity. The inhibition of LKB1 or NUAK1 abolished BDNF-mediated axonal branching, and blocked the effect of BDNF on mitochondria trafficking and metabolic activity. We furthermore demonstrated that BDNF acts through the phosphorylation of LKB1 on a C-terminal S431 residue that was previously characterized as essential for axon specification. Abolishing LKB1 phosphorylation through a phospho-defective

mutation (S431A) disrupted axon branching and mitochondria trafficking *in vitro*. Strikingly through a gene-replacement strategy, we observed that LKB1 S431A mutant could rescue most of the neuronal phenotypes of LKB1 *in vivo*, excepted terminal axon branching. Mice with a knock-in mutation of S431A had normal branching on the ipsilateral cortex, but reduced branching on the contralateral cortex, as well as alterations of spatial memory and the preference for social novelty.

The regulation of LKB1 in cortical neurons has been best studied in the context of neuronal polarization and involves association with the STRAD/MO25 complex and phosphorylation on S431 (Barnes et al., 2007; Shelly et al., 2007). Indeed STRAD is required for LKB1-dependent neuronal polarization and axon specification (Barnes et al., 2007; Kim et al., 2010; Veleva-Rotse et al., 2014) and co-expression of LKB1 together with STRAD induce a multiple axon phenotype (Barnes et al., 2007). In contrast, the overexpression of LKB1 without a simultaneous expression of STRAD has no effect on neuronal polarization but rather induces an exuberant axonal branching (J. Courchet et al., 2013), suggesting that subsequent functions of LKB1 involve different regulatory mechanisms. In this study, we report that after the onset of neuronal polarization, LKB1 is regulated by phosphorylation on S431 to mediate axon branching. The functional relevance of S431 phosphorylation is unclear, owing to the fact that S431A mutation does not affect LKB1 catalytic activity (Sapkota et al., 2001) and that LKB1 S431A mice are viable with no overt phenotype (Houde et al., 2014). This is in sharp contrast with the inactivation of BRSK1/2 (Kishi et al., 2005), LKB1 (Barnes et al., 2007) or STRAD (Veleva-Rotse et al., 2014), which are characterized by a complete disruption of axon formation, marked cortical apoptosis and lethality in the early postnatal weeks. Here we provide evidence that contrary to previous reports, LKB1 S431A mutant mice have a subtle phenotype resulting in an alteration of cortical

circuit formation. The most striking phenotype in LKB1 S431A mutant mice is a disruption of the balance between ipsilateral and contralateral projections. Subtle changes in cortical connectivity affecting the balance of local and long-range axonal projections can have dramatic functional consequences and lead to electrophysiological and behavioral alterations associated to neurodevelopmental disorders (Fernandez et al., 2019). Accordingly, our results argue that LKB1 S431A mutant mice have altered spatial memory and defects in social interactions, similar to *Nuak1*-deficient mice (V. Courchet et al., 2018)

Different AMPK-RKs mediate distinct functions of LKB1 in neurons. The BRSK kinases are involved in polarization and axon specification in cortical neurons (Barnes et al., 2007; Kishi et al., 2005) but also branching in peripheral neurons (Lilley et al., 2014; 2013). NUA1 has been linked to axon outgrowth and branching (J. Courchet et al., 2013; V. Courchet et al., 2018). The SIK1 kinase mediates dendritic development and self-avoidance in Purkinje cells (Kuwako and Okano, 2018). Because LKB1 is a so-called “master kinase” (Lizcano et al., 2004), the genetic inactivation of *Lkb1* is functionally equivalent to the simultaneous inhibition of all AMPK-RKs. Hence it is not unexpected for *Lkb1* knockout animals to have a more complex phenotype than the knockout of an individual downstream effector such as *Nuak1* (Barnes et al., 2007; J. Courchet et al., 2013). Indeed through *in utero* electroporations, we observed a strong *Lkb1* phenotype, including a reduction of dendritic development, decreased axon branching on both the ipsilateral and contralateral side, and alteration of axon projection spatial patterning on the contralateral hemisphere (**Fig S4**). Unlike previous description of altered axon formation *in vivo* upon overexpression of S431A mutant LKB1 protein in the rat cortex (Shelly et al., 2007), we observed no defect in neuronal migration and axon specification in two models : either upon re-expression of S431A

LKB1 in a *Lkb1* null background (**Fig. 5**), or upon targeted knockin mutation of LKB1 (**Fig. 6**). This discrepancy could result from a faster kinetics for overexpressing LKB1 on one hand, compared to a slower kinetics of CRE expression and *Lkb1* deletion on the other hand, causing LKB1 protein level to drop after the onset of polarization. Surprisingly, the reintroduction of LKB1 S431 was sufficient to rescue most manifestations of this strong *Lkb1* phenotype, save for the reduction in axon branching on the contralateral side. This suggests that the phosphorylation of a single serine residue in LKB1 is sufficient to control terminal axon branching. Overall the *Lkb1* S431A phenotype *in vivo* closely matches our previous description of a *Nuak1* deletion phenotype (J. Courchet et al., 2013; V. Courchet et al., 2018), suggesting that S431 phosphorylation might act as a molecular switch providing specificity to LKB1 downstream pathways. This hypothesis is strengthened by observations that S431 phosphorylation prevents LKB1 binding to and activation of AMPK (Zheng et al., 2009). Given its functional importance, we sought to identify upstream signaling pathways regulating S431 phosphorylation on LKB1 and focused on the branch-inducing neurotrophin BDNF on a candidate-based approach. BDNF has been proposed as an upstream regulator of LKB1 phosphorylation during axon specification *in vitro* (Shelly et al., 2007; 2010), yet it is unclear if BDNF controls LKB1-dependent neuronal polarization *in vivo*. Indeed although the conditional inactivation of *Lkb1* in the dorsal telencephalon using the EMX1 promoter leads to a complete disruption of axon formation and massive neuronal death (Barnes et al., 2007), the deletion of *Bdnf* using the same CRE driver results in a mild phenotype with little evidence for neuronal death (Gorski et al., 2003). On the other hand a cell-autonomous inactivation of *Bdnf* or *TrkB* by shRNA electroporation decreases terminal axon branching (Shimojo et al., 2015), a phenotype similar to LKB1 S431A mice. These results argue that BDNF might be

physiologically more relevant in the context of axon outgrowth and branching than in the context of neuronal polarization.

Both the ERK effector RSK1/2 and the cAMP-dependent kinase PKA are potent mediators of LKB1 S431 phosphorylation. Several lines of evidence suggest that PKA is the kinase involved in the phosphorylation of LKB1 at the time of axon specification (Barnes et al., 2007; Shelly et al., 2007): *in vitro*, BDNF-induced LKB1 phosphorylation is blocked by the PKA inhibitors KT5720 and Rp-cAMPS (Shelly et al., 2007). *In vivo*, GABA liberation by tangentially-migrating interneurons can similarly activate PKA in radially-migrating cortical pyramidal neurons, increasing S431 phosphorylation and ultimately leading to axon specification (Bony et al., 2013). Altogether, the regulation of LKB1-dependent neuronal polarization in a PKA dependent manner links the long-range cAMP-cGMP imbalance and local activation of LKB1 (Shelly et al., 2010; 2011). In this paper, we provide evidence that the ERK kinase pathway is the mediator of BDNF-induced phosphorylation of LKB1 during axon branching. Indeed in our conditions treatment with PKA inhibitors H89 and KT5720 had no effect on LKB1 phosphorylation. On the contrary, the ERK inhibitor U0126 abolished the effect of BDNF on LKB1 S431. Our results match with previous observations that in postnatal cortical extracts, siRNA-mediated inhibition of RSK1/2 blocked BDNF-induced S431 phosphorylation (Arthur et al., 2004). Importantly, studies so far showed that S431 phosphorylation is increased upon BDNF stimulation, yet inhibition of TrkB, PKA or ERK did not abolish the basal level of phosphorylation of LKB1 ((Shelly et al., 2007) and **Fig. 3**), which suggests that yet another pathway controls LKB1 phosphorylation. The identity of this pathway and its relevance for axon specification and branching warrants further studies.

BDNF has a well characterized pro-metabolic activity both at the cellular level and through the peripheral regulation of circulating glucose (Marosi and Mattson, 2014). In neurons BDNF up-regulates glucose uptake through upregulation of the glucose transporter GLUT3 (Burkhalter et al., 2003). BDNF signaling also converge on mitochondria to increase mitochondrial oxidative metabolism (Markham et al., 2004; Xu et al., 2018). Our results confirm previous observations that BDNF treatment induces mitochondrial arrest and fractionation (Armijo-Weingart et al., 2019; Su et al., 2014), and further extend these results by observing that the LKB1/NUAK1 pathway is required for BDNF to act on mitochondria and upregulate axonal metabolism. Mitochondria biogenesis, trafficking and association to specific location such as branch points and presynaptic terminals is necessary to support axon morphogenesis and collateral branching (J. Courchet et al., 2013; Sainath et al., 2017; Spillane et al., 2013; Ulisse et al., 2020; Vaarmann et al., 2016). We recently observed that NUAK1 supports axon branching through the control of mitochondrial metabolic activity (Lanfranchi et al., 2020). Collectively, our results suggest that the activation of a LKB1/NUAK1 pathway, and subsequent regulation of axonal mitochondrial metabolism, mediates part of the branch-promoting activity of BDNF.

MATERIALS AND METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Mouse anti-Actin clone C4	MP biomedicals, Fisher	Cat# 08691001
Rabbit anti-CRE recombinase (D7L7L)	Cell Signaling	mAb# 15036S
Chicken Anti-GFP Antibody	Rockland	mAb# 600-901-B12
Hoechst 33258 solution	Merk, Sigma	Cat# 94403
Rabbit anti-ARK5	Cell signaling	mAb# 4458
Mouse anti-p44/42 MAP Kinase (L34F12)	Cell signaling	mAb# 4496
Rabbit anti-phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP®	Cell signaling	mAb# 4370
Rabbit anti-LKB1 (D60C5)	Cell signaling	mAb# 3047
Rabbit anti-phospho-LKB1(Ser428)(C67A3)	Cell signaling	mAb# 3482
Rabbit anti-TrkB (80E3)	Cell signaling	mAb# 4603
Rabbit anti-phospho TrkA(Tyr490)/TrkB (Tyr516) (C35G9)	Cell signaling	mAb# 4619
Rabbit anti-phospho-NUAK1	Homaid	
IgG (H+L) Donkey Anti-mouse HRP	Invitrogen, Fisher	mAb# A16011
IgG (H+L) Cross-absorbed Donkey Anti-Rabbit HRP	Invitrogen, Fisher	mAb# A16029
IgY Cross absorbed Goat Anti-Chicken AlexaFluor Plus 488	Invitrogen, Fisher	mAb# A32931
IgG (H+L) Cross absorbed Donkey Anti-Mouse AlexaFluor 647	Invitrogen, Fisher	mAb# A31571
Experimental Models: Organisms/Strains		
Timed-pregnant NUAK1F/F females were mated with NUAK1F/F males		
Timed-pregnant LKB1F/F females were mated with LKB1F/F males		
Timed-pregnant LKB1F/F females were mated with LKB1S431A/+ males or conversely		
Timed-pregnant LKB1S431A/+ females were mated with LKB1S431A/+ males		
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
ECL Prime	GE Healthcare, Merck	GERPN2232
Isoflurane (Isoflu-Vet 1000mg/g)	Dechra	Cat# ISO008 (Centravet)

Tween® 20	Millipore, Sigma	9480-OP
Fast Green FCF	Sigma, Merck	Cat# F7252
Paraformaldehyde 32%	Electron Microscopy Sciences ; Fisher	Cat# 15714-S
HEPES buffer; 1M; pH7,3	Fisher	Cat# BP299
Calcium chloride	Sigma, Merck	Cat# C1016
Magnesium sulfate	Sigma, Merck	Cat# M2643
Sodium bicarbonate 7,5% solution	Gibco, Fisher	Cat# 25080-094
D-glucose	Fisher	Cat# 47829
HBSS (10X)	Gibco, Fisher	Cat# 14185-045
Papain, PDS kit, Papain Vial	Worthington	Cat# LK003176
Deoxyribonuclease I from bovine pancreas	Sigma, Merck	Cat# D5025-150KU
Poly-D-lysine hydrobromide	Sigma, Merck	Cat# P0899-100mg
Laminin from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma basement membrane	Sigma, Merck	Cat# L-2020-1MG
Neurobasal medium™ medium (1X)	Gibco, Fisher	Cat# 21103-049
B27™ serum free-supplement (50X)	Gibco, Fisher	Cat# 17504-044
N2 serum-free supplement (100X)	Gibco, Fisher	Cat# A13707.01
Glutamax™ supplement (100X)	Gibco, Fisher	Cat# 35050-038
Penicillin-Streptomycin solution (100X)	Gibco, Fisher	Cat# 15140-122
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma	Cat# P4417-50TAB
Triton™ X-100	MP Biomedical, Fisher	Cat# 9002-93-1
Albumin Bovine Frv	Euromedex	Cat# 04-100-812-E
Potassium phosphate monobasic	Sigma, Merck	Cat# P5655
Trizma base Ultrapure	Euromedex	Cat# EU1018-A
Sodium dodecyl sulfate solution (SDS)	Sigma, Merck	Cat# 05030
Sodium chloride 99.85%, for molecular biology, DNase, RNase and Protease free, ACROS Organics™	Fisher	Cat# AC 327300010
Phosphatase inhibitor tablets	Roche, Sigma	Cat# 4906837001
Complete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Sigma	Cat# 11836170001

Glycine	Euromedex	Cat# 26-128-6405-C
Brain Derived Neurotrophic Factor	Sigma, Merck	Cat# B3795
U0126	EMD milipore	Cat# 662005
K252a	Sigma, Merck	Cat# K1015
KT5720	Enzo Life Science, Fischer	Cat# BML-E1199-0100
QuikChange II kit	Agilent	Cat# 200523
Fluoromount G	Sigma	Cat# F4680
Recombinant DNA		
pCAG-IRES-GFP	Hand, R. et al., 2005	NA
pCIG2-CRE	Hand, R. et al., 2005	NA
pCAG-mVENUS	Hand and Polleux, 2011	NA
pCAG-mitoDsRED13	Courchet, J. et al., 2013	NA
FUGW- Pervecal-HR	Tantama et al., 2013	NA
pLKO	Courchet, J et al., 2013	NA
pCAG	Courchet, J et al., 2013	NA
pCAG-CRE	Gift of Tommy L Lewis	NA
pCAG-LKB1	Courchet, J et al., 2013	NA
pCAG-LKB1-S431A	Houde V. P. et al, 2014	NA
pCAG-LKB1-K78A	Courchet, J et al., 2013	NA
shLKB1 24146	Courchet, J et al., 2013	NA
shLKB1 24148	Courchet, J et al., 2013	NA
Software		
NIS-Element Advanced Research	Nikon Corporation, Melville, NY	NA
GraphPad PRISM	GraphPad Software Inc.	Version 6
Excel®	Microsoft Corporation	NA
ImageLab	Bio-Rad™	NA
Adobe Photoshop®	Adobe	NA
Other		
Vibratome VT1000S	Leica Biosystem	NA

Biorupteur TM Next Gen	Diagenode	NA
Micro-injector Picospritzer III	Harvard Apparatus	Cat# 051-0530-900
Electroporator ECM 830 BTX and BTX Generator Generator Footswitch (model 1250FS)	Harvard Apparatus	Cat# EC1 45-0002
Gold-coated electrodes (GenePads 5 3 7 mm BTX)		NA
Borosilicate Glass capillaries O.D.:1mm,I.D.:0.50m, 10cm length, FiMT	World Precision Instrument	Cat# GBF100-50-10
PVDF	Millipore, Sigma	Cat# IPFL85R
NucleoBond Xtra Midi kit	Machery-Nagel, Fisher	Cat# 12798402
Seahorse XFe24 analyzer	Agilent	NA
Chemidoc MP Bio-imager	Bio-rad	NA
Microscopy		
Nikon Ti-E microscope	Nikon	NA
Objective lenses (Nikon): 20x PlanApo VC; NA 0.75, 60x Apo TIRF; NA 1.49.	Nikon	NA
A1R laser scanning confocal microscope	Nikon	NA
EM-CCD Andor iXon3 897 Camera	Nikon	NA
Glass bottom dishes	MatTek Corporation	Cat# P35G-1.5
Corning™ BioCoat™ 12mm #1 German Glass Coverslips, Round	Corning, Fisher	Cat# 354087

Animals

Mice breeding and handling was performed by following National Institutes of Health guidelines and the French and European legislation. Experimental protocols were approved by the CECCAPP Ethics committee (C2EA15) of the University of Lyon. Time- pregnant females were maintained in a 12hr light/dark cycle and obtained by overnight breeding with males of the same strain. Noon following breeding was considered as Embryonic day (E)0.5. NUA1^{F/F} mice (Nuak1tm1a(KOMP)Wtsi) have been described previously (V. Courchet et al., 2018). Floxed LKB1 mice (Stk11tm1.1Rdp) and LKB1^{S431A/+} (Stk11tm2.1Arte) were provided by Franck Polleux (Columbia University Medical Center) and D. R. Alessi (University of Dundee), respectively, and previously described (Bardeesy et al., 2002; Houde et al., 2014). Animals were maintained on a C57Bl/6J background.

DNA and plasmids

Endotoxin-free plasmid DNA was obtained using Macherey Nagel midi-prep kit. We used the following, previously described plasmids: empty vector pCAG-IRES-GFP (pCIG2), CRE- expressing vector pCAG- CRE-IRES-GFP (pCIG2-CRE) (Hand et al., 2005), mVENUS expressing vector pSCV2 (Hand and Polleux, 2011), pLKO, pCAG-mitoDsRed, shRNA targeting mouse LKB1 shLKB1 (J. Courchet et al., 2013), pFUGW-PercevalHR (Tantama et al., 2013), pCAG-LKB1-S431A (Houde et al., 2014). Mouse LKB1 was cloned into a pCMV vector with a N-terminal myc-tag as described in (J. Courchet et al., 2013). From this plasmid, we generated mutants of the LKB1 protein by site-directed mutagenesis using the QuickChange II kit (Agilent).

Primary culture of neurons

The electroporation of dorsal telencephalic progenitors was performed by injecting plasmid DNA (1-2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of endotoxin-free plasmid DNA) plus 0.5% Fast Green (Sigma; 1:20 ratio) using a Picospritzer III microinjector (Harvard Apparatus) into the lateral ventricles of isolated E15.5 embryonic mouse heads (Polleux and Ghosh, 2002). Electroporation were performed with gold-coated electrodes (GenePads 5 mm, BTX) using an ECM 830 electroporator (BTX) and the following parameters: five pulses of 100 msec, 150 msec interval, at 20 V. Immediately after electroporation, cortices were dissected in Hank's buffered salt solution (HBSS) supplemented with HEPES (pH 7.4; 2.5 mM), CaCl_2 (1 mM, Sigma), MgSO_4 (1 mM, Sigma), NaHCO_3 (4 mM, Sigma), and D-glucose (30 mM, Sigma), hereafter referred to as complete HBSS (cHBSS). Isolated cortices were dissociated in cHBSS containing papain (Worthington, 20U/mg at least) for 20 min at 37°C. Cortices were washed once in cHBSS containing DNase I (2.5mg/mL, Sigma), then 3 times in cHBSS before being manipulated by trituration. Cells were then plated at 125.000 cells per 35 mm glass bottom dish (MatTek) coated with poly-D-lysine (0.1mg/mL) and laminin (0.01mg/mL) and cultured for 5–6 days in Neurobasal medium supplemented with B27 (1x), N2 (1x), Glutamax (2mM), and penicillin (10U/mL)- streptomycin (0.1mg/mL).

In utero cortical electroporation

Timed-pregnant $\text{LKB1}^{\text{S431A/+}}$ females were mated with $\text{LKB1}^{\text{F/F}}$ males. At E15.5, we performed in Utero cortical electroporation as described in (Meyer-Dilhet and J. Courchet, 2020). A mix containing 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ endotoxin-free plasmid DNA (pCAG-CRE-

IRES-GFP) plus 0.5% Fast Green (Sigma; 1:20 ratio) was injected into one lateral hemisphere. Electroporation was performed using an ECM 830 electroporator (BTX) using four pulses of 45V with 500 mSec interval to target cortical progenitors. Animals were sacrificed at postnatal day 21 by terminal perfusion of 4% paraformaldehyde (PFA, Electron Microscopy Sciences) followed by 2 h post-fixation in 4% PFA.

Drugs treatment

For Western Blot experiment, after 5 days of culture neurons were starved during 1hr in Neurobasal medium with penicillin/streptomycin. After starvation, neurons were treated with different inhibitors (U0126 : 0,1 μ M, K252a : 200nM, K5720 : 1 μ M, wortmannin : 1 μ M, Go6976 : 0,1 μ M) during 1hr, then, BDNF (50ng/mL) was added in the medium for 35min.

For experiments on axonal morphology, BDNF (50ng/mL) was added in the medium at 1 day in vitro (1DIV) and neurons were fixed at 5DIV.

Immunostaining

Cells were fixed for 20 min at room temperature in 4% (w/v) paraformaldehyde in PBS, washed 3 times in PBS, then permeabilized for 1 hr in Permeabilization Buffer (PB: 0.3% Triton X-100, 0.3% BSA (Sigma), in PBS). Primary antibodies were incubated overnight at 4°C in PB. Secondary antibodies were incubated for 1 hr at room temperature. Coverslips (BioCoat) were mounted on slides with Fluoromount G (EMS). Primary antibodies used for immunohistochemistry and immunocytochemistry in this study are chicken anti-GFP (Rockland) (1:2000) and anti-CRE (Cell signaling) (1:1000). All secondary antibodies were Alexa-conjugated (Invitrogen) and used at a 1:1000 dilution. Nuclear DNA was stained using Hoechst 33258 (1:10,000, Pierce).

Immunohistochemistry

At P21, mice were sacrificed by intracardiac perfusion of PFA (4% in PBS) followed by a 2 hours post-fixation of the whole brain in a 4% PFA solution. 75 μ m thick sections were performed using a Leica VT1000S vibratome. Slices were permeabilized for 30 minutes in PB, then incubated overnight with primary antibodies (chicken anti-GFP, Rockland, CUX1) diluted at 1:2000 in PB. The following day, we performed 3 washes in PBS 1X, then incubated slices in secondary antibody-containing PB (Goat anti-

chicken antibody, Alexa 488, 1:2000, life technology). Nuclear DNA was stained using Hoechst 33258 (1:5000). Then coronal section was mounted on slide with Fluoromount G®.

Western-Blot

Neurons were lysed in ice-cold Lysis Buffer (LB) containing 50mM Tris (pH8) (Euromedex), 0,5% sodium deoxycholate (Sigma), 0,1% SDS (Sigma), 600 mM NaCl (Sigma) and 1X protease and 1X phosphatase mixture inhibitors (Roche). Neurons put in Bioruptor (Diagenode) for break nucleus and DNA (8 cycles with 15sec in Time on and 60sec in time off). 25µg aliquots of lysate were separated by electrophoresis on a 8% and 10% SDS- polyacrylamide gel and transferred on a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Amersham). Incubation with primary antibody was performed overnight in TBS, 0,1% Tween, 5% BSA and anti-phosphoLKB1 antibody (Cell Signaling #3482), anti-LKB1 (Cell Signaling #3047), anti-phosphoTrkA/B (Cell Signaling #4619), anti-TrkB (Cell Signaling #4603), anti-phosphoERK1/2 (Cell Signaling #4370), anti-ERK1/2 (Cell Signaling #4696), anti-ARK5 (Cell Signaling #4458), anti-phospho-NUAK1 (homemade), anti-lamine A/C (ref), anti-histone H3 (ref) to 1/1000 dilution or anti-Actin antibody (MP Biomedicals) to 1/5000 dilution. The next day, membranes were incubated at room temperature for 1 hr with HRP-linked secondary antibodies in TBS, 0,1% Tween. Western-blot revelation was performed using ECL Prime (Amersham). Imaging and analysis were performed on a chemidoc imager (Bio-rad) using the ImageLab software. Images presented in the figures have been cropped around the expected bands for figure design purpose.

Metabolomic flux analyzes

We used a Seahorse XFe24 analyzer (Agilent) with the Glycolysis and Mito Stress test kits. Neurons were plated at 100,000 cells per well in Seahorse compatible 24 well plates and metabolic activity was measured at 7 days in vitro. The assay was conducted in Modified HBSS (1XHBSS supplemented with glucose (3.5g/L), Sodium pyruvate 1mM, Glutamax 1X, CaCl₂ 1mM, MgSO₄ 1mM, pH 7.4). Following measurement, neurons were lysed in ice-cold lysis buffer (LB) and protein concentration was measured by Bradford for post- hoc normalization.

Image acquisition and Analyses

Confocal images were acquired in 1024x1024 mode with a Nikon Ti-E microscope equipped with the C2 laser scanning confocal microscope. Time-lapse images were acquired in 1024x1024 mode with 2x2 binning using a CMOS ORCA-Flash 4.0 Camera (Hamamatsu). Microscope control and image analysis was performed using the Nikon software NIS-Elements (Nikon). We used the following objective lenses (Nikon): 10x PlanApo; NA 0.45, 20x PlanApo VC; NA 0.75, 60x Apo; NA 1.4. When live-cell imaging was carried out, the temperature was maintained at 37° C and CO₂ at 5% v/v in a humidified atmosphere. Live-cell imaging was performed in cHBSS 30min after medium-changing. Representative neurons were isolated from the rest of the image using ImageJ. For axonal morphogenesis experiments, we performed large field acquisition of neuronal cultures (typically a 4x4 tiling scan using a 20x objective). Contrast was enhanced and background (autofluorescence of non transfected neurons in culture) removed for better illustration of axons morphology. Kymographs were created with NIS-Elements.

Three chambers social interaction test.

Mice were placed in a three-chambered Plexiglas box, with each chamber measuring 20cm x 40.5 cm x 22 cm. Dividing walls were clear with small semicircular openings (3.5 cm radius) allowing access into each chamber. The middle chamber was empty, and the two outer chambers contained small, round wire cages (Galaxy Cup, Spectrum Diversified Designs, Inc., Streetsboro, OH) during testing. Mice were habituated to the entire apparatus without the wire cages for 10 minutes. Social preference was tested with a stranger mouse in one of the wire cage in an outer compartment and an object in the wire cage in the other compartment and the tested mice were returned in the middle chamber. Time spent in the chamber with the novel mouse and time spent in the chamber with the novel object was recorded for 10 minutes. For the social novelty test, mice were returned to the middle chamber, this time with the original mouse (familiar mouse) in its chamber and a new unfamiliar mouse (novel mouse) in the previously empty chamber. Again, time spent in each chamber was recorded for 10 minutes. Interval between habituation and social preference assay, and between social preference and social novelty assay was 30 seconds. The position of the object, mouse and novel mouse was assigned in a random manner.

Y maze test

We then performed the Y maze test for spatial memory and spontaneous alternation. This included two phases: in the first 5 min session of habituation, one arm (novel) was blocked by a transparent plastic door; mice were introduced at the end of the start arm and allowed to freely explore the two open arms. Mice were removed from the apparatus for a 10 min period, and left undisturbed in home cage. Then the door was removed, and mice reintroduced in the start arm and allowed to freely explore the entire maze for 2 min. The three arms of the Y maze were identical and spaced at 120° from each other. The Y maze was located in a room containing different extramaze cues. Each arm was 35 cm long and 5 cm wide, separated by a center arms were enclosed by a wall of 15 cm height. Allocation of the start arm was counterbalanced within experimental groups. Time spent in the three arms was measured and used to obtain an index of percent novelty preference as follows: time spent in the novel arm/time spent in the three arms x 100. The maze was cleaned with 70% ethanol then water and wiped with paper towels between each trial.

Quantifications and statistical analyses

Statistical analyses were performed using Prism (GraphPad). Statistical tests and number of replicates are indicated in figures legend. All neurons on the reconstituted image were quantified and axon length was measured with the Nikon NIS Elements software. Axons shorter than 80µm were not counted. Distance travelled by mitochondria was calculating using kymographs on Nikon NIS Elements software. Quantifications were performed blind to genotype.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank members of the Courchet lab and Institut NeuroMyogene for useful comments and discussion. This work was supported by the Fondation pour la Recherche Medicale (AJE20141031276) and ERC Starting Grant (678302-NEUROMET). This work was performed within the framework of the LABEX CORTEX (ANR-11-LABX-0042) of Université de Lyon, within the program "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR).

A.G., E.G., G.M-D. and J.C. conceived the experiments, performed the experiments and interpreted the results. G.M-D. performed behavior analyses. J.C. and G.M-D. performed IUCE experiments. J.C. and E.G. prepared the manuscript.

FIGURES LEGEND

Figure 1: LKB1 and NUA1 are necessary for BDNF-induced axonal branching

(A-H) Representative images of mVenus expressing cortical neurons in the indicated conditions. Single-cell deletion of LKB1 (A-D) or NUA1 (E-H) was achieved by expression of CRE in LKB1^{F/F} or NUA1^{F/F} neurons, respectively. At DIV2, culture medium was supplemented with either vehicle (water) or BDNF (50nM).

(I-N) Quantification of axon length and collateral branches in the indicated conditions. Box-plot: 75th percentile, median and 25th percentile. Statistical tests: Mann Whitney test. (I-K) N_(WT, Mock)=101, N_(WT, BDNF)=75, N_(KO, Mock)=61, N_(KO, BDNF)=37. (L-N) N_(WT, Mock)=219, N_(WT, BDNF)=145, N_(KO, Mock)=168, N_(KO, BDNF)=103.

Figure 2: BDNF regulates mitochondria metabolism and trafficking.

(A) Representation of the experiment design for mitochondria trafficking. (B) Representative kymograph of neuron for 90 minutes. Neurons were treated with BDNF after 30min. (C) Acute treatment with BDNF (50nM) induced an arrest of mitochondria trafficking but not with HBSS. Statistical test : Wilcoxon and paired t-test (HBSS : p = 0,0072 ; BDNF : p = <0,0001) , N_(HBSS) = 19, N_(BDNF) = 23.

(D-G) Representative neuron electroporated with Perceval-HR before (D), and after addition of HBSS (E), BDNF (50nM) (F) and FCCP (1 μ M) (G). The ATP:ADP ratio was coded on a Rainbow LUT, with red high ratio and purple low ratio. (H-I) Quantifications of Perceval-HR signal in WT neurons over 60 minutes following addition of HBSS or BDNF (50nM). Fluorescence (F) was normalized to F₀ (signal at the time of injection) and F_{min} (minimum fluorescence obtained after FCCP addition). (J-K) Quantifications of Perceval-HR signal in LKB1 FF neurons over 15 minutes following addition of HBSS or BDNF (50nM).

Figure 3: Phosphorylation of LKB1 S431 is induced by BDNF and ERK.

(A) Phosphorylation of LKB1 and TrkB increased in presence of BDNF but not other growth factor. (B-C) At 5DIV, the increase of phosphorylation of LKB1 and NUAK1 are time-depend. After 10min of treatment phosphorylation of TrkB increase and reach maximum at 30min. Before treatment there is a basal phosphorylation of LKB1 and NUAK1 which increase with BDNF and reach a plateau at 30min. (D) After 30min of treatment, in control condition BDNF increases phosphorylation of TrkB and BDNF. Addition of U0126 or K252a has no effect of LKB1, but the addition of BDNF and U0126 (or K252a) do not allow to increase the LKB1 phosphorylation. In contrary, H89 or KT5720 inhibitor do not interfere with LKB1 phosphorylation. (E and G) Quantification of western-blot represent normalize ratio with respect to controls without BDNF of each condition.

Figure 4: LKB1 S431A mutation induces partial defects on axon branching and mitochondria trafficking.

(A-E) Representative images of LKB1^{F/F} neurons electroporated at E15.5 the indicated plasmids. Neuron morphology was visualized by mVenus expression. Neuronal morphology was assessed at 5DIV.

(F-J) Kymographs over 30 minutes of axonal mitochondria in dissociated neurons electroporated with the indicated constructs. Mitochondria were visualized by mito-DsRed expression. Image acquisition: 12 frames per minute.

(K-M) Quantifications of axon length (K), collateral branches (L) and branches normalized to axon length (M) in the conditions indicated. Data was normalized to the average of control condition (non-CRE neurons) to account for variability between cultures. Box-plot: 75th percentile, median and 25th percentile. Statistical tests: Kruskal-

Wallis test with Dunn's post-test. $N_{(\text{Non CRE, Control})}=120$, $N_{(\text{CRE, Knockout})}=73$, $N_{(\text{LKB1 WT})}=64$, $N_{(\text{LKB1 K78A})}=51$, $N_{(\text{LKB1S431A})}=64$ out of 5 independent experiments.

(N) Quantification of the fraction of stationary mitochondria over 30 minutes upon the indicated conditions. Bar graphs: average \pm SEM. Each point represents a single axon. Statistical tests: One-Way ANOVA with Dunn's post-test. $N_{(\text{Non CRE, Control})}=8$, $N_{(\text{CRE, Knockout})}=8$, $N_{(\text{LKB1 WT})}=9$, $N_{(\text{LKB1 K78A})}=6$, $N_{(\text{LKB1S431A})}=10$ out of 3 independent experiments.

Figure 5 : Phospho-defective LKB1 mutant impairs cortical axon branching in vivo.

(A-F) higher magnification of ipsilateral and contralateral side of coronal section of P21 LKB1F/F mice electroporated at E15.5 with pCAG-CRE-IRES-eGFP and plasmids indicated. (G-H) quantification of axon branching in ipsilateral (G) and contralateral side (H). Addition of LKB1 WT in KO condition, rescue of axonal branching in ipsilateral and contralateral side. Whereas addition of LKB1 K78A : kinase dead in KO condition does not rescue axonal branching neither in ipsilateral nor contralateral side. Finally, addition of LKB1 S431A leads to rescue axon branching in ipsilateral side but not in contralateral side. Statistical test : Kruskal Wallis test with Dunn's multiple comparison (A) and 2-way Anova (B). $N_{(\text{Control})} = 6$; $N_{(\text{pCAG-CRE-IRES-GFP})} = 7$; $N_{(\text{pCAG-CRE-IRES-GFP+LKB1 WT})} = 4$; $N_{(\text{pCAG-CRE-IRES-GFP+LKB1 K78A})} = 6$; $N_{(\text{pCAG-CRE-IRES-GFP+LKB1 S431A})} = 9$. Blue: Hoechst, Red: CUX1 immunostaining.

Figure 6 : LKB1 S431A transgenic mice have defect in axon branching and behavior. (A) mouse crossing genotype. B-E : higher magnification of the ipsilateral (B-C) or the contralateral side (D-E) of P21 WT or S431A mice after *in utero*

electroporation at E15.5 of pCAG-IRES-GFP or pCAG-CRE-IRES-GFP as indicated.

Blue: Hoechst, Red: CUX1 immunostaining

Figure S1 : BDNF increases axon branching in cortical neurons

(A) WT neurons electroporated with pCAG-mVenus and fixed at 5DIV, neurons was treated at 1DIV with BDNF (50nM). (B-E) quantification of length and branching with or without BDNF. BDNF does not affect axon length (B) but increases total number of branches and branches/250 μ m inducing an increase of the total length. Statistical test : Mann-Whitney test. $N_{\text{Mock}} = 65$, $N_{\text{BDNF}} = 54$

Figure S2 : Modifications in mitochondrial density and morphology by BDNF are dependent on LKB1.

(A-D) Representative distribution of mitochondria along the axon of eletroporated neurons with plasmids indicated and treated (B and D) or not (A and C) with BDNF (50ng/mL). (E) Quantifications of mitochondria size. BDNF decreases mitochondria size in control condition. Absence of LKB1 does not induce modification of mitochondria size, but LKB1 is necessary for BDNF-induced mitochondria size decrease. (F) Quantifications of mitochondria density. The decrease of mitochondria size leads to an increase of mitochondria density in control condition. Absence of LKB1 induces a decrease of mitochondria density.

Figure S3 : NUAK1 is necessary for BDNF-induced increases of mitochondrial respiration.

(A) Mitostress assay in cortical neurons. Maximal oxygen consumption rate (OCR) is increased in presence of BDNF. Statistical test : 2 way ANOVA. N = 5 embryos out of 2 independent cultures (same for WT and BDNF) (B) BDNF increases basal respiration in WT condition and this increase is dependent of NUAK1. Statistical test : Mann-Whitney test. N = 10 (WT, with and without BDNF) and N=4 (KO with and without BDNF) out of 2 independent cultures.

Figure S4 : Phenotypic characterization of LKB1 cKO mice.

(A-B) Coronal sections of LKB1 WT or LKB1 KO mice. Green arrow show a decrease of axonal branching and axonal spread in contralateral side, Blue arrow show a decrease of apical dendrites. (C-F) Higher magnification of ipsilateral (C and E) or contralateral (D and F) of coronal sections of P21 mice electroporated with plasmids indicated. (G-J) Higher magnification of ipsilateral (G and I) or contralateral (H and J) of coronal sections of P90 mice electroporated with plasmids indicated.

Figure S5 : LKB1 S431A transgenic mice have behavior defects

(A) Quantification of Y maze assay of p21 female mice. $N_{WT} = 3$, $N_{Mut} = 6$. (B) 3-chamber sociability test. Quantification of time spent in each chamber for P60 mice show any social deficit in S431A mice. $N_{WT} = 3$, $N_{Mut} = 7$. (C) 3-chamber sociability test. Quantification of time spent in each chamber reveal a defect on preference for social novelty. Statistical test : 2 way ANOVA with multiple comparison. $N_{WT} = 3$, $N_{Mut} = 7$.

REFERENCES

- Arimura, N., Kaibuchi, K., 2007. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience* 8, 194–205.
doi:10.1038/nrn2056
- Armijo-Weingart, L., Ketschek, A., Sainath, R., Pacheco, A., Smith, G.M., Gallo, G., 2019. Neurotrophins induce fission of mitochondria along embryonic sensory axons. *Elife* 8, 489. doi:10.7554/eLife.49494
- Arthur, J.S.C., Fong, A.L., Dwyer, J.M., Davare, M., Reese, E., Obrietan, K., Impey, S., 2004. Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 mediates cAMP response element-binding protein phosphorylation and activation by neurotrophins. *J. Neurosci.* 24, 4324–4332. doi:10.1523/JNEUROSCI.5227-03.2004
- Baas, A.F., Boudeau, J., Sapkota, G.P., Smit, L., Medema, R., Morrice, N.A., Alessi, D.R., Clevers, H.C., 2003. Activation of the tumour suppressor kinase LKB1 by the STE20-like pseudokinase STRAD. *EMBO J.* 22, 3062–3072.
doi:10.1093/emboj/cdg292
- Baas, A.F., Kuipers, J., van der Wel Nicole N, Batlle, E., Koerten, H.K., Peters, P.J., Clevers, H.C., 2004. Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD. *Cell* 116, 457–466. doi:10.1016/s0092-8674(04)00114-x
- Bardeesy, N., Sinha, M., Hezel, A.F., Signoretti, S., Hathaway, N.A., Sharpless, N.E., Loda, M., Carrasco, D.R., DePinho, R.A., 2002. Loss of the Lkb1 tumour suppressor provokes intestinal polyposis but resistance to transformation. *Nature* 419, 162–167. doi:10.1038/nature01045
- Barnes, A.P., Lilley, B.N., Pan, Y.A., Plummer, L.J., Powell, A.W., Raines, A.N., Sanes, J.R., Polleux, F., 2007. LKB1 and SAD kinases define a pathway required for the polarization of cortical neurons. *Cell* 129, 549–563.
doi:10.1016/j.cell.2007.03.025
- Barnes, A.P., Polleux, F., 2009. Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 347–381.
doi:10.1146/annurev.neuro.31.060407.125536

- Beirowski, B., Babetto, E., Golden, J.P., Chen, Y.-J., Yang, K., Gross, R.W., Patti, G.J., Milbrandt, J., 2014. Metabolic regulator LKB1 is crucial for Schwann cell-mediated axon maintenance. *Nat Neurosci* 17, 1351–1361. doi:10.1038/nn.3809
- Bony, G., Szczurkowska, J., Tamagno, I., Shelly, M., Contestabile, A., Cancedda, L., 2013. Non-hyperpolarizing GABAB receptor activation regulates neuronal migration and neurite growth and specification by cAMP/LKB1. *Nat Commun* 4, 1800–15. doi:10.1038/ncomms2820
- Boudeau, J., Baas, A.F., Deak, M., Morrice, N.A., Kieloch, A., Schutkowski, M., Prescott, A.R., Clevers, H.C., Alessi, D.R., 2003. MO25alpha/beta interact with STRADalpha/beta enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm. *EMBO J.* 22, 5102–5114. doi:10.1093/emboj/cdg490
- Burkhalter, J., Fiumelli, H., Allaman, I., Chatton, J.-Y., Martin, J.-L., 2003. Brain-derived neurotrophic factor stimulates energy metabolism in developing cortical neurons. *J. Neurosci.* 23, 8212–8220. doi:10.1523/JNEUROSCI.23-23-08212.2003
- Cao, L., Dhillia, A., Mukai, J., Blazeski, R., Lodovichi, C., Mason, C.A., Gogos, J.A., 2007. Genetic modulation of BDNF signaling affects the outcome of axonal competition in vivo. *Current Biology* 17, 911–921. doi:10.1016/j.cub.2007.04.040
- Cheng, P.-L., Song, A.-H., Wong, Y.-H., Wang, S., Zhang, X., Poo, M.-M., 2011. Self-amplifying autocrine actions of BDNF in axon development. *PNAS* 108, 18430–18435. doi:10.1073/pnas.1115907108
- Cohen-Cory, S., 1999. BDNF modulates, but does not mediate, activity-dependent branching and remodeling of optic axon arbors in vivo. *J. Neurosci.* 19, 9996–10003. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-22-09996.1999
- Cohen-Cory, S., Fraser, S.E., 1995. Effects of brain-derived neurotrophic factor on optic axon branching and remodelling in vivo. *Nature* 378, 192–196. doi:10.1038/378192a0
- Cohen-Cory, S., Kidane, A.H., Shirkey, N.J., Marshak, S., 2010. Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity. *Dev Neurobiol* 70, 271–288. doi:10.1002/dneu.20774
- Collins, S.P., Reoma, J.L., Gamm, D.M., Uhler, M.D., 2000. LKB1, a novel serine/threonine protein kinase and potential tumour suppressor, is phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase (PKA) and prenylated in vivo. *Biochemical Journal* 345 Pt 3, 673–680. doi:10.1042/bj3450673

- Courchet, J., Lewis, T.L., Lee, S., Courchet, V., Liou, D.-Y., Aizawa, S., Polleux, F., 2013. Terminal axon branching is regulated by the LKB1-NUAK1 kinase pathway via presynaptic mitochondrial capture. *Cell* 153, 1510–1525. doi:10.1016/j.cell.2013.05.021
- Courchet, V., Roberts, A.J., Meyer-Dilhet, G., Del Carmine, P., Lewis, T.L., Polleux, F., Courchet, J., 2018. Haploinsufficiency of autism spectrum disorder candidate gene NUAK1 impairs cortical development and behavior in mice. *Nat Commun* 9, 4289. doi:10.1038/s41467-018-06584-5
- Dellu, F., Contarino, A., Simon, H., Koob, G.F., Gold, L.H., 2000. Genetic differences in response to novelty and spatial memory using a two-trial recognition task in mice. *Neurobiol Learn Mem* 73, 31–48. doi:10.1006/nlme.1999.3919
- Fernandez, A., Meechan, D.W., Karpinski, B.A., Paronett, E.M., Bryan, C.A., Rutz, H.L., Radin, E.A., Lubin, N., Bonner, E.R., Popratiloff, A., Rothblat, L.A., Maynard, T.M., LaMantia, A.-S., 2019. Mitochondrial Dysfunction Leads to Cortical Under-Connectivity and Cognitive Impairment. *Neuron* 102, 1127–1142.e3. doi:10.1016/j.neuron.2019.04.013
- Goebbels, S., Bormuth, I., Bode, U., Hermanson, O., Schwab, M.H., Nave, K.-A., 2006. Genetic targeting of principal neurons in neocortex and hippocampus of NEX-Cre mice. *Genesis* 44, 611–621. doi:10.1002/dvg.20256
- Gorski, J.A., Talley, T., Qiu, M., Puellas, L., Rubenstein, J.L.R., Jones, K.R., 2002. Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *J. Neurosci.* 22, 6309–6314.
- Gorski, J.A., Zeiler, S.R., Tamowski, S., Jones, K.R., 2003. Brain-derived neurotrophic factor is required for the maintenance of cortical dendrites. *J. Neurosci.* 23, 6856–6865. doi:10.1523/JNEUROSCI.23-17-06856.2003
- Guo, J., Ji, Y., Ding, Y., Jiang, W., Sun, Y., Lu, B., Nagappan, G., 2016. BDNF pro-peptide regulates dendritic spines via caspase-3. *Cell Death Dis* 7, e2264–e2264. doi:10.1038/cddis.2016.166
- Hand, R., Bortone, D., Mattar, P., Nguyen, L., Heng, J.I.-T., Guerrier, S., Boutt, E., Peters, E., Barnes, A.P., Parras, C., Schuurmans, C., Guillemot, F., Polleux, F., 2005. Phosphorylation of Neurogenin2 specifies the migration properties and the dendritic morphology of pyramidal neurons in the neocortex. *Neuron* 48, 45–62. doi:10.1016/j.neuron.2005.08.032

- Hand, R., Polleux, F., 2011. Neurogenin2 regulates the initial axon guidance of cortical pyramidal neurons projecting medially to the corpus callosum. *Neural Dev* 6, 30. doi:10.1186/1749-8104-6-30
- Hawley, S.A., Boudeau, J., Reid, J.L., Mustard, K.J., Udd, L., Mäkelä, T.P., Alessi, D.R., Hardie, D.G., 2003. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J. Biol.* 2, 28–16. doi:10.1186/1475-4924-2-28
- Hong, S.-P., Leiper, F.C., Woods, A., Carling, D., Carlson, M., 2003. Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *PNAS* 100, 8839–8843. doi:10.1073/pnas.1533136100
- Houde, V.P., Ritorto, M.S., Gourlay, R., Varghese, J., Davies, P., Shpiro, N., Sakamoto, K., Alessi, D.R., 2014. Investigation of LKB1 Ser431 phosphorylation and Cys433 farnesylation using mouse knockin analysis reveals an unexpected role of prenylation in regulating AMPK activity. *Biochem. J.* 458, 41–56. doi:10.1042/BJ20131324
- Jaleel, M., McBride, A., Lizcano, J.M., Deak, M., Toth, R., Morrice, N.A., Alessi, D.R., 2005. Identification of the sucrose non-fermenting related kinase SNRK, as a novel LKB1 substrate. *FEBS Lett.* 579, 1417–1423. doi:10.1016/j.febslet.2005.01.042
- Jeanneteau, F., Deinhardt, K., Miyoshi, G., Bennett, A.M., Chao, M.V., 2010. The MAP kinase phosphatase MKP-1 regulates BDNF-induced axon branching. *Nat Neurosci* 13, 1373–1379. doi:10.1038/nn.2655
- Kemphues, K.J., Priess, J.R., Morton, D.G., Cheng, N., 1988. Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos. *Cell* 52, 311–320. doi:10.1016/S0092-8674(88)80024-2
- Kim, J.S.M., Hung, W., Narbonne, P., Roy, R., Zhen, M., 2010. *C. elegans* STRADalpha and SAD cooperatively regulate neuronal polarity and synaptic organization. *Development* 137, 93–102. doi:10.1242/dev.041459
- Kishi, M., Pan, Y.A., Crump, J.G., Sanes, J.R., 2005. Mammalian SAD kinases are required for neuronal polarization. *Science* 307, 929–932. doi:10.1126/science.1107403
- Kuwako, K.-I., Okano, H., 2018. The LKB1-SIK Pathway Controls Dendrite Self-Avoidance in Purkinje Cells. *Cell Rep* 24, 2808–2818.e4. doi:10.1016/j.celrep.2018.08.029

- Kwon, S.-K., Sando, R., Lewis, T.L., Hirabayashi, Y., Maximov, A., Polleux, F., 2016. LKB1 Regulates Mitochondria-Dependent Presynaptic Calcium Clearance and Neurotransmitter Release Properties at Excitatory Synapses along Cortical Axons. *PLoS Biol.* 14, e1002516. doi:10.1371/journal.pbio.1002516
- Lanfranchi, M., Meyer-Dilhet, G., Reis, Dos, R., Garcia, A., Blondet, C., Javin, L., Amar, A., Courchet, J., 2020. The AMPK-related kinase NUA1 controls cortical axons branching through a local modulation of mitochondrial metabolic functions. *bioRxiv* 2020.05.18.102582. doi:10.1101/2020.05.18.102582
- Lewis, T.L., Courchet, J., Polleux, F., 2013. Cell biology in neuroscience: Cellular and molecular mechanisms underlying axon formation, growth, and branching. *J. Cell Biol.* 202, 837–848. doi:10.1083/jcb.201305098
- Lilley, B.N., Krishnaswamy, A., Wang, Z., Kishi, M., Frank, E., Sanes, J.R., 2014. SAD kinases control the maturation of nerve terminals in the mammalian peripheral and central nervous systems. *PNAS.* doi:10.1073/pnas.1321990111
- Lilley, B.N., Pan, Y.A., Sanes, J.R., 2013. SAD kinases sculpt axonal arbors of sensory neurons through long- and short-term responses to neurotrophin signals. *Neuron* 79, 39–53. doi:10.1016/j.neuron.2013.05.017
- Lizcano, J.M., Göransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N.A., Boudeau, J., Hawley, S.A., Udd, L., Mäkelä, T.P., Hardie, D.G., Alessi, D.R., 2004. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J.* 23, 833–843. doi:10.1038/sj.emboj.7600110
- Markham, A., Cameron, I., Franklin, P., Spedding, M., 2004. BDNF increases rat brain mitochondrial respiratory coupling at complex I, but not complex II. *Eur J Neurosci* 20, 1189–1196. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03578.x
- Marosi, K., Mattson, M.P., 2014. BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends Endocrinol. Metab.* 25, 89–98. doi:10.1016/j.tem.2013.10.006
- Martin, S.G., St Johnston, D., 2003. A role for *Drosophila* LKB1 in anterior-posterior axis formation and epithelial polarity. *Nature* 421, 379–384. doi:10.1038/nature01296
- Meyer-Dilhet, G., Courchet, J., 2020. In Utero Cortical Electroporation of Plasmids in the Mouse Embryo: STAR Protocols. *STAR Protocols* 1. doi:10.1016/j.xpro.2020.100027

- Mizuno, H., Hirano, T., 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. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.07070.x
- Mizuno, H., Hirano, T., 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. doi:10.1523/JNEUROSCI.1215-07.2007
- Moy, S.S., Nadler, J.J., Perez, A., Barbaro, R.P., Johns, J.M., Magnuson, T.R., Piven, J., Crawley, J.N., 2004. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes Brain Behav.* 3, 287–302. doi:10.1111/j.1601-1848.2004.00076.x
- Namba, T., Funahashi, Y., Nakamuta, S., Xu, C., Takano, T., Kaibuchi, K., 2015. Extracellular and Intracellular Signaling for Neuronal Polarity. *Physiol. Rev.* 95, 995–1024. doi:10.1152/physrev.00025.2014
- Ozdinler, P.H., Macklis, J.D., 2006. IGF-I specifically enhances axon outgrowth of corticospinal motor neurons. *Nat Neurosci* 9, 1371–1381. doi:10.1038/nn1789
- Polleux, F., Ghosh, A., 2002. The slice overlay assay: a versatile tool to study the influence of extracellular signals on neuronal development. *Sci. STKE* 2002, pl9–pl9. doi:10.1126/stke.2002.136.pl9
- Polleux, F., Snider, W., 2010. Initiating and growing an axon. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a001925–a001925. doi:10.1101/cshperspect.a001925
- Sainath, R., Ketschek, A., Grandi, L., Gallo, G., 2017. CSPGs inhibit axon branching by impairing mitochondria-dependent regulation of actin dynamics and axonal translation. *Dev Neurobiol* 77, 454–473. doi:10.1002/dneu.22420
- Samuel, M.A., Voinescu, P.E., Lilley, B.N., de Cabo, R., Foretz, M., Viollet, B., Pawlyk, B., Sandberg, M.A., Vavvas, D.G., Sanes, J.R., 2014. LKB1 and AMPK regulate synaptic remodeling in old age. *Nat Neurosci* 17, 1190–1197. doi:10.1038/nn.3772
- Sapkota, G.P., Kieloch, A., Lizcano, J.M., Lain, S., Arthur, J.S., Williams, M.R., Morrice, N., Deak, M., Alessi, D.R., 2001. Phosphorylation of the protein kinase mutated in Peutz-Jeghers cancer syndrome, LKB1/STK11, at Ser431 by p90(RSK) and cAMP-dependent protein kinase, but not its farnesylation at

- Cys(433), is essential for LKB1 to suppress cell growth. *J. Biol. Chem.* 276, 19469–19482. doi:10.1074/jbc.M009953200
- Satoh, D., Arber, S., 2013. Carving axon arbors to fit: master directs one kinase at a time. *Cell* 153, 1425–1426. doi:10.1016/j.cell.2013.05.047
- Shaw, R.J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R.L., Witters, L.A., DePinho, R.A., Cantley, L.C., 2004. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *PNAS* 101, 3329–3335. doi:10.1073/pnas.0308061100
- Shelly, M., Cancedda, L., Heilshorn, S., Sumbre, G., Poo, M.-M., 2007. LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization. *Cell* 129, 565–577. doi:10.1016/j.cell.2007.04.012
- Shelly, M., Cancedda, L., Lim, B.K., Popescu, A.T., Cheng, P.-L., Gao, H., Poo, M.-M., 2011. Semaphorin3A regulates neuronal polarization by suppressing axon formation and promoting dendrite growth. *Neuron* 71, 433–446. doi:10.1016/j.neuron.2011.06.041
- Shelly, M., Lim, B.K., Cancedda, L., Heilshorn, S.C., Gao, H., Poo, M.-M., 2010. Local and long-range reciprocal regulation of cAMP and cGMP in axon/dendrite formation. *Science* 327, 547–552. doi:10.1126/science.1179735
- Shimojo, M., Courchet, J., Pieraut, S., Torabi-Rander, N., Sando, R., Polleux, F., Maximov, A., 2015. SNAREs Controlling Vesicular Release of BDNF and Development of Callosal Axons. *Cell Rep* 11, 1054–1066. doi:10.1016/j.celrep.2015.04.032
- Sosa, L., Dupraz, S., Laurino, L., Bollati, F., Bisbal, M., Cáceres, A., Pfenninger, K.H., Quiroga, S., 2006. IGF-1 receptor is essential for the establishment of hippocampal neuronal polarity. *Nat Neurosci* 9, 993–995. doi:10.1038/nn1742
- Spillane, M., Ketschek, A., Merianda, T.T., Twiss, J.L., Gallo, G., 2013. Mitochondria coordinate sites of axon branching through localized intra-axonal protein synthesis. *Cell Rep* 5, 1564–1575. doi:10.1016/j.celrep.2013.11.022
- Su, B., Ji, Y.-S., Sun, X.-L., Liu, X.-H., Chen, Z.-Y., 2014. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced mitochondrial motility arrest and presynaptic docking contribute to BDNF-enhanced synaptic transmission. *J. Biol. Chem.* 289, 1213–1226. doi:10.1074/jbc.M113.526129
- Suárez, R., Fenlon, L.R., Marek, R., Avitan, L., Sah, P., Goodhill, G.J., Richards, L.J., 2014. Balanced interhemispheric cortical activity is required for correct targeting

- of the corpus callosum. *Neuron* 82, 1289–1298.
doi:10.1016/j.neuron.2014.04.040
- Sun, G., Reynolds, R., Leclerc, I., Rutter, G.A., 2011. RIP2-mediated LKB1 deletion causes axon degeneration in the spinal cord and hind-limb paralysis. *Dis Model Mech* 4, 193–202. doi:10.1242/dmm.006833
- Tantama, M., Martínez-François, J.R., Mongeon, R., Yellen, G., 2013. Imaging energy status in live cells with a fluorescent biosensor of the intracellular ATP-to-ADP ratio. *Nat Commun* 4, 2550. doi:10.1038/ncomms3550
- Ulisse, V., Dey, S., Rothbard, D.E., Zeevi, E., Gokhman, I., Dadosh, T., Minis, A., Yaron, A., 2020. Regulation of axonal morphogenesis by the mitochondrial protein Efh1. *Life Sci Alliance* 3. doi:10.26508/lsa.202000753
- Vaarmann, A., Mandel, M., Zeb, A., Wareski, P., Liiv, J., Kuum, M., Antsov, E., Liiv, M., Cagalinec, M., Choubey, V., Kaasik, A., 2016. Mitochondrial biogenesis is required for axonal growth. *Development* 143, 1981–1992.
doi:10.1242/dev.128926
- Veleva-Rotse, B.O., Smart, J.L., Baas, A.F., Edmonds, B., Zhao, Z.-M., Brown, A., Klug, L.R., Hansen, K., Reilly, G., Gardner, A.P., Subbiah, K., Gaucher, E.A., Clevers, H., Barnes, A.P., 2014. STRAD pseudokinases regulate axogenesis and LKB1 stability. *Neural Dev* 9, 5. doi:10.1186/1749-8104-9-5
- Wang, C.-L., Zhang, L., Zhou, Y., Zhou, J., Yang, X.-J., Duan, S.-M., Xiong, Z.-Q., Ding, Y.-Q., 2007. Activity-dependent development of callosal projections in the somatosensory cortex. *J. Neurosci.* 27, 11334–11342.
doi:10.1523/JNEUROSCI.3380-07.2007
- Woods, A., Johnstone, S.R., Dickerson, K., Leiper, F.C., Fryer, L.G.D., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., Carling, D., 2003. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Current Biology* 13, 2004–2008. doi:10.1016/j.cub.2003.10.031
- Xu, Z., Lv, X.-A., Dai, Q., Lu, M., Jin, Z., 2018. Exogenous BDNF Increases Mitochondrial pCREB and Alleviates Neuronal Metabolic Defects Following Mechanical Injury in a MPTP-Dependent Way. *Mol. Neurobiol.* 55, 3499–3512.
doi:10.1007/s12035-017-0576-5
- Yi, J.J., Barnes, A.P., Hand, R., Polleux, F., Ehlers, M.D., 2010. TGF-beta signaling specifies axons during brain development. *Cell* 142, 144–157.
doi:10.1016/j.cell.2010.06.010

Zheng, B., Jeong, J.H., Asara, J.M., Yuan, Y.-Y., Granter, S.R., Chin, L., Cantley, L.C., 2009. Oncogenic B-RAF negatively regulates the tumor suppressor LKB1 to promote melanoma cell proliferation. *Molecular Cell* 33, 237–247.
doi:10.1016/j.molcel.2008.12.026

FIGURES

Figure 1

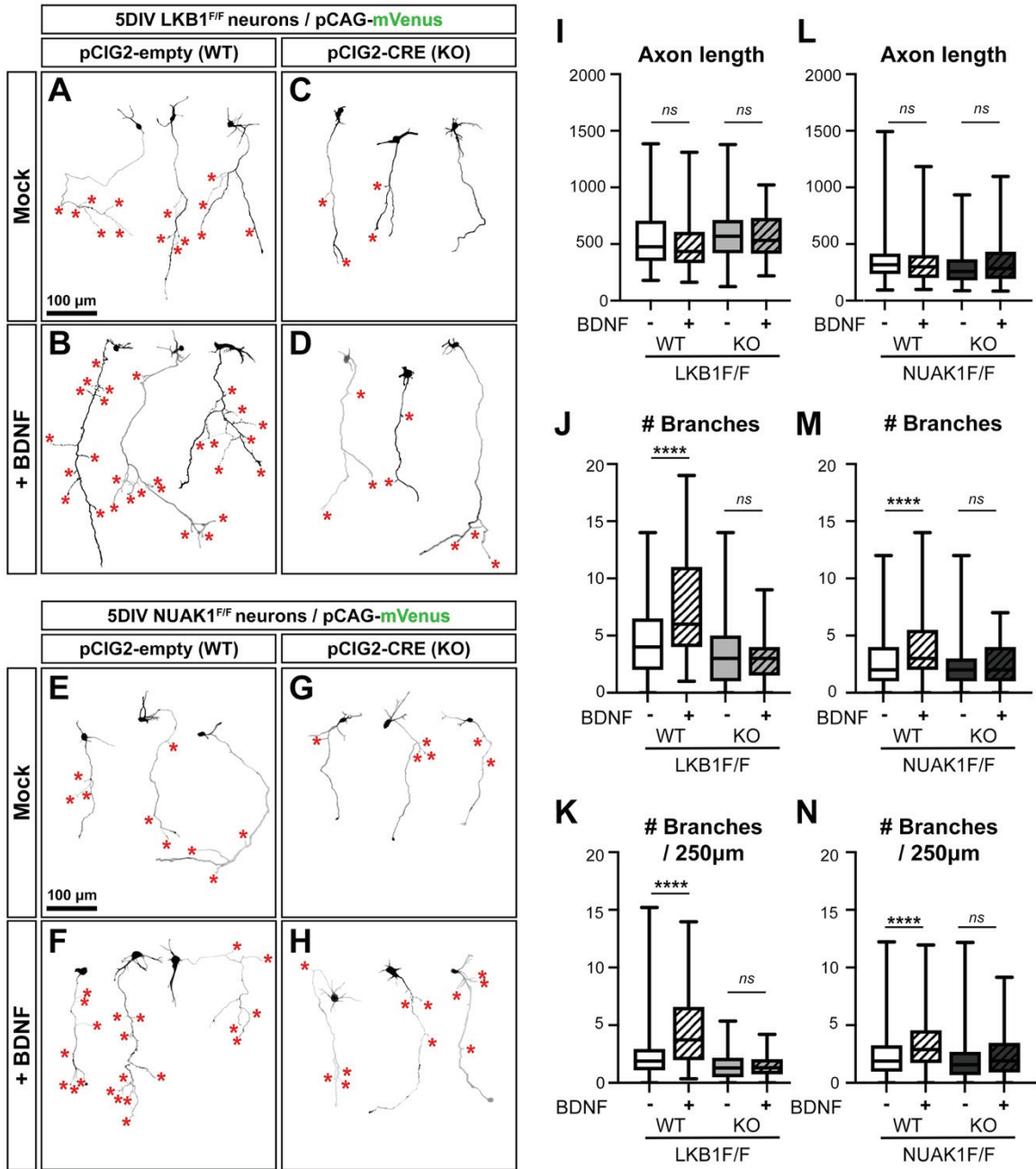


Figure 2

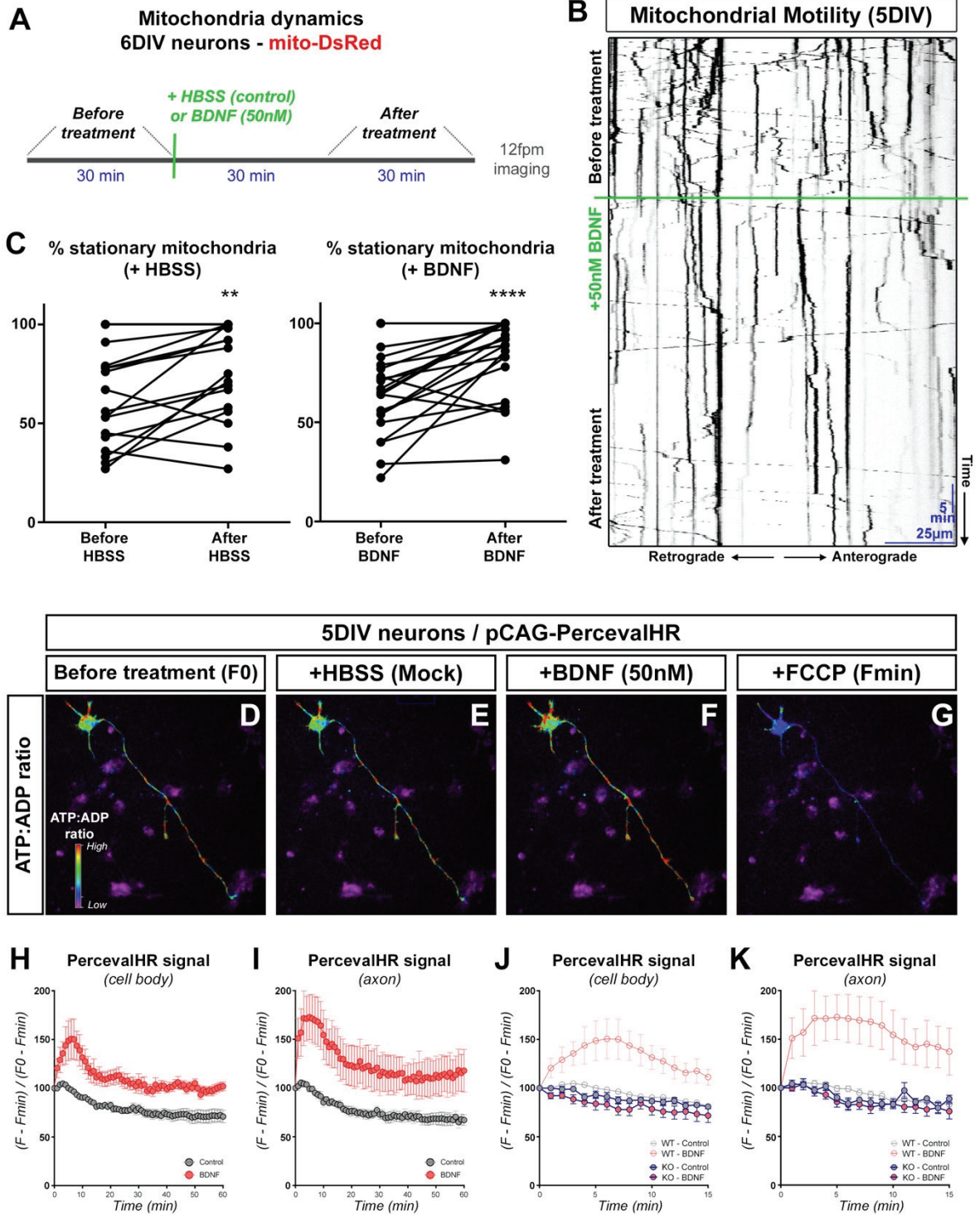


Figure 3

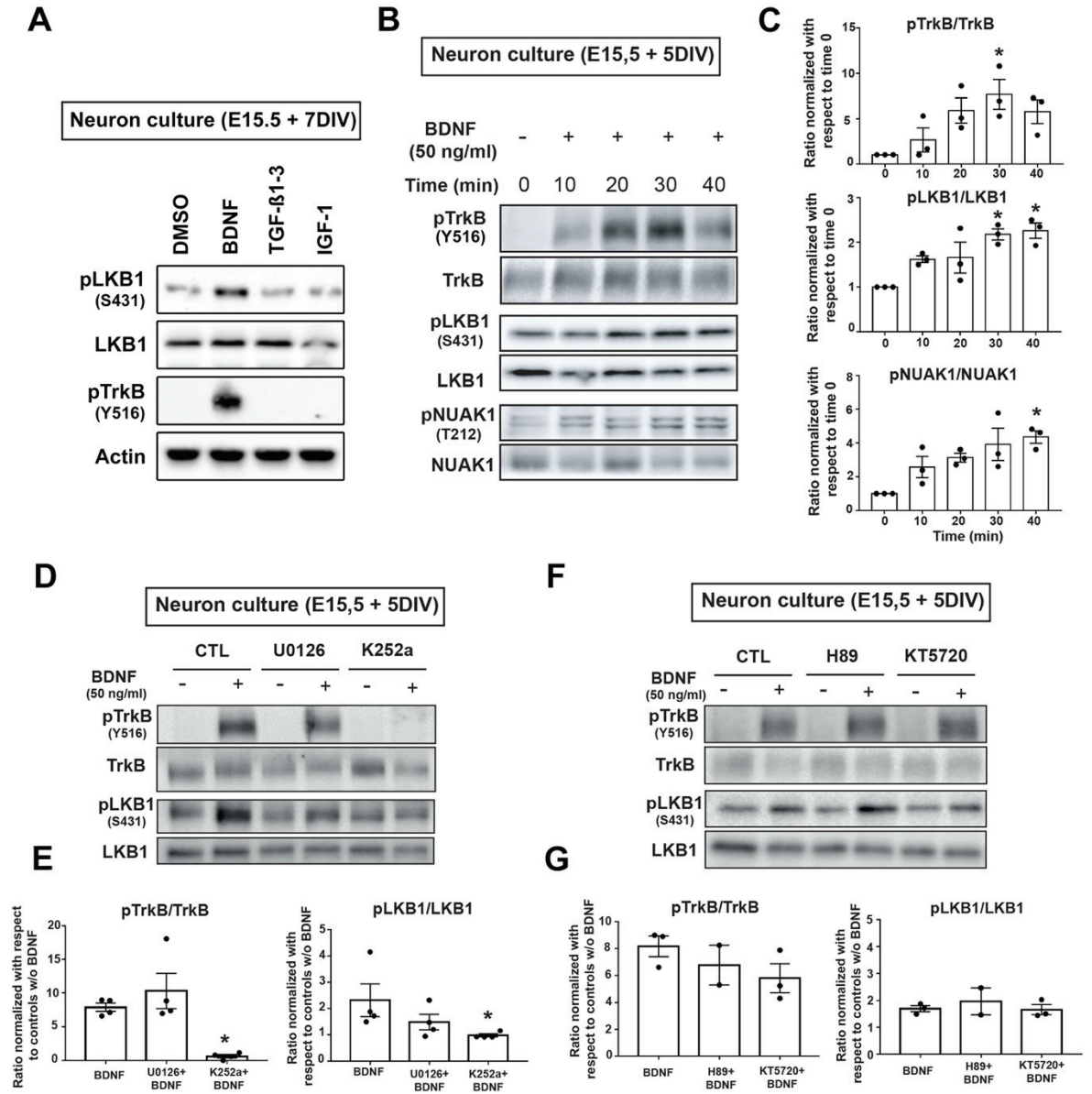


Figure 4

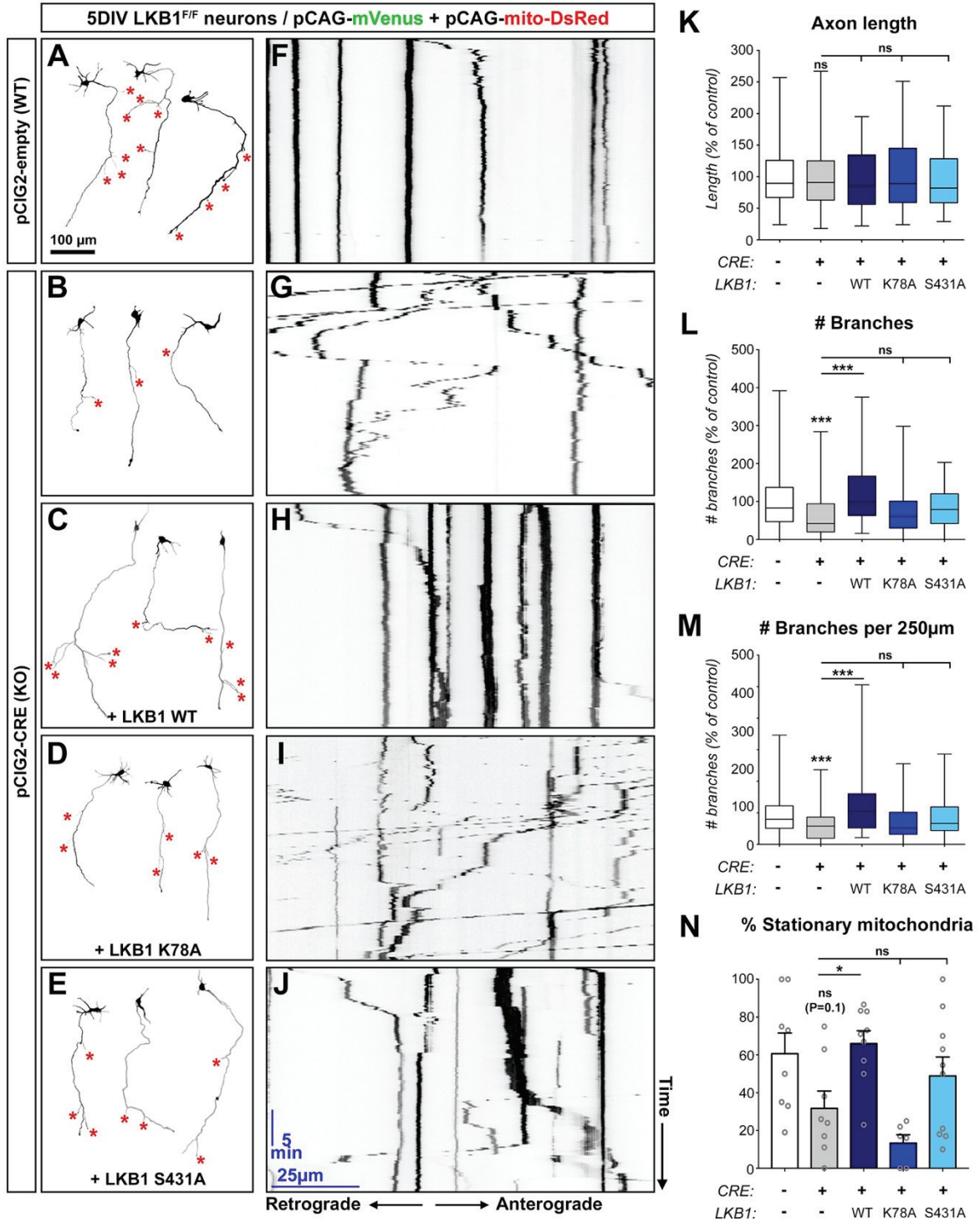


Figure 5

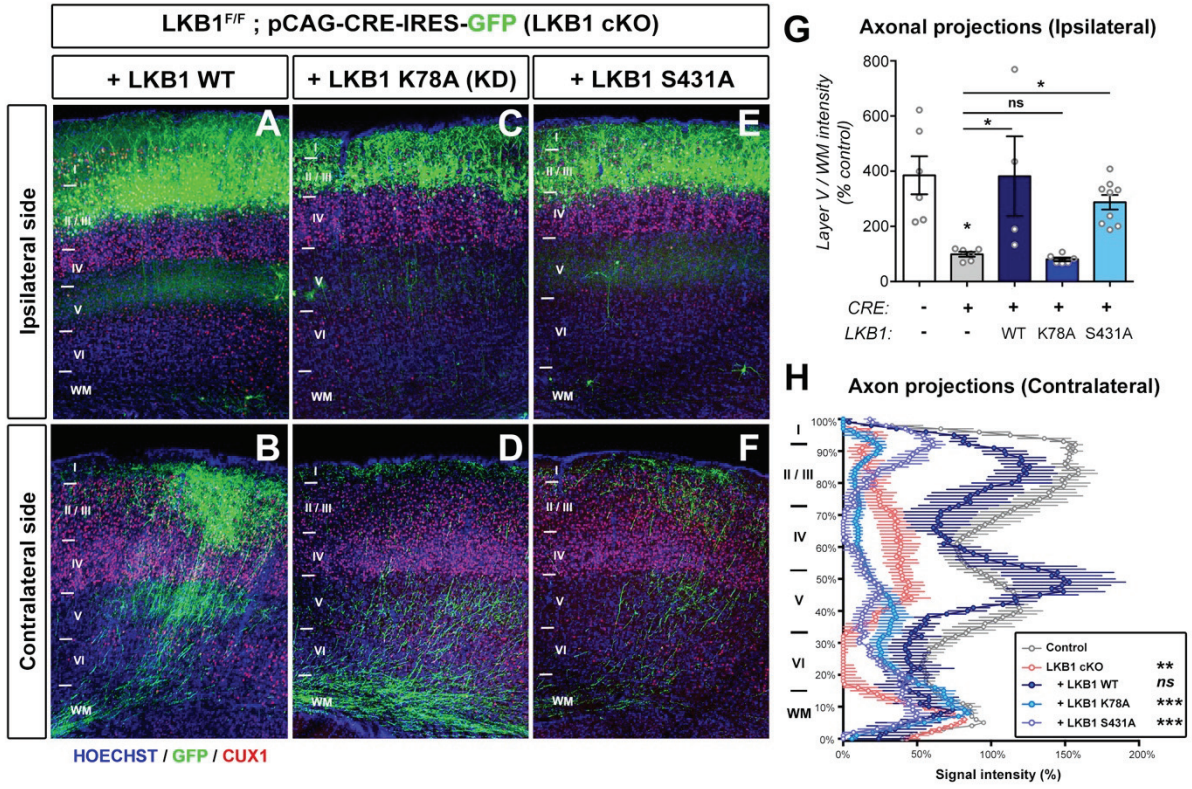


Figure 6

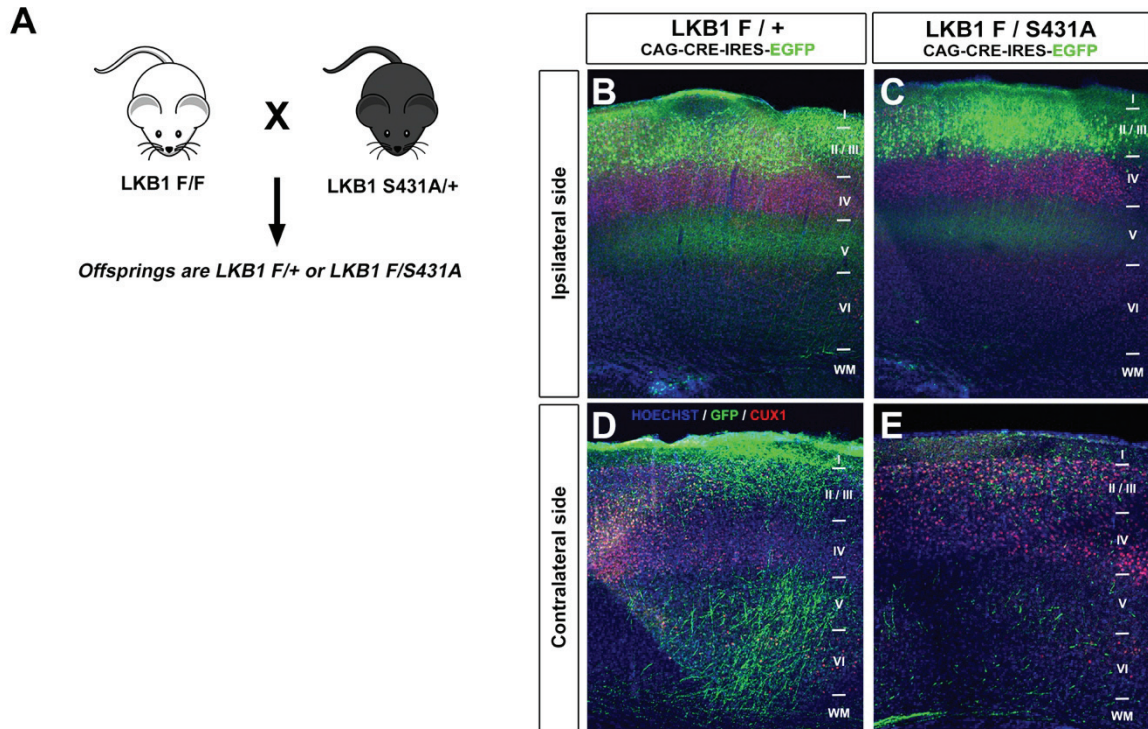


Figure S1

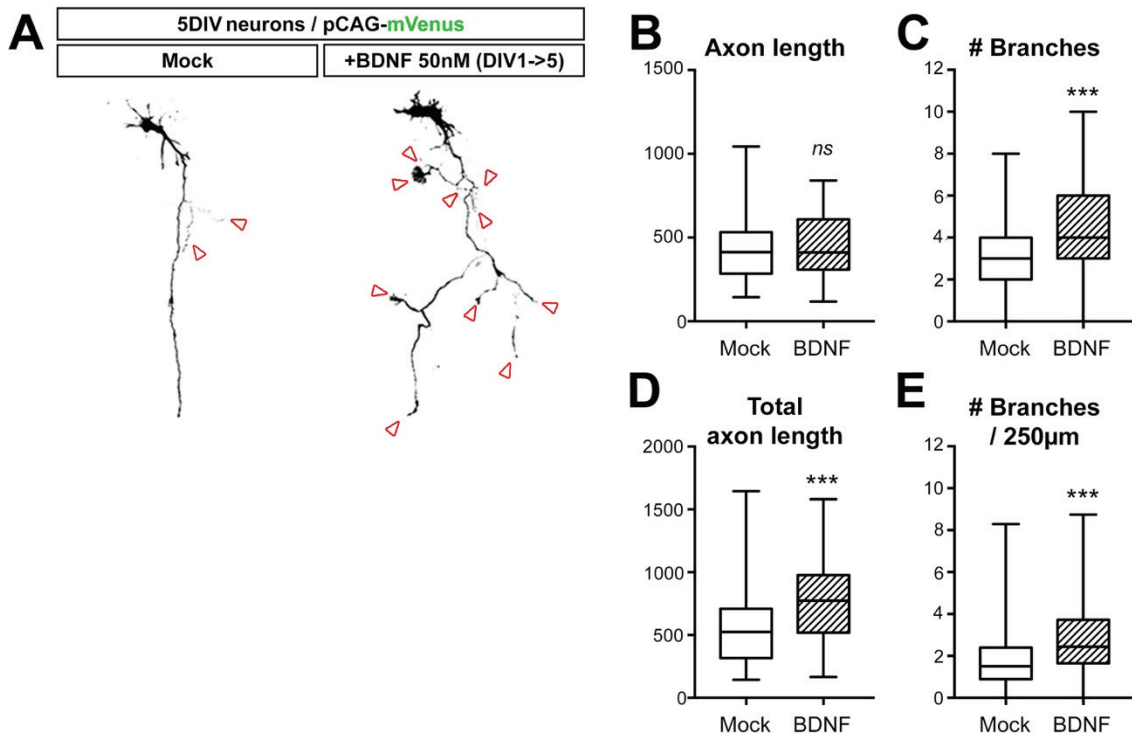


Figure S2

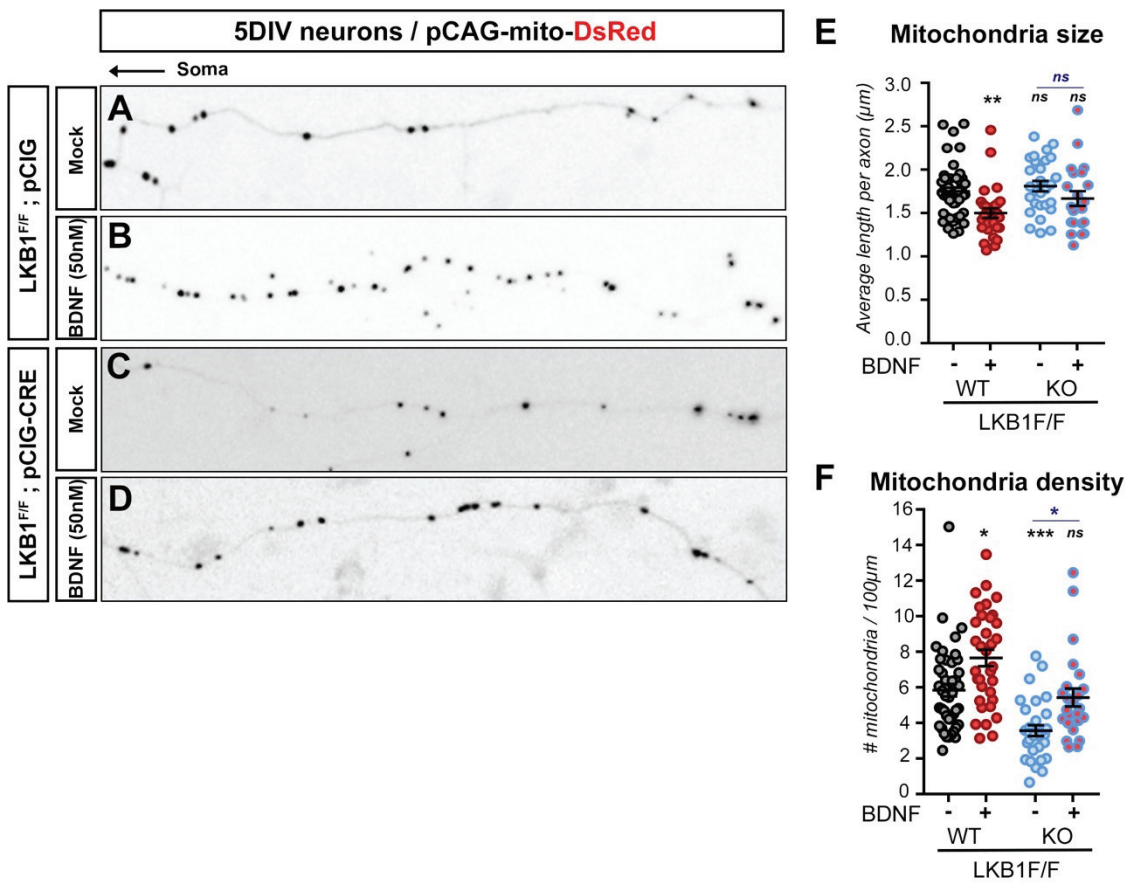


Figure S3

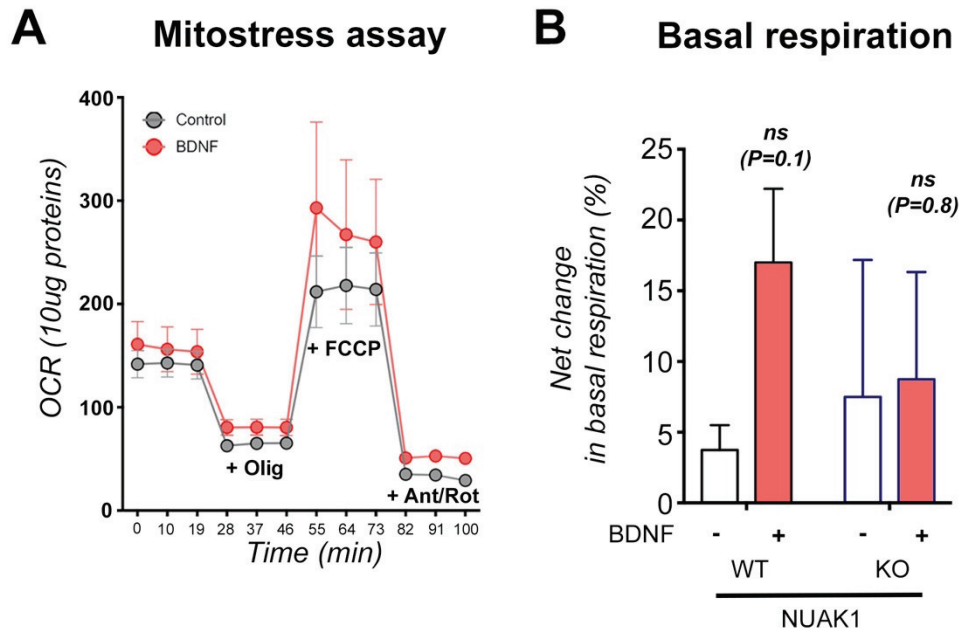


Figure S4

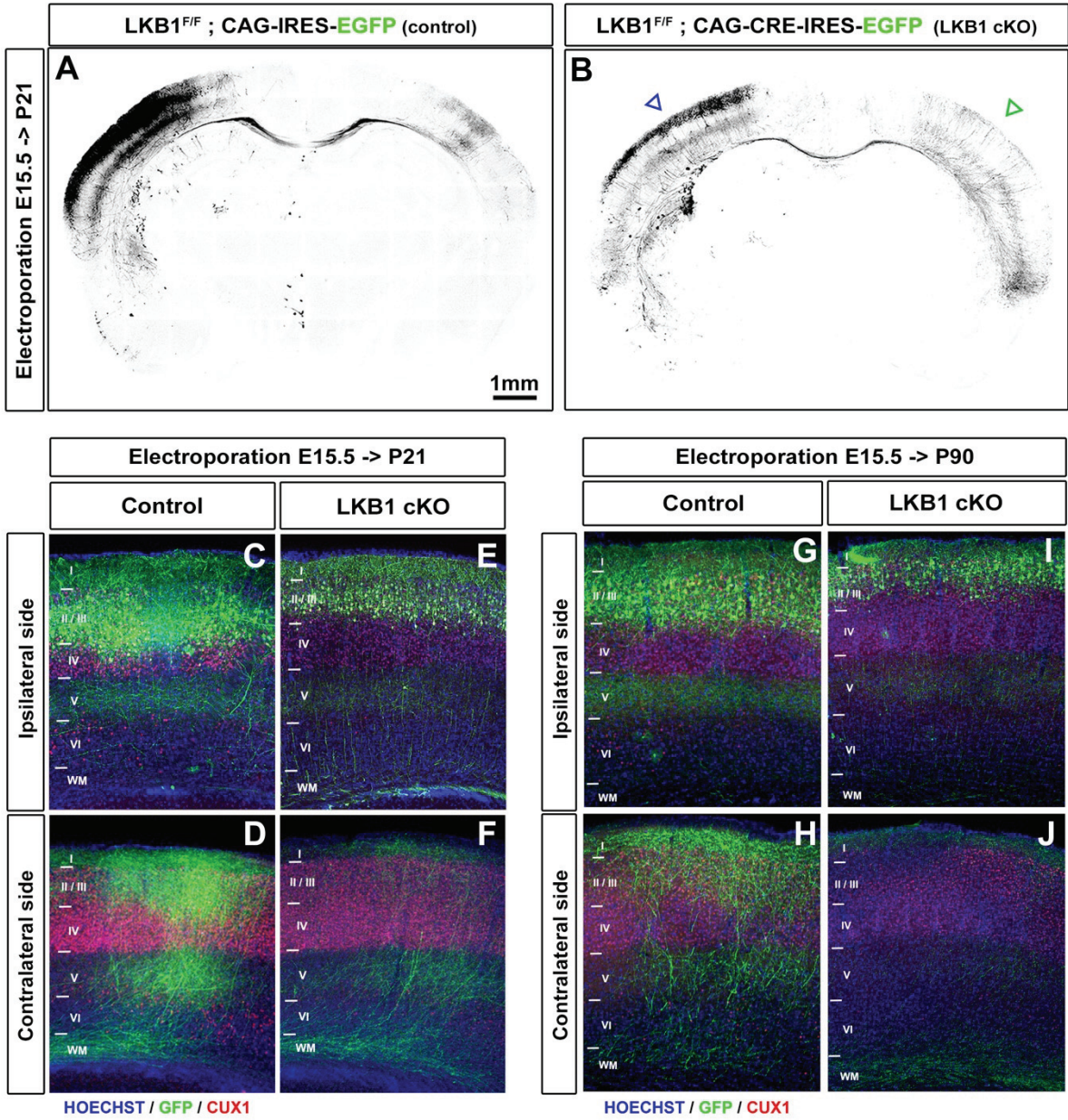
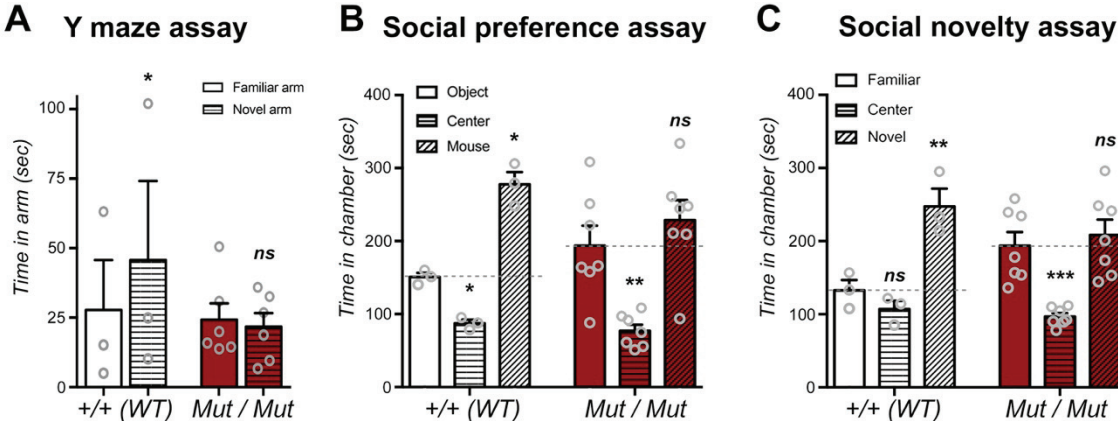


Figure S5



CONCLUSIONS ET DISCUSSION

I- Régulation du branchement axonal *in vitro* par la voie BDNF-LKB1-NUAK1

LKB1 est une master kinase activant les kinases de la famille de l'AMPK. Elle est impliquée dans de nombreux processus pour la régulation de la morphologie axonale comme la complexité dendritique (Kuwako and Okano, 2018) et la polarisation neuronale (Barnes et al., 2007; Kishi, 2005; Shelly et al., 2007a). Dans notre article nous nous sommes intéressés au rôle de la kinase LKB1 dans le branchement axonal. Il a précédemment été montré que LKB1 régule le branchement axonal par le biais de la kinase NUAK1 (de la famille de l'AMPK) et la régulation du trafic des mitochondries.

Les résultats présentés dans l'article montrent que dans les neurones WT, le BDNF induit une augmentation du nombre de branches axonales. En revanche, en absence de LKB1 ou NUAK1, on observe d'une part une diminution du nombre de branches et d'autre part que le BDNF n'induit pas d'augmentation du nombre de branches. Ces résultats nous ont permis de conclure que LKB1 et NUAK1 sont nécessaires pour le branchement axonal induit par le BDNF. L'augmentation du nombre de branches par le BDNF est cohérent avec la littérature (Cohen-Cory, 1999; Cohen-Cory and Fraser, 1995; Granseth et al., 2013; Jeanneteau et al., 2010), tout comme la nécessité de LKB1 et NUAK1 (Courchet et al., 2013).

En 2010, la publication de Jeanneteau et al., montre que dans les neurones corticaux de rats, le branchement par le BDNF est régulé par la kinase MKP-1. Cette étude a été réalisée dans les neurones corticaux de rats et aboutit à la régulation des microtubules par la kinase JNK. Deux hypothèses peuvent expliquer la différence de résultats, la première est que nous sommes dans deux organismes distincts il se pourrait donc que les mécanismes soient différents. La deuxième hypothèse est que le BDNF puisse réguler deux voies parallèles aboutissant à la formation de branches, l'une permettant la formation de branches par la régulation des mitochondries (LKB1/NUAK1), l'autre la déstabilisation des microtubules (MKP-1).

II- Mécanisme de phosphorylation du site S431

Les résultats de ma thèse présentés dans l'article mettent en évidence une signalisation de BDNF pour le branchement des neurones corticaux. L'utilisation d'inhibiteurs chimiques nous a permis d'identifier les kinases TrkB et ERK comme intermédiaires entre BDNF et LKB1. Par cette méthode, nous avons pu établir *in vitro*, une nouvelle signalisation, la voie BDNF/TrkB/ERK/LKB1/NUAK1.

Trois kinases phosphorylent LKB1 sur le site S431 ; la kinase p90^{RSK}, la kinase PKA ainsi que la kinase PKC. Dans un contexte de polarité neuronale, dans des neurones de l'hippocampe, BDNF induit la phosphorylation de LKB1 sur le site S431 par l'action de PKA (Shelly et al., 168

2007b). En revanche, dans un contexte de prolifération cancéreuse, c'est la kinase p90^{RSK} qui phosphoryle LKB1 sur le site S431 (Zheng et al., 2009). Étant donné que la kinase ERK active p90^{RSK} (Anjum and Blenis, 2008), notre hypothèse finale est que dans un contexte de branchement axonal, la fixation du BDNF sur son récepteur TrkB, induit l'activation de ERK qui lui-même active p90^{RSK} pour *in fine* phosphoryler le site S431 de LKB1 (**Figure 36**).

Un effecteur de LKB1 connu pour être impliqué dans le branchement terminal est NUAK1 (Courchet et al., 2013). Nous avons cherché à vérifier si sa phosphorylation était elle aussi induite dans les neurones corticaux suite à une exposition au BDNF.

En absence d'anticorps contre le site T212 phosphorylé de NUAK1, les précédentes publications utilisent la phosphorylation de MYPT1, cible de NUAK1, pour contrôler son activité (Monteverde et al., 2018). Ainsi, nous avons montré pour la première fois la phosphorylation de NUAK1 par LKB1 ainsi que sa dépendance à la présence de BDNF.

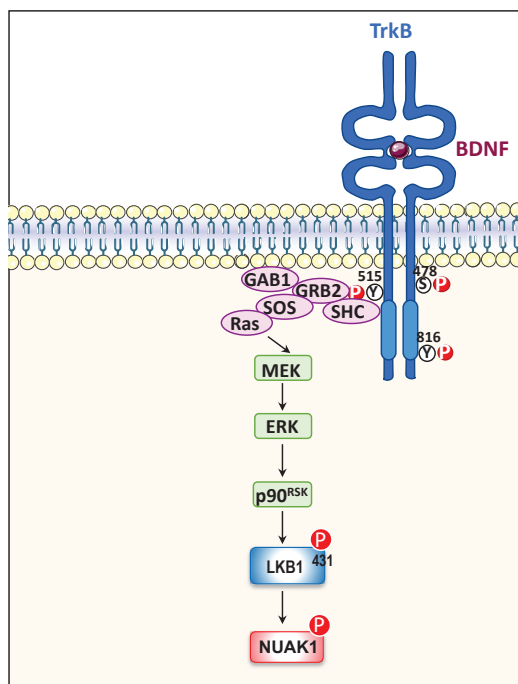


Figure 36 : Représentation schématique de la régulation de la phosphorylation de LKB1 sur le site S431.

La fixation du BDNF sur son récepteur entraîne l'autophosphorylation du site Y515 ce qui va permettre la liaison des protéines SHC/GRB2/SOS et RAS. Ceci permet l'activation de MEK et ERK qui phosphoryle p90^{RSK} pour *in fine* phosphoryler le site S431 et induire la phosphorylation de NUAK1

L'activation de p90^{RSK} pour la phosphorylation de LKB1 est induite par les facteurs EGF (Endothelial Growth Factor) et tPA (tissue Plasminogen Activator) alors que celle de PKA est dépendante de la forskoline et de BDNF (Sapkota et al., 2001; Shelly et al., 2007).

Ainsi, nos résultats montrant la dépendance de la phosphorylation du site S431 au BDNF par le biais de ERK ne corrèlent pas avec les résultats obtenus en 2007 par l'équipe de M-M. Poo. De façon à valider nos résultats, nous avons utilisé deux inhibiteurs différents pour PKA (KT5720 et H89) ce qui nous a permis de confirmer que PKA n'est pas la kinase intermédiaire pour la phosphorylation du site S431 par le BDNF.

Les différences observées peuvent être expliquées par deux hypothèses. La première est que l'étude de Shelly et al., en 2007 a été effectuée dans des neurones d'hippocampe chez le rat,

dans un contexte de polarité neuronale, mon projet quant-à lui s'est centré sur l'étape de formation de branches axonale des neurones corticaux de souris. La première hypothèse est donc que la signalisation diffère de façon tissu-spécifique, avec une signalisation BDNF-PKA-LKB1 dans les neurones d'hippocampe et une signalisation BDNF-ERK-LKB1 dans les neurones corticaux.

De plus, sachant que deux signalisations différentes pour LKB1 ont été démontrées entre la polarité et le branchement au cours du développement (Barnes et al., 2007; Courchet et al., 2013), il n'est pas étonnant de retrouver une différence dans la signalisation menant à la phosphorylation de LKB1. Ainsi, la deuxième hypothèse serait que la phosphorylation de LKB1 induite par le BDNF serait dépendante du stade de développement des neurones.

III- Quel est le rôle de la phosphorylation du site S431?

L'utilisation d'une stratégie de remplacement de gènes nous a permis de montrer que l'activité kinase de LKB1 est nécessaire pour le branchement mais aussi qu'un site de modification post-traductionnelle de LKB1, le site S431 est nécessaire pour le branchement.

Cependant, nous avons constaté que le remplacement de la kinase LKB1 WT par la kinase mutée S431A n'induit pas une perte totale du branchement mais uniquement une diminution partielle. La diminution partielle du branchement induite par la mutation S431A permet de poser l'hypothèse qu'un autre mécanisme est impliqué dans la régulation du branchement axonal. Quel pourrait-être ce mécanisme ? Une première réponse à cette question pourrait être apporté par le fait que nous avons montré que l'activité kinase de LKB1 est nécessaire au branchement indiquant ainsi qu'un autre mécanisme peut être mis en place mais qu'il passe tout de même par la kinase LKB1. La nécessité de la kinase LKB1 pour l'action du BDNF permet de poser l'hypothèse qu'un autre site de LKB1 pourrait être impliqué dans la régulation du branchement axonal des neurones corticaux.

Différents sites de phosphorylation de LKB1 ont été décrits dans la littérature. Deux de ces sites attirent mon attention pour notre hypothèse. Le premier, le site S325 a été montré comme étant phosphorylé lui-aussi par la kinase ERK (Zheng et al., 2009). La phosphorylation du site S325 induit un changement de l'interaction entre LKB1 et AMPK (Casimiro et al., 2017). Il serait tout d'abord intéressant de vérifier si la phosphorylation de ce site peut elle aussi être induite par le BDNF. Mais aussi de vérifier l'implication de ce site dans le branchement axonal, par exemple, par la stratégie de remplacement de gènes *in vitro* en utilisant un plasmide codant pour une protéine mutée sur le site S325. De plus, l'utilisation d'un double mutant S431A/S325A permettrait d'éliminer l'implication potentiel d'un autre site de phosphorylation.

Le 2^e site de phosphorylation de LKB1 qui pourrait être impliqué dans la régulation du branchement par le BDNF est le site S31. Ce site n'est pas impliqué dans l'activité catalytique de LKB1 et est peu caractérisé (Sapkota et al., 2002). Cependant, c'est un site consensus de phosphorylation par les AMPK-RK (Sapkota et al., 2002; Scott et al., 2002). Ce site pourrait donc être par exemple un site de rétrocontrôle par une AMPK-RK comme NUA1.

Les résultats obtenus dans notre article sur le site S431 ont fait émerger de nombreuses questions concernant le rôle de ce site S431 sur la protéine. Dans la littérature, le rôle de ce site est controversé. Différentes études n'attribuent aucun rôle spécifique à cette phosphorylation, pas d'effet sur l'activité de LKB1, ni sa localisation (Bright et al., 2008; Collins et al., 2000; Fogarty and Hardie, 2009; Houde et al., 2014). A l'inverse, des études montrent que le site S431 est important pour de nombreuses fonctions de LKB1 telles que la polarité épithéliale (Martin and St Johnston, 2003), le contrôle du cycle cellulaire (Sapkota et al., 2001) et la spécification de l'axone (Barnes et al., 2007; Shelly et al., 2007). De plus, certaines AMPK-RK comme AMPK ou SAD ne sont plus activées suite à une mutation de ce site (Barnes et al., 2007; Xie et al., 2006). Par ailleurs, en plus d'être nécessaire à la phosphorylation de ces AMPK-RK, la phosphorylation du site S431 est aussi impliquée dans l'interaction avec l'AMPK (Xie et al., 2008). Au vu, des résultats présentés dans l'article montrant que d'une part le site S431 est impliqué dans le branchement axonal et le trafic des mitochondries *in vitro* mais aussi pour le branchement terminal *in vivo*, il apparaît clair que ce site de modification post-traductionnelle possède un rôle important dans la régulation de la protéine.

Une hypothèse concernant le rôle de cette phosphorylation est que celle-ci est impliquée dans la localisation subcellulaire de cette protéine. En effet, plusieurs études appuient cette hypothèse et montrent que le site S431 régule la localisation d'autres protéine comme Par-3 chez la drosophile (Shen et al., 2014), mais aussi la localisation cytoplasmique de la protéine LKB1 en elle-même (Bernard and Zhang, 2015; Xie et al., 2008). Enfin, il a été montré par immunofluorescence que dans les neurones polarisés, la forme phosphorylée de LKB1 est enrichie dans l'axone après 5 jours de culture (Barnes et al., 2007). Cependant, ce résultat ne montre pas un changement de localisation mais seulement une localisation de la protéine phosphorylée. De plus, il n'est pas reproductible puisqu'à ce jour, l'anticorps ayant servi pour cette étude n'est plus disponible.

Afin d'en savoir plus sur la localisation (et les changements de localisation) de LKB1 phosphorylée sur le site S431, lors de ma thèse, nous avons mis en place un système de culture compartimentalisée avec une partie somato-dendritique et une partie axonale. Par la suite, nous souhaitons réaliser des cultures de neurones sur ce système et traité les différents compartiments avec du BDNF ou non afin de pouvoir observer la phosphorylation de LKB1 sur le site S431.

IV- Comment le BDNF régule le trafic et le métabolisme mitochondrial ?

Les résultats présentés dans l'article montrent que le BDNF induit une augmentation de la respiration maximale des mitochondries. Ce résultat a déjà été montré en 2004, plus précisément, il a été montré que le BDNF permet d'augmenter la respiration oxydative (Markham et al., 2004). Nos expériences ont permis de mieux comprendre ce mécanisme puisque nous avons montré que la régulation de la respiration mitochondriale par le BDNF est dépendante de la kinase NUAK1. De plus, nous avons pu montrer que la présence de LKB1 est nécessaire à l'augmentation du ratio ATP:ADP (souvent associé à une augmentation de la respiration) dans les neurones corticaux. Ainsi, nos résultats montrent que le BDNF régule le métabolisme mitochondrial par le biais de la voie LKB1/NUAK1.

Cependant, comme il a été montré que le complexe I est régulé par le BDNF pour l'augmentation de la respiration nous pouvons nous demander si la régulation de la respiration par BDNF et LKB1/NUAK1 passe aussi par la régulation de l'activité du complexe I. Dans les cellules cancéreuses, il a été montré que NUAK1 permet une augmentation de la production d'ATP (souvent associé au phénomène de respiration) (Escalona et al., 2020). Ainsi, dans la littérature nous avons d'une part le BDNF qui régule la respiration mitochondriale *via* le complexe I et d'autre part NUAK1 qui augmente la production d'ATP. L'hypothèse que nous pouvons émettre est que la régulation de l'activité du complexe I par le BDNF est permise par l'activité de NUAK1.

Récemment, il a été montré un rôle différentiel de NUAK1 en fonction de sa localisation intracellulaire dans les cellules cancéreuses. En effet, dans l'axone, NUAK1 augmente la production d'ATP par augmentation de l'activité de l'ATP synthase dans le cytoplasme. Alors que dans le noyau NUAK1 promeut la glycolyse (Escalona et al., 2020).

Compte tenu de nos résultats suggérant une régulation locale de LKB1 et NUAK1 par le BDNF pour le branchement et de l'hypothèse faite précédemment énonçant une régulation locale de phosphorylation du site S431, la démonstration d'un rôle différentiel de NUAK1 entre le corps cellulaire et l'axone pour la régulation du métabolisme est un appuis supplémentaire pour supporter cette hypothèse.

Bien que nous ayons pu montrer l'implication de BDNF et NUAK1 pour la régulation de la respiration oxydative, le lien direct avec LKB1 et le site S431 reste encore à démontrer. Afin de vérifier la spécificité de ce site pour la régulation du métabolisme mitochondrial par BDNF et NUAK1, des expériences similaires (mesure d'activité des différents complexe, ou encore Seahorse) devront être effectuées dans l'avenir sur des neurones mutants S431A.

L'utilisation de la sonde Perceval-HR nous a permis de montrer que le BDNF augmente le ratio ATP/ADP dans les neurones, nous avons pu observer que cette augmentation n'est pas globale

dans le neurone mais que cette augmentation est localisée en des endroits précis de l'axone et du corps cellulaire. A ce jour, nous n'avons pas pu déterminer si cette augmentation est corrélée avec la position des mitochondries, il serait donc intéressant de réaliser des expériences de co-electroporation *ex vivo* afin de corréliser la position des mitochondries et l'augmentation du ratio ATP:ADP afin d'appuyer l'effet mitochondrial du BDNF.

Une limite de cette expérience est la sensibilité de la sonde Perceval-HR au pH (Tantama et al., 2013). Ce biais pourrait être corrigé par l'utilisation d'une sonde pHmétrique : pH-Red (Tantama et al., 2011) nous permettant de corriger les changements de valeurs dus aux changements de pH. Dans la littérature, aucun papier ne montre un effet du BDNF sur le pH, la vérification des changements de pH potentiellement induit par le BDNF serait donc à effectuer comme contrôle.

Par ailleurs, nous montrons une diminution du trafic des mitochondries en présence de BDNF, ce résultat corrobore avec la littérature qui montre que le BDNF induit un arrêt du trafic des mitochondries après 15min de traitement dans les neurones de l'hippocampe (Su et al., 2014). Pour notre article, la mesure du trafic des mitochondries a été effectuée après 30min de traitement au BDNF. Nous avons choisis le temps de 30min, puisque la signalisation LKB1/NUAK1 induite par le BDNF atteint son maximal après 30min de traitement (article 1). La question que pose ce résultat est de comprendre comment le trafic des mitochondries est régulé par le BDNF. Sachant que la voie LKB1/NUAK1 régule le trafic des mitochondries, notre hypothèse est que le BDNF par sa régulation de LKB1 permet de réguler le trafic des mitochondries par le biais de l'activation de la kinase NUAK1. Si le BDNF régule le trafic des mitochondries grâce à cette voie, l'absence de ces protéines devrait bloquer l'effet du BDNF sur les mitochondries.

Récemment, l'équipe de G. Gallo a montré que la présence de neurotrophines comme NGF, NT-3 ou BDNF modifie la morphologie des mitochondries (Armijo-Weingart et al., 2019). En particulier, le BDNF induit une diminution de la taille des mitochondries et une augmentation de leur densité dans l'axone de neurones sensoriels (Armijo-Weingart et al., 2019). Au cours de ma thèse j'ai obtenu des résultats similaires, en effet, je montre une diminution de la taille des mitochondries en présence de BDNF, ainsi qu'une augmentation de la densité mitochondriale dans l'axone. Cependant j'ai approfondi ce résultat en montrant que l'augmentation de la densité mitochondriale en présence de BDNF dans les neurones WT n'est plus visible en absence de LKB1. L'absence de LKB1 n'a pas d'effet sur la longueur des mitochondries, en revanche, nous avons montré que la diminution de la longueur des mitochondries par le BDNF n'est pas observable en absence de LKB1.

Ainsi, j'ai pu approfondir les résultats précédemment concernant la régulation de la morphologie mitochondriale (Armijo-Weingart et al., 2019) en montrant que la kinase LKB1 est nécessaire dans le processus de régulation de la morphologie mitochondriale.

V- Régulation de l'équilibre ipsilatéral et contralatéral de la phosphorylation du site S431 de LKB1 sur le branchement axonal

Lors de ma thèse nous avons montré par des expériences d'électroporation *in vivo* qu'une perte de l'expression de LKB1 dans les neurones corticaux induit une diminution du branchement axonal ce qui corrèle avec une étude précédente de l'équipe (Courchet et al., 2013). L'absence de LKB1 dans les neurones corticaux induit un phénotype fort présentant trois phénomènes distincts : 1) une diminution du branchement ipsilatéral, 2) une diminution du branchement terminal et 3) une dispersion des axones du côté contralatéral du cortex. Par ailleurs, la surexpression de la protéine mutée LKB1 S431A en absence de LKB1 montre une restauration partielle du phénotype. Bien qu'un défaut de branchement terminal persiste dans cette condition, le branchement du côté ipsilatéral ainsi que la dispersion des axones du côté contralatéral sont restaurés. Ainsi, par ces travaux, nous avons mis en évidence le rôle du site S431 de LKB1 dans le branchement contralatéral.

La perte de branchement en contralatéral a été observé pour deux protéines étudiée lors de ma thèse la kinase NUA1 (Courchet et al., 2013) et le BDNF (Shimojo et al., 2015). Ainsi, le phénotype du mutant LKB1 S431A récapitule le branchement terminal induit par des diminutions d'expression de NUA1 et BDNF. Ces résultats nous ont permis de poser l'hypothèse selon laquelle le BDNF contrôlerait le branchement terminal *in vivo* par la régulation de LKB1 sur le site S431 et NUA1.

Dans la littérature, de nombreux articles mettent en avant le rôle de l'activité neuronale dans le branchement terminal (Fenlon et al., 2017; Mizuno et al., 2007, 2010; Suárez et al., 2014; Wang et al., 2007). La question se pose donc de savoir si le branchement terminal est régulé par l'activité neuronale ou les voies de signalisation. Sachant que le BDNF peut être sécrété en réponse à l'activité neuronale une cohabitation des deux n'est pas à exclure (Gartner and Staiger, 2002; Hartmann, 2001; Matsuda et al., 2009) et suggère l'hypothèse que le branchement terminal est régulé par le BDNF de façon activité-dépendante *in vivo*.

En outre, le fait que cette mutation n'affecte qu'une partie du neurone met en évidence une régulation différentielle du branchement axonal à l'intérieur d'un même neurone par la kinase LKB1, suggérant un rôle local et spécifique de la protéine.

Cependant, dans le cortex, les couches II/III sont composées de différents types de neurones de projection avec des projections intra-corticales ou inter-corticales (De León Reyes et al., 2020). Bien que permettant l'observation de multiples neurones, la technique d'électroporation *in vivo* ne permet pas de discriminer les populations de neurones électroporées. En effet, ces neurones peuvent être issus d'une même population de neurones inter-corticaux et former des branches du côté ipsilatéral et contralatéral ou encore, être issus

de deux populations de neurones distinctes : une population intra-corticale établissant des branchements uniquement en ipsilatéral et une population inter-corticale possédant seulement un branchement terminal (**Figure 37**). Dans ce dernier cas, nos résultats ne montrent pas un effet différentiel de la phosphorylation de la protéine LKB1 mais un effet cellule-dépendant. Pour mettre en évidence ces populations des expériences de d'électroporation cellule-unique (supernova) associées à des méthodes de transparasation de cerveaux pourraient être mises en place. Cela permettrait alors d'une part, d'observer des neurones uniques afin de distinguer les différentes population mais aussi de les observer dans leur environnement global afin d'améliorer mes résultats quant à la localisation des branches.

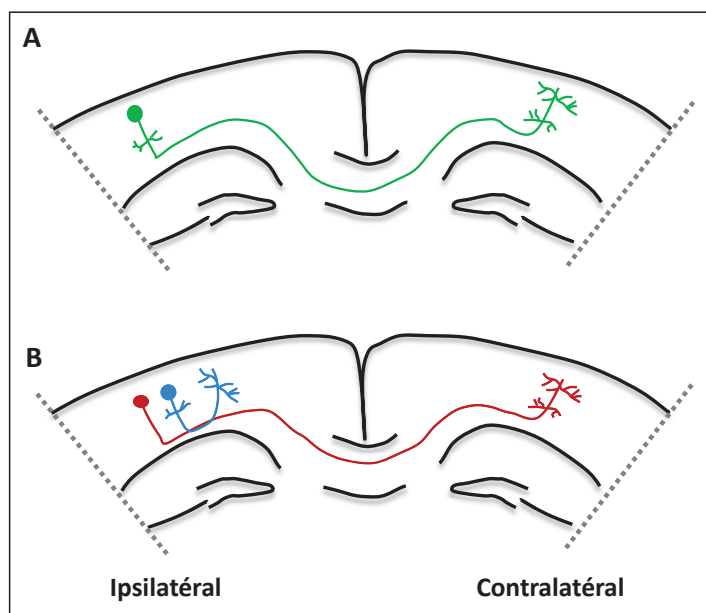


Figure 37 : Représentation schématique des deux hypothèses concernant les populations de neurones électroporés.

A- Hypothèse avec une seule population de neurone formant des branches collatérales en ipsilatéral et contralatéral.

B- Hypothèse présentant deux populations de neurones distinctes avec en bleu une population formant des branches du côté ipsilatéral et en rouge une population formant des branches du côté contralatéral.

VI- Quel est le lien entre les défauts de branchements terminaux et les défauts comportementaux des souris ?

Les derniers résultats de ma thèse ont été effectués dans des souris mutantes pour le site S431 de LKB1. Deux types de mutant ont été générés, d'une part des souris $LKB1^{F/S431A}$ et d'autre part des souris $LKB1^{S431A/S431A}$. L'utilisation de ces souris nous permet de ne pas surexprimer une protéine mutante qui pourrait induire des biais d'interprétation par la forte quantité de protéines surexprimées. Par ailleurs, les souris $LKB1^{S431A/S431A}$ nous ont permis de réaliser des tests de comportement ce qui est impossible avec la méthode d'électroporation qui présente une efficacité limitée sur le nombre de neurones touchés par l'électroporation. Ainsi, nous avons d'une part validé les résultats obtenus avec la surexpression de la protéine S431A mutée en montrant qu'une mutation du site S431A de LKB1 provoque un défaut de

branchement terminal *in vivo*. D'autre part, nous avons pu réaliser des expériences comportementales préliminaires qui montrent une diminution de la préférence pour la nouveauté sociale et de la mémoire spatiale dans les souris LKB1^{S431A/S431A}. Ainsi, ces résultats préliminaires montrent que le défaut de branchement observé *in vivo* induit des défauts de comportement social chez les souris. Cependant, le nombre d'animaux utilisés lors de ces expériences reste trop faible pour conclure à un réel impact de la mutation, des expériences supplémentaires devront donc être réalisées. Ces résultats préliminaires sont cependant concordants avec le phénotype comportemental des souris NUAK1^{+/-} publié en 2018 par l'équipe (Courchet et al., 2018) et nous permettent de poser l'hypothèse que le site S431 de LKB1 permet une régulation de NUAK1 pour le branchement terminal complet.

Les défauts comportementaux observés chez les souris LKB1^{S431A/S431A} sont compatibles avec des maladies neuro-développementales de type trouble du spectre autistique (ASD) ou schizophrénie. Cependant, les défauts de sociabilité sont communs (comme bien d'autres) aux deux pathologies : la schizophrénie et les ASD (St Pourcain et al., 2018), il est ainsi difficile de lier directement les défauts de comportements sociaux observés chez les souris LKB1^{S431A/S431A} avec une pathologie précise. Cependant, il a été démontré que les connexions à longues distances (comme les connexions inter-hémisphériques) sont diminuées dans les modèles d'ASD (Geschwind and Levitt, 2007) nous permettant ainsi de suggérer que les défauts de comportements sociaux observés seraient associés à des troubles du spectre autistique.

Enfin, une étude de Fernandez et al., (2019) montre que des altérations du métabolisme mitochondrial sont associées à des défauts de connectivité et de comportement *in vivo* (Fernandez et al., 2019). Nos résultats montrent une perte de la régulation de la respiration mitochondriale par le BDNF en absence de NUAK1. Ce qui suggère une régulation des mitochondries par NUAK1. Les souris NUAK1^{+/-} présentent un défaut de branchement terminal et une altération du comportement. De plus, les souris LKB1 mutantes sur le site S431 présente les mêmes défauts que les souris NUAK1 ^{+/-} au niveau du branchement terminal et du comportement. L'ensemble de ces données nous permet de poser l'hypothèse que le BDNF permet une régulation de la connectivité et du métabolisme mitochondrial par le biais du site S431 de LKB1 et NUAK1 et que les défauts de comportements observés sont une conséquence d'une dérégulation du métabolisme mitochondrial.

Pour confirmer cela, il faudrait d'une part associer les défauts de branchement terminal observés à des défauts de fonctions mitochondriales, et d'autre part associer la mutation S431A à la régulation de la kinase NUAK1.

VII- Conclusion

Nous avons montré que la régulation du branchement axonal est permise par la régulation des kinases LKB1 et NUAK1 par le BDNF. Par ailleurs, nous avons mis en évidence que la régulation du trafic et du métabolisme des mitochondries par le BDNF est dépendante des kinases LKB1 et NUAK1. En outre, nous avons pu démontrer un rôle spécifique du site S431 de la kinase LKB1. En effet, nous avons montré que ce site S431 est nécessaire au branchement axonal et au trafic des mitochondries. De plus, nous avons montré que le BDNF induit la phosphorylation du site S431 par l'intermédiaire de la MAP kinase ERK.

Enfin, l'utilisation de la stratégie de remplacement de gènes et de souris mutantes sur le site S431 nous a permis de démontrer que le site S431 de LKB1 régule l'équilibre entre les branchements ipsilatéral et contralatéral des neurones pyramidaux du cortex.

Enfin, nous avons pu à l'aide de tests de comportement établir un lien entre des défauts de branchement terminal et des défauts comportementaux.

Dans l'ensemble mes travaux ont apporté une meilleure compréhension du mécanisme de formation des branches collatérales au cours du développement embryonnaire notamment, par la mise en relation d'effecteurs régulant ce processus. En effet, les travaux de ma thèse ont mis en évidence l'identification de messagers tels que LKB1 et NUAK1 comme relais intracellulaires du BDNF pour la régulation du branchement neuronal par le métabolisme des mitochondries.

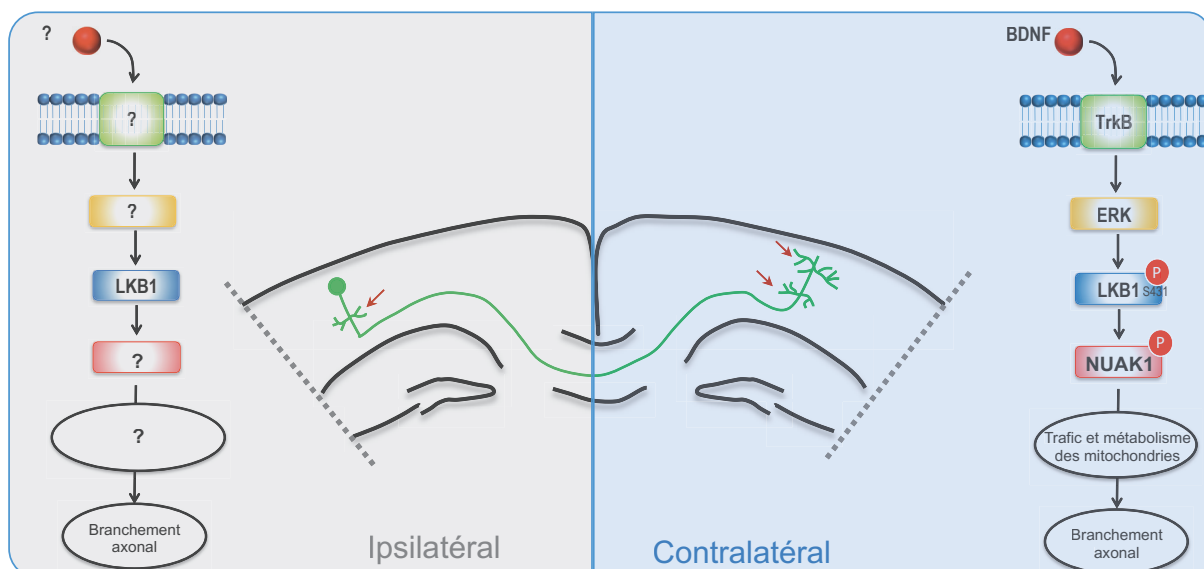


Figure 38 : Schéma bilan de la régulation du branchement contralatéral des neurones corticaux des couches II/III.

Le branchement axonal des neurones corticaux est régulé en ipsilatéral et contralatéral par la kinase LKB1. Au cours de ma thèse j'ai mis en évidence des mécanismes de régulation du branchement contralatéral des neurones corticaux. La phosphorylation de LKB1 sur le site S431 est nécessaire et induite par la fixation du BDNF sur son récepteur. La voie LKB1/NUAK1 régule le trafic et le métabolisme des mitochondries pour permettre la formation des branches terminales.

RÉFÉRENCES

RÉFÉRENCES

A

Acebes, A., and Ferrús, A. (2000). Cellular and molecular features of axon collaterals and dendrites. *Trends Neurosci.* *23*, 557–565.

Ahmadian, M., Abbott, M.J., Tang, T., Hudak, C.S.S., Kim, Y., Bruss, M., Hellerstein, M.K., Lee, H.-Y., Samuel, V.T., Shulman, G.I., et al. (2011). Desnutrin/ATGL Is Regulated by AMPK and Is Required for a Brown Adipose Phenotype. *Cell Metab.* *13*, 739–748.

Ahnert-Hilger, G., Höltje, M., Große, G., Pickert, G., Mucke, C., Nixdorf-Bergweiler, B., Boquet, P., Hofmann, F., and Just, I. (2004). Differential effects of Rho GTPases on axonal and dendritic development in hippocampal neurones. *J. Neurochem.* *90*, 9–18.

Aid, T., Kazantseva, A., Piirsoo, M., Palm, K., and Timmusk, T. (2007). Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *J. Neurosci. Res.* *85*, 525–535.

Albertinazzi, C., Gilardelli, D., Paris, S., Longhi, R., and de Curtis, I. (1998). Overexpression of a Neural-specific Rho Family GTPase, cRac1B, Selectively Induces Enhanced Neuritogenesis and Neurite Branching in Primary Neurons. *J. Cell Biol.* *142*, 815–825.

Alessi, D.R., Sakamoto, K., and Bayascas, J.R. (2006). LKB1-Dependent Signaling Pathways. *Annu. Rev. Biochem.* *75*, 137–163.

Al-Hakim, A.K. (2005). 14-3-3 cooperates with LKB1 to regulate the activity and localization of QSK and SIK. *J. Cell Sci.* *118*, 5661–5673.

Allen, S.J., Watson, J.J., Shoemark, D.K., Barua, N.U., and Patel, N.K. (2013). GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol. Ther.* *138*, 155–175.

Alzu'bi, A., Lindsay, S., Kerwin, J., Looi, S.J., Khalil, F., and Clowry, G.J. (2017a). Distinct cortical and sub-cortical neurogenic domains for GABAergic interneuron precursor transcription factors NKX2.1, OLIG2 and COUP-TFII in early fetal human telencephalon. *Brain Struct. Funct.* *222*, 2309–2328.

Alzu'bi, A., Lindsay, S.J., Harkin, L.F., McIntyre, J., Lisgo, S.N., and Clowry, G.J. (2017b). The Transcription Factors COUP-TFI and COUP-TFII have Distinct Roles in Arealisation and GABAergic Interneuron Specification in the Early Human Fetal Telencephalon. *Cereb. Cortex* *27*, 4971–4987.

Amaral, M.D., and Pozzo-Miller, L. (2007). TRPC3 Channels Are Necessary for Brain-Derived Neurotrophic Factor to Activate a Nonselective Cationic Current and to Induce Dendritic Spine Formation. *J. Neurosci.* *27*, 5179–5189.

An, J.J., Gharami, K., Liao, G.-Y., Woo, N.H., Lau, A.G., Vanevski, F., Torre, E.R., Jones, K.R., Feng, Y., Lu, B., et al. (2008). Distinct Role of Long 3' UTR BDNF mRNA in Spine Morphology and Synaptic Plasticity in Hippocampal Neurons. *Cell* *134*, 175–187.

de Anda, F.C., Pollarolo, G., Da Silva, J.S., Camoletto, P.G., Feiguin, F., and Dotti, C.G. (2005). Centrosome localization determines neuronal polarity. *Nature* *436*, 704–708.

de Anda, F.C., 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.

Andersen, E.F., Asuri, N.S., and Halloran, M.C. (2011). In vivo imaging of cell behaviors and F-actin reveals LIM-HD transcription factor regulation of peripheral versus central sensory axon development. *Neural Develop.* *6*, 27.

Anjum, R., and Blenis, J. (2008). The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 747–758.

Aretz, S., Stienen, D., Uhlhaas, S., Loff, S., Back, W., Pagenstecher, C., McLeod, D.R., Graham, G.E., Mangold, E., Santer, R., et al. (2005). High proportion of large genomic STK11 deletions in Peutz-Jeghers syndrome. *Hum. Mutat.* *26*, 513–519.

Arimura, N., Kimura, T., Nakamuta, S., Taya, S., Funahashi, Y., Hattori, A., Shimada, A., Ménager, C., Kawabata, S., Fujii, K., et al. (2009). Anterograde Transport of TrkB in Axons Is Mediated by Direct Interaction with Slp1 and Rab27. *Dev. Cell* *16*, 675–686.

Armijo-Weingart, L., and Gallo, G. (2017). It takes a village to raise a branch: Cellular mechanisms of the initiation of axon collateral branches. *Mol. Cell. Neurosci.* *84*, 36–47.

Armijo-Weingart, L., Ketschek, A., Sainath, R., Pacheco, A., Smith, G.M., and Gallo, G. (2019). Neurotrophins induce fission of mitochondria along embryonic sensory axons. *ELife* *8*, e49494.

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.

Ashrafi, G., Schlehe, J.S., LaVoie, M.J., and Schwarz, T.L. (2014). Mitophagy of damaged mitochondria occurs locally in distal neuronal axons and requires PINK1 and Parkin. *J. Cell Biol.* *206*, 655–670.

Attwell, D., and Laughlin, S.B. (2001). An Energy Budget for Signaling in the Grey Matter of the Brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *21*, 1133–1145.

B

- Baas, P.W., and Qiang, L. (2019). Tau: It's Not What You Think. *Trends Cell Biol.* 29, 452–461.
- Baas, P.W., Deitch, J.S., Black, M.M., and Banker, G.A. (1988). Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 8335–8339.
- Bai, B., Man, A.W.C., Yang, K., Guo, Y., Xu, C., Tse, H.-F., Han, W., Bloksgaard, M., De Mey, J.G.R., Vanhoutte, P.M., et al. (2016). Endothelial SIRT1 prevents adverse arterial remodeling by facilitating HERC2-mediated degradation of acetylated LKB1. *Oncotarget* 7, 39065–39081.
- Bai, Y., Zhou, T., Fu, H., Sun, H., and Huang, B. (2012). 14-3-3 Interacts with LKB1 via recognizing phosphorylated threonine 336 residue and suppresses LKB1 kinase function. *FEBS Lett.* 586, 1111–1119.
- Baj, G., Leone, E., Chao, M.V., and Tongiorgi, E. (2011). Spatial segregation of BDNF transcripts enables BDNF to differentially shape distinct dendritic compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 16813–16818.
- Bamji, S.X., Majdan, M., Pozniak, C.D., Belliveau, D.J., Aloyz, R., Kohn, J., Causing, C.G., and Miller, F.D. (1998). The p75 Neurotrophin Receptor Mediates Neuronal Apoptosis and Is Essential for Naturally Occurring Sympathetic Neuron Death. *J. Cell Biol.* 140, 911–923.
- Bando, H., Atsumi, T., Nishio, T., Niwa, H., Mishima, S., Shimizu, C., Yoshioka, N., Bucala, R., and Koike, T. (2005). Phosphorylation of the 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose 2,6-Bisphosphatase/PFKFB3 Family of Glycolytic Regulators in Human Cancer. *Clin. Cancer Res.* 11, 5784–5792.
- Banfield, M.J., Naylor, R.L., Robertson, A.G.S., Allen, S.J., Dawbarn, D., and Brady, R.L. (2001). Specificity in Trk Receptor:Neurotrophin Interactions: The Crystal Structure of TrkB-d5 in Complex with Neurotrophin-4/5. *Structure* 9, 1191–1199.
- Barde, Y.A., Edgar, D., and Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1, 549–553.
- 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.
- Barnes, A.P., and Polleux, F. (2009). Establishment of Axon-Dendrite Polarity in Developing Neurons. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 347–381.
- 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.

von Bartheld, C.S., Byers, M.R., Williams, R., and Bothwell, M. (1996). Anterograde transport of neurotrophins and axodendritic transfer in the developing visual system. *Nature* 379, 830–833.

Bassell, G.J., Zhang, H., Byrd, A.L., Femino, A.M., Singer, R.H., Taneja, K.L., Lifshitz, L.M., Herman, I.M., and Kosik, K.S. (1988). Sorting of Actin mRNA and Protein to Neurites and Growth Cones in Culture. *J. Neurosci.* 251–265.

Bear, J.E., and Gertler, F.B. (2009). Ena/VASP: towards resolving a pointed controversy at the barbed end. *J. Cell Sci.* 122, 1947–1953.

Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J.-L., Tyzio, R., and Khazipov, R. (2007). GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol. Rev.* 87, 1215–1284.

Bennison, S.A., Blazejewski, S.M., Smith, T.H., and Toyo-oka, K. (2020). Protein kinases: master regulators of neuritogenesis and therapeutic targets for axon regeneration. *Cell. Mol. Life Sci.* 77, 1511–1530.

Bernard, L.P., and Zhang, H. (2015). MARK/Par1 Kinase Is Activated Downstream of NMDA Receptors through a PKA-Dependent Mechanism. *PLOS ONE* 11.

Bettencourt-Dias, M., Giet, R., Sinka, R., Mazumdar, A., Lock, W.G., Balloux, F., Zafiropoulos, P.J., Yamaguchi, S., Winter, S., Carthew, R.W., et al. (2004). Genome-wide survey of protein kinases required for cell cycle progression. *Nature* 432, 980–987.

Biernat, J., Wu, Y.-Z., Timm, T., Zheng-Fischhöfer, Q., Mandelkow, E., Meijer, L., and Mandelkow, E.-M. (2002). Protein Kinase MARK/PAR-1 Is Required for Neurite Outgrowth and Establishment of Neuronal Polarity. *Mol. Biol. Cell* 13, 4013–4028.

Biffo, S., Offenhäuser, N., Carter, B.D., and Barde, Y.-A. (1995). Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development. *Development* 121, 2461–2470.

Bilimoria, P.M., de la Torre-Ubieta, L., Ikeuchi, Y., Becker, E.B.E., Reiner, O., and Bonni, A. (2010). A JIP3-Regulated GSK3 /DCX Signaling Pathway Restricts Axon Branching. *J. Neurosci.* 30, 16766–16776.

Billups, B., and Forsythe, I.D. (2002). Presynaptic Mitochondrial Calcium Sequestration Influences Transmission at Mammalian Central Synapses. *J. Neurosci.* 22, 5840–5847.

Binzegger, T. (2004). A Quantitative Map of the Circuit of Cat Primary Visual Cortex. *J. Neurosci.* 24, 8441–8453.

Bock, F.J., and Tait, S.W.G. (2020). Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 85–100.

Bonnard, C., Navaratnam, N., Ghosh, K., Chan, P.W., Tan, T.T., Pomp, O., Ng, A.Y.J., Tohari, S., Changede, R., Carling, D., et al. (2020). A loss-of-function NUA2 mutation in humans causes anencephaly due to impaired Hippo-YAP signaling. *J. Exp. Med.* 217, e20191561.

- Bony, G., Szczurkowska, J., Tamagno, I., Shelly, M., Contestabile, A., and Cancedda, L. (2013). Non-hyperpolarizing GABAB receptor activation regulates neuronal migration and neurite growth and specification by cAMP/LKB1. *Nat. Commun.* 4.
- Boudeau, J., Baas, A.F., Deak, M., Schutkowski, M., Prescott, A.R., Clevers, H., and Alessi, D.R. (2003). MO25 / interact with STRAD / enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm. *EMBO J.* 22, 5102–5114.
- Bouquet, C. (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.
- Bowman, A.B., Kamal, A., Ritchings, B.W., Philp, A.V., McGrail, M., Gindhart, J.G., and Goldstein, L.S.B. (2000). Kinesin-Dependent Axonal Transport Is Mediated by the Sunday Driver (SYD) Protein. *Cell* 103, 583–594.
- Bradke, F., and Dotti, C.G. (1999). The Role of Local Actin Instability in Axon Formation. *Science* 283, 1931–1934.
- Brigadski, T., Hartmann, M., and Lessmann, V. (2005). Differential Vesicular Targeting and Time Course of Synaptic Secretion of the Mammalian Neurotrophins. *J. Neurosci.* 25, 7601–7614.
- Bright, N.J., Carling, D., and Thornton, C. (2008). Investigating the Regulation of Brain-specific Kinases 1 and 2 by Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 283, 14946–14954.
- Bright, N.J., Thornton, C., and Carling, D. (2009). The regulation and function of mammalian AMPK-related kinases. *Acta Physiol.* 196, 15–26.
- Brosig, A., Fuchs, J., Ipek, F., Kroon, C., Schrötter, S., Vadhvani, M., Polyzou, A., Ledderose, J., van Diepen, M., Holzhütter, H.-G., et al. (2019). The Axonal Membrane Protein PRG2 Inhibits PTEN and Directs Growth to Branches. *Cell Rep.* 29, 2028-2040.e8.
- Bultot, L., Guigas, B., Von Wilamowitz-Moellendorff, A., Maisin, L., Vertommen, D., Hussain, N., Beullens, M., Guinovart, J.J., Foretz, M., Viollet, B., et al. (2012). AMP-activated protein kinase phosphorylates and inactivates liver glycogen synthase. *Biochem. J.* 443, 193–203.
- Bureau, I., von Saint Paul, F., and Svoboda, K. (2006). Interdigitated Paralemniscal and Lemniscal Pathways in the Mouse Barrel Cortex. *PLoS Biol.* 4, e382.
- Burkhalter, J., Fiumelli, H., Allaman, I., Chatton, J.-Y., and Martin, J.-L. (2003). Brain-Derived Neurotrophic Factor Stimulates Energy Metabolism in Developing Cortical Neurons. *J. Neurosci.* 23, 8212–8220.

C

- Cai, Q., and Sheng, Z.-H. (2009). Mitochondrial transport and docking in axons. *Exp. Neurol.* *218*, 257–267.
- Cai, Q., Gerwin, C., and Sheng, Z.-H. (2005). Syntabulin-mediated anterograde transport of mitochondria along neuronal processes. *J. Cell Biol.* *170*, 959–969.
- Carim-Todd, L., Bath, K.G., Fulgenzi, G., Yanpallewar, S., Jing, D., Barrick, C.A., Becker, J., Buckley, H., Dorsey, S.G., Lee, F.S., et al. (2009). Endogenous Truncated TrkB.T1 Receptor Regulates Neuronal Complexity and TrkB Kinase Receptor Function In Vivo. *J. Neurosci.* *29*, 678–685.
- Carretero, J., Shimamura, T., Rikova, K., Jackson, A.L., Wilkerson, M.D., Borgman, C.L., Buttarazzi, M.S., Sanofsky, B.A., McNamara, K.L., Brandstetter, K.A., et al. (2010). Integrative Genomic and Proteomic Analyses Identify Targets for Lkb1-Deficient Metastatic Lung Tumors. *Cancer Cell* *17*, 547–559.
- Casimiro, M.C., Di Sante, G., Di Rocco, A., Loro, E., Pupo, C., Pestell, T.G., Bisetto, S., Velasco-Velázquez, M.A., Jiao, X., Li, Z., et al. (2017). Cyclin D1 Restrains Oncogene-Induced Autophagy by Regulating the AMPK–LKB1 Signaling Axis. *Cancer Res.* *77*, 3391–3405.
- Caviness, V.S., Takahashi, T., and Nowakowski, R.S. (1995). Numbers, time and neocortical neuronogenesis: a general developmental and evolutionary model. *Trends Neurosci.* *18*, 379–383.
- Chada, S.R., and Hollenbeck, P.J. (2004). Nerve Growth Factor Signaling Regulates Motility and Docking of Axonal Mitochondria. *Curr. Biol.* *14*, 1272–1276.
- Chang, D.T.W., and Reynolds, I.J. (2006). Mitochondrial trafficking and morphology in healthy and injured neurons. *Prog. Neurobiol.* *80*, 241–268.
- Chang, L., Jones, Y., Ellisman, M.H., Goldstein, L.S.B., and Karin, M. (2003). JNK1 Is Required for Maintenance of Neuronal Microtubules and Controls Phosphorylation of Microtubule-Associated Proteins. *Dev. Cell* *4*, 521–533.
- Chao, M.V. (1994). The p75 neurotrophin receptor. *J. Neurobiol.* *25*, 1373–1385.
- Chao, M.V. (2003). Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 299–309.
- Chavez, J.A., Roach, W.G., Keller, S.R., Lane, W.S., and Lienhard, G.E. (2008). Inhibition of GLUT4 Translocation by Tbc1d1, a Rab GTPase-activating Protein Abundant in Skeletal Muscle, Is Partially Relieved by AMP-activated Protein Kinase Activation. *J. Biol. Chem.* *283*, 9187–9195.

- Chen, G., Sima, J., Jin, M., Wang, K., Xue, X., Zheng, W., Ding, Y., and Yuan, X. (2008). Semaphorin-3A guides radial migration of cortical neurons during development. *Nat. Neurosci.* *11*, 36–44.
- Chen, S., Zhu, J., Li, P., Xia, Z., Tu, M., Lin, Z., Xu, B., and Fu, X. (2020). 3'UTRs Regulate Mouse Ntrk2 mRNA Distribution in Cortical Neurons. *J. Mol. Neurosci.*
- Chen, Y.M., Wang, Q.J., Hu, H.S., Yu, P.C., Zhu, J., Drewes, G., Piwnica-Worms, H., and Luo, Z.G. (2006). Microtubule affinity-regulating kinase 2 functions downstream of the PAR-3/PAR-6/atypical PKC complex in regulating hippocampal neuronal polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 8534–8539.
- Cheng, X., and Sheng, Z. (2020). Developmental regulation of microtubule-based trafficking and anchoring of axonal mitochondria in health and diseases. *Dev. Neurobiol.* dneu.22748.
- Cheng, A., Wan, R., Yang, J.-L., Kamimura, N., Son, T.G., Ouyang, X., Luo, Y., Okun, E., and Mattson, M.P. (2012). Involvement of PGC-1 α in the formation and maintenance of neuronal dendritic spines. *Nat. Commun.* *3*, 1250.
- Cheng, P., Lu, H., Shelly, M., Gao, H., and Poo, M. (2011a). Phosphorylation of E3 Ligase Smurf1 Switches Its Substrate Preference in Support of Axon Development. *Neuron* *69*, 231–243.
- Cheng, P.-L., Song, A.-H., Wong, Y.-H., Wang, S., Zhang, X., and Poo, M.-M. (2011b). Self-amplifying autocrine actions of BDNF in axon development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 18430–18435.
- Cheng, P.-L., Song, A.-H., Wong, Y.-H., Wang, S., Zhang, X., and Poo, M.-M. (2011c). Self-amplifying autocrine actions of BDNF in axon development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 18430–18435.
- Chiang, L., Ngo, J., Schechter, J.E., Karvar, S., Tolmachova, T., Seabra, M.C., Hume, A.N., and Hamm-Alvarez, S.F. (2011). Rab27b regulates exocytosis of secretory vesicles in acinar epithelial cells from the lacrimal gland. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* *301*, C507–C521.
- Chiaruttini, C., Vicario, A., Li, Z., Baj, G., Braiuca, P., Wu, Y., Lee, F.S., Gardossi, L., Baraban, J.M., and Tongiorgi, E. (2009). Dendritic trafficking of BDNF mRNA is mediated by translin and blocked by the G196A (Val66Met) mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 16481–16486.
- Ciani, L., and Salinas, P.C. (2005). WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nat. Rev. Neurosci.* *6*, 351–362.
- Cioni, J.-M., Koppers, M., and Holt, C.E. (2018). Molecular control of local translation in axon development and maintenance. *Curr. Opin. Neurobiol.* *51*, 86–94.
- Cohen, D., Brennwald, P.J., Rodriguez-Boulan, E., and Müsch, A. (2004). Mammalian PAR-1 determines epithelial lumen polarity by organizing the microtubule cytoskeleton. *J. Cell Biol.* *164*, 717–727.

Cohen, M.S., Orth, C.B., Kim, H.J., Jeon, N.L., and Jaffrey, S.R. (2011). Neurotrophin-mediated dendrite-to-nucleus signaling revealed by microfluidic compartmentalization of dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 11246–11251.

Cohen-Cory, S. (1999). BDNF modulates, but does not mediate, activity-dependent branching and remodeling of optic axon arbors in vivo. *J. Neurosci.* *19*, 9996–10003.

Cohen-Cory, S., and Fraser, S.E. (1995). Effects of brain-derived neurotrophic factor on optic axon branching and remodeling in vivo. *Nature* *378*, 192–196.

Coles, C.H., and Bradke, F. (2015). Coordinating Neuronal Actin–Microtubule Dynamics. *Curr. Biol.* *25*, R677–R691.

Collins, S.P., Reoma, J.L., Gamm, D.M., and Uhler, M.D. (2000). LKB1, a novel serine/threonine protein kinase and potential tumour suppressor, is phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase (PKA) and prenylated in vivo. *Biochem. J.* *345*, 673–680.

Conde, C., and Cáceres, A. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat. Rev. Neurosci.* *10*, 319–332.

Conde, C., Arias, C., Robin, M., Li, A., Saito, M., Chuang, J.Z., Nairn, A.C., Sung, C.H., and Cáceres, A. (2010). Evidence for the Involvement of Lfc and Tctex-1 in Axon Formation. *J. Neurosci.* *30*, 6793–6800.

Contreras, C.M., Akbay, E.A., Gallardo, T.D., Haynie, J.M., Sharma, S., Tagao, O., Bardeesy, N., Takahashi, M., Settleman, J., Wong, K.-K., et al. (2010). Lkb1 inactivation is sufficient to drive endometrial cancers that are aggressive yet highly responsive to mTOR inhibitor monotherapy. *Dis. Model. Mech.* *3*, 181–193.

Cosker, K.E., and Segal, R.A. (2014). Neuronal Signaling through Endocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *6*.

Cossa, G., Roeschert, I., Prinz, F., Baluapuri, A., Silveira Vidal, R., Schüle-Völk, C., Chang, Y.-C., Ade, C.P., Mastrobuoni, G., Girard, C., et al. (2020). Localized Inhibition of Protein Phosphatase 1 by NUA1 Promotes Spliceosome Activity and Reveals a MYC-Sensitive Feedback Control of Transcription. *Mol. Cell* *77*, 1322-1339.e11.

Coulson, E.J., Reid, K., and Bartlett, P.F. (1999). Signaling of neuronal cell death by the p75NTR neurotrophin receptor. *Mol. Neurobiol.* *20*, 29–44.

Coulson, E.J., Reid, K., Baca, M., Shipham, K.A., Hulett, S.M., Kilpatrick, T.J., and Bartlett, P.F. (2000). Chopper, a new death domain of the p75 neurotrophin receptor that mediates rapid neuronal cell death. *J. Biol. Chem.* *275*, 30537–30545.

Courchesne, E., and Pierce, K. (2005). Why the frontal cortex in autism might be talking only to itself: local over-connectivity but long-distance disconnection. *Curr. Opin. Neurobiol.* *15*, 225–230.

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.

Courchet, V., Roberts, A.J., Meyer-Dilhet, G., Del Carmine, P., Lewis, T.L., Polleux, F., and Courchet, J. (2018). Haploinsufficiency of autism spectrum disorder candidate gene NUAK1 impairs cortical development and behavior in mice. *Nat. Commun.* 9, 4289.

D

Da Silva, J.S., Medina, M., Zuliani, C., Di Nardo, A., Witke, W., and Dotti, C.G. (2003). RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability. *J. Cell Biol.* 162, 1267–1279.

Dahmani, R., Just, P.-A., Delay, A., Canal, F., Finzi, L., Prip-Buus, C., Lambert, M., Sujobert, P., Buchet-Poyau, K., Miller, E., et al. (2015). A novel LKB1 isoform enhances AMPK metabolic activity and displays oncogenic properties. *Oncogene* 34, 2337–2346.

De León Reyes, N.S., Bragg-Gonzalo, L., and Nieto, M. (2020). Development and plasticity of the corpus callosum. *Development* 147, dev189738.

Delandre, C., Amikura, R., and Moore, A.W. (2016). Microtubule nucleation and organization in dendrites. *Cell Cycle* 15, 1685–1692.

Denison, F.C., Hiscock, N.J., Carling, D., and Woods, A. (2009). Characterization of an Alternative Splice Variant of LKB1. *J. Biol. Chem.* 284, 67–76.

Dent, Erik.W., Barnes, A.M., Fangjun Tang, and Kalil, K. (2004). Netrin-1 and Semaphorin 3A Promote or Inhibit Cortical Axon Branching, Respectively, by Reorganization of the Cytoskeleton. *J. Neurosci.* 24, 3002–3012.

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., Kwiatkowski, A.V., Mebane, L.M., Philippar, U., Barzik, M., Rubinson, D.A., Gupton, S., Van Veen, J.E., Furman, C., Zhang, J., et al. (2007). Filopodia are required for cortical neurite initiation. *Nat. Cell Biol.* 9, 1347–1359.

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, a001800–a001800.

Dhanasekaran, D.N., and Reddy, E.P. (2008). JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 27, 6245–6251.

Dieni, S., Matsumoto, T., Dekkers, M., Rauskolb, S., Ionescu, M.S., Deogracias, R., Gundelfinger, E.D., Kojima, M., Nestel, S., Frotscher, M., et al. (2012). BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *J. Cell Biol.* *196*, 775–788.

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.

Dorfman, J., and Macara, I.G. (2008). STRADalpha Regulates LKB1 Localization by Blocking Access to Importin-alpha and by Association with Crm1 and Exportin-7. *Mol. Biol. Cell* *19*, 13.

Dotti, C.G., and Banker, G.A. (1987). Experimentally induced alteration in the polarity of developing neurons. *Nature* *330*, 254–256.

Dotti, C., Sullivan, C., and Banker, G. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* *8*, 1454–1468.

Drewes, G., Ebner, A., Preuss, U., Mandelkow, E.-M., and Mandelkow, E. (1997). MARK, a Novel Family of Protein Kinases That Phosphorylate Microtubule-Associated Proteins and Trigger Microtubule Disruption. *Cell* *89*, 297–308.

Drinjakovic, J., Jung, H., Campbell, D.S., Strohlic, L., Dwivedy, A., and Holt, C.E. (2010). E3 Ligase Nedd4 Promotes Axon Branching by Downregulating PTEN. *Neuron* *65*, 341–357.

Duhr, F., Déléris, P., Raynaud, F., Séveno, M., Morisset-Lopez, S., Mannoury la Cour, C., Millan, M.J., Bockert, J., Marin, P., and Chaumont-Dubel, S. (2014). Cdk5 induces constitutive activation of 5-HT₆ receptors to promote neurite growth. *Nat. Chem. Biol.* *10*, 590–597.

Dwivedy, A., Gertler, F.B., Miller, J., Holt, C.E., and Lebrand, C. (2007). Ena/VASP function in retinal axons is required for terminal arborization but not pathway navigation. *Development* *134*, 2137–2146.

E

Edelmann, E., Leßmann, V., and Brigadski, T. (2014). Pre- and postsynaptic twists in BDNF secretion and action in synaptic plasticity. *Neuropharmacology* *76*, 610–627.

Efimov, A., Kharitonov, A., Efimova, N., Loncarek, J., Miller, P.M., Andreyeva, N., Gleeson, P., Galjart, N., Maia, A.R.R., McLeod, I.X., et al. (2007). Asymmetric CLASP-Dependent Nucleation of Noncentrosomal Microtubules at the trans-Golgi Network. *Dev. Cell* *12*, 917–930.

Eguchi, S., Oshiro, N., Miyamoto, T., Yoshino, K., Okamoto, S., Ono, T., Kikkawa, U., and Yonezawa, K. (2009). AMP-activated protein kinase phosphorylates glutamine : fructose-6-phosphate amidotransferase 1 at Ser243 to modulate its enzymatic activity. *Genes Cells* *14*, 179–189.

Eide, F.F., Vining, E.R., Eide, B.L., Zang, K., Wang, X.-Y., and Reichardt, L.F. (1996). Naturally Occurring Truncated trkB Receptors Have Dominant Inhibitory Effects on Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling. *J. Neurosci.* *16*, 3123–3129.

Escalona, E., Muñoz, M., Pincheira, R., Elorza, Á.A., and Castro, A.F. (2020). Cytosolic NUAK1 Enhances ATP Production by Maintaining Proper Glycolysis and Mitochondrial Function in Cancer Cells. *Front. Oncol.* *10*, 1123.

Esch, T., Lemmon, V., and Banker, G. (1999). Local Presentation of Substrate Molecules Directs Axon Specification by Cultured Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.* *19*, 6417–6426.

F

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.

Fenlon, L.R., Suárez, R., and Richards, L.J. (2017). The anatomy, organisation and development of contralateral callosal projections of the mouse somatosensory cortex. *Brain Neurosci. Adv.* *1*, 239821281769488.

Fernandez, A., Meechan, D.W., Karpinski, B.A., Paronett, E.M., Bryan, C.A., Rutz, H.L., Radin, E.A., Lubin, N., Bonner, E.R., Popratiloff, A., et al. (2019). Mitochondrial Dysfunction Leads to Cortical Under-Connectivity and Cognitive Impairment. *Neuron* *102*, 1127-1142.e3.

Finsterwald, C., Fiumelli, H., Cardinaux, J.-R., and Martin, J.-L. (2010). Regulation of Dendritic Development by BDNF Requires Activation of CRTC1 by Glutamate. *J. Biol. Chem.* *285*, 28587–28595.

Florio, M., and Huttner, W.B. (2014). Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. *Development* *141*, 2182–2194.

Flynn, K.C. (2013). The cytoskeleton and neurite initiation. *BioArchitecture* *3*, 86–109.

Flynn, K.C., Pak, C.W., Shaw, A.E., Bradke, F., and Bamberg, J.R. (2009). Growth cone-like waves transport actin and promote axonogenesis and neurite branching. *Dev. Neurobiol.* *69*, 761–779.

Flynn, K.C., Hellal, F., Neukirchen, D., Jacob, S., Tahirovic, S., Dupraz, S., Stern, S., Garvalov, B.K., Gurniak, C., Shaw, A.E., et al. (2012). ADF/Cofilin-Mediated Actin Retrograde Flow Directs Neurite Formation in the Developing Brain. *Neuron* *76*, 1091–1107.

Fogarty, S., and Hardie, D.G. (2009). C-terminal Phosphorylation of LKB1 Is Not Required for Regulation of AMP-activated Protein Kinase, BRSK1, BRSK2, or Cell Cycle Arrest. *J. Biol. Chem.* *284*, 77–84.

Foltran, R.B., and Diaz, S.L. (2016). BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin? *J. Neurochem.* *138*, 204–221.

Franke, K., Otto, W., Johannes, S., Baumgart, J., Nitsch, R., and Schumacher, S. (2012). miR-124-regulated RhoG reduces neuronal process complexity via ELMO/Dock180/Rac1 and Cdc42 signalling: RhoG reduces neuronal process complexity. *EMBO J.* *31*, 2908–2921.

Fukata, Y., Itoh, T.J., Kimura, T., Ménager, C., Nishimura, T., Shiromizu, T., Watanabe, H., Inagaki, N., Iwamatsu, A., Hotani, H., et al. (2002). CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat. Cell Biol.* *4*, 583–591.

Funahashi, Y., Namba, T., Fujisue, S., Itoh, N., Nakamuta, S., Kato, K., Shimada, A., Xu, C., Shan, W., Nishioka, T., et al. (2013). ERK2-Mediated Phosphorylation of Par3 Regulates Neuronal Polarization. *J. Neurosci.* *33*, 13270–13285.

G

Gallo, G. (2013). More than one ring to bind them all: Recent insights into the structure of the axon. *Dev. Neurobiol.* *73*, 799–805.

Gao, Y., Nikulina, E., Mellado, W., and Filbin, M.T. (2003). Neurotrophins Elevate cAMP to Reach a Threshold Required to Overcome Inhibition by MAG through Extracellular Signal-Regulated Kinase-Dependent Inhibition of Phosphodiesterase. *J. Neurosci.* *23*, 11770–11777.

Gartner, A., and Staiger, V. (2002). Neurotrophin secretion from hippocampal neurons evoked by long-term-potential-inducing electrical stimulation patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 6386–6391.

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: N-cadherin directs neuronal polarity. *EMBO J.* *31*, 1893–1903.

Garvalov, B.K., Flynn, K.C., Neukirchen, D., Meyn, L., Teusch, N., Wu, X., Brakebusch, C., Bamberg, J.R., and Bradke, F. (2007). Cdc42 Regulates Cofilin during the Establishment of Neuronal Polarity. *J. Neurosci.* *27*, 13117–13129.

Gaude, H., Aznar, N., Delay, A., Bres, A., Buchet-Poyau, K., Caillat, C., Vigouroux, A., Rogon, C., Woods, A., Vanacker, J.-M., et al. (2012). Molecular chaperone complexes with antagonizing activities regulate stability and activity of the tumor suppressor LKB1. *Oncogene* *31*, 1582–1591.

- Gehler, S. (2004). p75 Neurotrophin Receptor Signaling Regulates Growth Cone Filopodial Dynamics through Modulating RhoA Activity. *J. Neurosci.* *24*, 4363–4372.
- George, S.H.L., Milea, A., Sowamber, R., Chehade, R., Tone, A., and Shaw, P.A. (2016). Loss of LKB1 and p53 synergizes to alter fallopian tube epithelial phenotype and high-grade serous tumorigenesis. *Oncogene* *35*, 59–68.
- Geschwind, D.H., and Levitt, P. (2007). Autism spectrum disorders: developmental disconnection syndromes. *Curr. Opin. Neurobiol.* *17*, 103–111.
- Gibson, D.A., Tymanskyj, S., Yuan, R.C., Leung, H.C., Lefebvre, J.L., Sanes, J.R., Chédotal, A., and Ma, L. (2014). Dendrite Self-Avoidance Requires Cell-Autonomous Slit/Robo Signaling in Cerebellar Purkinje Cells. *Neuron* *81*, 1040–1056.
- Glerup, S., Bolcho, U., Mølgaard, S., Bøggild, S., Vaegter, C.B., Smith, A.H., Nieto-Gonzalez, J.L., Ovesen, P.L., Pedersen, L.F., Fjorback, A.N., et al. (2016). SorCS2 is required for BDNF-dependent plasticity in the hippocampus. *Mol. Psychiatry* *21*, 1740–1751.
- Goldman, S.A., and Chen, Z. (2011). Perivascular instruction of cell genesis and fate in the adult brain. *Nat. Neurosci.* *14*, 1382–1389.
- Gonzalez-Billault, C., Avila, J., and Cáceres, A. (2001). Evidence for the Role of MAP1B in Axon Formation. *Mol. Biol. Cell* *12*, 2087–2098.
- Goodson, H.V., and Jonasson, E.M. (2018). Microtubules and Microtubule-Associated Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *10*, a022608.
- Goslin, K., and Banker, G. (1989). Experimental Observations on the Development of Polarity by Hippocampal Neurons in Culture. *J. Cell Biol.* *108*, 10.
- Götz, M., and Huttner, W.B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 777–788.
- Granseth, B., Fukushima, Y., Sugo, N., Lagnado, L., and Yamamoto, N. (2013). Regulation of thalamocortical axon branching by BDNF and synaptic vesicle cycling. *Front. Neural Circuits* *7*.
- Gumy, L.F., Yeo, G.S.H., Tung, Y.-C.L., Zivraj, K.H., Willis, D., Coppola, G., Lam, B.Y.H., Twiss, J.L., Holt, C.E., and Fawcett, J.W. (2011). Transcriptome analysis of embryonic and adult sensory axons reveals changes in mRNA repertoire localization. *RNA* *17*, 85–98.
- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J. (2008). AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Mol. Cell* *30*, 214–226.

H

- Haapasalo, A., Sipola, I., Larsson, K., Åkerman, K.E.O., Stoilov, P., Stamm, S., Wong, G., and Castrén, E. (2002). Regulation of TRKB Surface Expression by Brain-derived Neurotrophic Factor and Truncated TRKB Isoforms. *J. Biol. Chem.* *277*, 43160–43167.
- Halloran, M., and Kalil, K. (1994). Dynamic behaviors of growth cones extending in the corpus callosum of living cortical brain slices observed with video microscopy. *J. Neurosci.* *14*, 2161–2177.
- Hand, R.A., Khalid, S., Tam, E., and Kolodkin, A.L. (2015). Axon Dynamics during Neocortical Laminal Innervation. *Cell Rep.* *12*, 172–182.
- Hapak, S.M., Rothlin, C.V., and Ghosh, S. (2018). PAR3–PAR6–atypical PKC polarity complex proteins in neuronal polarization. *Cell. Mol. Life Sci.* *75*, 2735–2761.
- Hardie, D.G. (2005). New roles for the LKB1→AMPK pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* *17*, 167–173.
- Hardie, D.G., and Alessi, D.R. (2013). LKB1 and AMPK and the cancer-metabolism link - ten years after. *BMC Biol.* *11*, 36.
- Hartmann, M. (2001). Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO J.* *20*, 5887–5897.
- Hawley, S.A., Boudeau, J., Reid, J.L., Mustard, K.J., Udd, L., Mäkelä, T.P., Alessi, D.R., and Hardie, D.G. (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD α/β and MO25 α/β are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J. Biol.* *2*, 28.
- Hearle, N., Schumacher, V., Menko, F.H., Olschwang, S., Boardman, L.A., Gille, J.J.P., Keller, J.J., Westerman, A.M., Scott, R.J., Lim, W., et al. (2006). Frequency and Spectrum of Cancers in the Peutz-Jeghers Syndrome. *Clin. Cancer Res.* *12*, 3209–3215.
- Hemminki, A., Tomlinson, I., Markie, D., Järvinen, H., Sistonen, P., Björkqvist, A.-M., Knuutila, S., Salovaara, R., Bodmer, W., Shibata, D., et al. (1997). Localization of a susceptibility locus for Peutz-Jeghers syndrome to 19p using comparative genomic hybridization and targeted linkage analysis. *Nat. Genet.* *15*, 87–90.
- Hemminki, A., Markie, D., Tomlinson, I., Avizienyte, E., Roth, S., Loukola, A., Bignell, G., Warren, W., Aminoff, M., Höglund, P., et al. (1998). A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* *391*, 184–187.
- Herzig, S., and Shaw, R.J. (2018). AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *19*, 121–135.
- Hirokawa, N., Niwa, S., and Tanaka, Y. (2010). Molecular Motors in Neurons: Transport Mechanisms and Roles in Brain Function, Development, and Disease. *Neuron* *68*, 610–638.

Hofer, M., Pagliusi, S.R., Hohn, A., Leibrock, J., and Barde, Y.A. (1990). Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J.* *9*, 2459–2464.

Holgado-Madruga, M., Moscatello, D.K., Emllet, D.R., Dieterich, R., and Wong, A.J. (1997). Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 12419–12424.

Holt, C.E., Martin, K.C., and Schuman, E.M. (2019). Local translation in neurons: visualization and function. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *26*, 557–566.

Hooks, B.M., Hires, S.A., Zhang, Y.-X., Huber, D., Petreanu, L., Svoboda, K., and Shepherd, G.M.G. (2011). Laminar Analysis of Excitatory Local Circuits in Vibrissal Motor and Sensory Cortical Areas. *PLoS Biol.* *9*, e1000572.

Horike, N., Takemori, H., Katoh, Y., Doi, J., Min, L., Asano, T., Sun, X.J., Yamamoto, H., Kasayama, S., Muraoka, M., et al. (2003). Adipose-specific Expression, Phosphorylation of Ser794 in Insulin Receptor Substrate-1, and Activation in Diabetic Animals of Salt-inducible Kinase-2. *J. Biol. Chem.* *278*, 18440–18447.

Hou, X., Xu, S., Maitland-Toolan, K.A., Sato, K., Jiang, B., Ido, Y., Lan, F., Walsh, K., Wierzbicki, M., Verbeuren, T.J., et al. (2008). SIRT1 Regulates Hepatocyte Lipid Metabolism through Activating AMP-activated Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* *283*, 20015–20026.

Houde, V.P., Ritorto, M.S., Gourlay, R., Varghese, J., Davies, P., Shpiro, N., Sakamoto, K., and Alessi, D.R. (2014). Investigation of LKB1 Ser431 phosphorylation and Cys433 farnesylation using mouse knockin analysis reveals an unexpected role of prenylation in regulating AMPK activity. *Biochem. J.* *458*, 41–56.

Huang, E.J., and Reichardt, L.F. (2001). Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. *Annu. Rev. Neurosci.* *24*, 677–736.

Huang, E.J., and Reichardt, L.F. (2003). Trk Receptors: Roles in Neuronal Signal Transduction. *Annu. Rev. Biochem.* *72*, 609–642.

Huang, S.-H., Duan, S., Sun, T., Wang, J., Zhao, L., Geng, Z., Yan, J., Sun, H.-J., and Chen, Z.-Y. (2011). JIP3 Mediates TrkB Axonal Anterograde Transport and Enhances BDNF Signaling by Directly Bridging TrkB with Kinesin-1. *J. Neurosci.* *31*, 10602–10614.

Huang, W., She, L., Chang, X.-y., Yang, R.-r., Wang, L., Ji, H.-b., Jiao, J.-w., and Poo, M.-m. (2014). Protein kinase LKB1 regulates polarized dendrite formation of adult hippocampal newborn neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 469–474.

Huttner, W.B., and Brand, M. (1997). Asymmetric division and polarity of neuroepithelial cells. *Curr. Opin. Neurobiol.* *7*, 29–39.

Hwang, J.-T., Kim, Y.M., Surh, Y.-J., Baik, H.W., Lee, S.-K., Ha, J., and Park, O.J. (2006). Selenium Regulates Cyclooxygenase-2 and Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling Pathways by Activating AMP-Activated Protein Kinase in Colon Cancer Cells. *Cancer Res.* *66*, 10057–10063.

- Inagaki, N., Chihara, K., Arimura, N., Ménager, C., Kawano, Y., Matsuo, N., Nishimura, T., Amano, M., and Kaibuchi, K. (2001). CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nat. Neurosci.* *4*, 781–782.
- Innocenti, G. (1981). Growth and reshaping of axons in the establishment of visual callosal connections. *Science* *212*, 824–827.
- Innocenti, G.M., and Price, D.J. (2005). Exuberance in the development of cortical networks. *Nat. Rev. Neurosci.* *6*, 955–965.
- Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.-L. (2003). TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival. *Cell* *115*, 577–590.
- Inoue, E., Mochida, S., Takagi, H., Higa, S., Deguchi-Tawarada, M., Takao-Rikitsu, E., Inoue, M., Yao, I., Takeuchi, K., Kitajima, I., et al. (2006). SAD: A Presynaptic Kinase Associated with Synaptic Vesicles and the Active Zone Cytomatrix that Regulates Neurotransmitter Release. *Neuron* *50*, 261–275.
- Iossifov, I., Ronemus, M., Levy, D., Wang, Z., Hakker, I., Rosenbaum, J., Yamrom, B., Lee, Y., Narzisi, G., Leotta, A., et al. (2012). De Novo Gene Disruptions in Children on the Autistic Spectrum. *Neuron* *285*–299.
- Ito, M., Nakano, T., Erdödi, F., and Hartshorne, D.J. (2004). Myosin phosphatase: Structure, regulation and function. *Mol. Cell. Biochem.* *259*, 197–209.
- Iurlaro, Loverro, Vacca, Cormio, Ribatti, Minischetti, Ria, Bruno, and Selvaggi (1999). Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 correlate with upgrading and myometrial invasion in endometrial carcinoma. *Eur. J. Clin. Invest.* *29*, 793–801.
- Ivy, G.O., and Killackey, H.P. (1981). The ontogeny of the distribution of callosal projection neurons in the rat parietal cortex. *J. Comp. Neurol.* *195*, 367–389.
- Iwasawa, N., Negishi, M., and Oinuma, I. (2012). R-Ras controls axon branching through afadin in cortical neurons. *Mol. Biol. Cell* *23*, 2793–2804.

J

- Jakobsen, S.N., Hardie, D.G., Morrice, N., and Tornqvist, H.E. (2001). 5'-AMP-activated Protein Kinase Phosphorylates IRS-1 on Ser-789 in Mouse C2C12 Myotubes in Response to 5-Aminoimidazole-4-carboxamide Riboside. *J. Biol. Chem.* *276*, 46912–46916.
- Jaleel, M., McBride, A., Lizcano, J.M., Deak, M., Toth, R., Morrice, N.A., and Alessi, D.R. (2005). Identification of the sucrose non-fermenting related kinase SNRK, as a novel LKB1 substrate. *FEBS Lett.* *579*, 1417–1423.
- Jaleel, M., Villa, F., Deak, M., Toth, R., Prescott, A.R., van Aalten, D.M.F., and Alessi, D.R. (2006). The ubiquitin-associated domain of AMPK-related kinases regulates conformation and LKB1-mediated phosphorylation and activation. *Biochem. J.* *394*, 545–555.
- Jansen, M., ten Klooster, J.P., Offerhaus, G.J., and Clevers, H. (2009). LKB1 and AMPK Family Signaling: The Intimate Link Between Cell Polarity and Energy Metabolism. *Physiol. Rev.* *89*, 777–798.
- Jaworski, T., Banach-Kasper, E., and Gralec, K. (2019). GSK-3 β at the Intersection of Neuronal Plasticity and Neurodegeneration. *Neural Plast.* *2019*, 1–14.
- Jeanneteau, F., Deinhardt, K., Miyoshi, G., Bennett, A.M., and Chao, M.V. (2010). The MAP kinase phosphatase MKP-1 regulates BDNF-induced axon branching. *Nat. Neurosci.* *13*, 1373–1379.
- Jenne, D.E., Reomann, H., Nezu, J., Friedel, W., Loff, S., Jeschke, R., Müller, O., Back, W., and Zimmer, M. (1998). Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threoninekinase. *Nat. Genet.* *18*, 38–43.
- Jensen, C.J., Buch, M.-B., Krag, T.O., Hemmings, B.A., Gammeltoft, S., and Frödin, M. (1999). 90-kDa Ribosomal S6 Kinase Is Phosphorylated and Activated by 3-Phosphoinositide-dependent Protein Kinase-1. *J. Biol. Chem.* *274*, 27168–27176.
- Ji, Y., Pang, P.T., Feng, L., and Lu, B. (2005). Cyclic AMP controls BDNF-induced TrkB phosphorylation and dendritic spine formation in mature hippocampal neurons. *Nat. Neurosci.* *8*, 164–172.
- Ji, Y., Lu, Y., Yang, F., Shen, W., Tang, T.T.-T., Feng, L., Duan, S., and Lu, B. (2010). Acute and gradual increases in BDNF concentration elicit distinct signaling and functions in neurons. *Nat. Neurosci.* *13*, 302–309.
- Jiang, H., Guo, W., Liang, X., and Rao, Y. (2005). Both the Establishment and the Maintenance of Neuronal Polarity Require Active Mechanisms. *Cell* *120*, 123–135.
- Jishage, K. -i., Nezu, J. -i., Kawase, Y., Iwata, T., Watanabe, M., Miyoshi, A., Ose, A., Habu, K., Kake, T., Kamada, N., et al. (2002). Role of Lkb1, the causative gene of Peutz-Jegher's syndrome, in embryogenesis and polyposis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 8903–8908.

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.

K

Kalil, K., and Dent, E.W. (2014). Branch management: mechanisms of axon branching in the developing vertebrate CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* *15*, 7–18.

Kanamoto, T., Mota, M., Takeda, K., Rubin, L.L., Miyazono, K., Ichijo, H., and Bazenet, C.E. (2000). Role of Apoptosis Signal-Regulating Kinase in Regulation of the c-Jun N-Terminal Kinase Pathway and Apoptosis in Sympathetic Neurons. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 196–204.

Kang, J.-S., Tian, J.-H., Pan, P.-Y., Zald, P., Li, C., Deng, C., and Sheng, Z.-H. (2008). Docking of Axonal Mitochondria by Syntaphilin Controls Their Mobility and Affects Short-Term Facilitation. *Cell* *132*, 137–148.

Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* *10*, 381–391.

Karuman, P., Gozani, O., Odze, R.D., Zhou, X.C., Zhu, H., Shaw, R., Brien, T.P., Bozzuto, C.D., Ooi, D., Cantley, L.C., et al. (2001). The Peutz-Jegher Gene Product LKB1 Is a Mediator of p53-Dependent Cell Death. *Mol. Cell* *7*, 1307–1319.

Katoh, Y., Takemori, H., Lin, X., Tamura, M., Muraoka, M., Satoh, T., Tsuchiya, Y., Min, L., Doi, J., Miyauchi, A., et al. (2006). Silencing the constitutive active transcription factor CREB by the LKB1-SIK signaling cascade. *FEBS J.* *273*, 2730–2748.

Kavanaugh, W., and Williams, L. (1994). An alternative to SH2 domains for binding tyrosine-phosphorylated proteins. *Science* *266*, 1862–1865.

Ketschek, A., and Gallo, G. (2010). Nerve Growth Factor Induces Axonal Filopodia through Localized Microdomains of Phosphoinositide 3-Kinase Activity That Drive the Formation of Cytoskeletal Precursors to Filopodia. *J. Neurosci.* *30*, 12185–12197.

Khursigara, G., Orlinick, J.R., and Chao, M.V. (1999). Association of the p75 Neurotrophin Receptor with TRAF6. *J. Biol. Chem.* *274*, 2597–2600.

Kim, W.-Y., Zhou, F.-Q., Zhou, J., Yokota, Y., Wang, Y.-M., Yoshimura, T., Kaibuchi, K., Woodgett, J.R., Anton, E.S., and Snider, W.D. (2006). Essential Roles for GSK-3s and GSK-3-Primed Substrates in Neurotrophin-Induced and Hippocampal Axon Growth. *Neuron* *52*, 981–996.

Kishi, M. (2005). Mammalian SAD Kinases Are Required for Neuronal Polarization. *Science* *307*, 929–932.

- Kislauskis, E.H., Zhu, X., and Singer, R.H. (1994). Sequences Responsible for Intracellular Localization of β -Actin Messenger RNA Also Affect Cell Phenotype. *J. Cell Biol.* *127*, 11.
- Koh, H.-J., Toyoda, T., Fujii, N., Jung, M.M., Rathod, A., Middelbeek, R.J.-W., Lessard, S.J., Trebak, J.T., Tsuchihara, K., Esumi, H., et al. (2010). Sucrose nonfermenting AMPK-related kinase (SNARK) mediates contraction-stimulated glucose transport in mouse skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 15541–15546.
- Kojima, Y., Miyoshi, H., Clevers, H.C., Oshima, M., Aoki, M., and Taketo, M.M. (2007). Suppression of Tubulin Polymerization by the LKB1-Microtubule-associated Protein/Microtubule Affinity-regulating Kinase Signaling. *J. Biol. Chem.* *282*, 23532–23540.
- Kolarow, R., Brigadski, T., and Lessmann, V. (2007). Postsynaptic Secretion of BDNF and NT-3 from Hippocampal Neurons Depends on Calcium Calmodulin Kinase II Signaling and Proceeds via Delayed Fusion Pore Opening. *J. Neurosci.* *27*, 10350–10364.
- 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., and Huttner, W.B. (2009). Basal process and cell divisions of neural progenitors in the developing brain: Basal process of neural progenitors. *Dev. Growth Differ.* *51*, 251–261.
- Kouhara, H., Hadari, Y.R., Spivak-Kroizman, T., Schilling, J., Bar-Sagi, D., Lax, I., and Schlessinger, J. (1997). A Lipid-Anchored Grb2-Binding Protein That Links FGF-Receptor Activation to the Ras/MAPK Signaling Pathway. *Cell* *89*, 693–702.
- Kowiański, P., Lietzau, G., Czuba, E., Waśkow, M., Steliga, A., and Moryś, J. (2018). BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cell. Mol. Neurobiol.* *38*, 579–593.
- Ksiazak-Reding, H., Pyo, H.K., Feinstein, B., and Pasinetti, G.M. (2003). Akt/PKB kinase phosphorylates separately Thr212 and Ser214 of tau protein in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* *159*–168.
- Kuruvilla, R., Ye, H., and Ginty, D.D. (2000). Spatially and Functionally Distinct Roles of the PI3-K Effector Pathway during NGF Signaling in Sympathetic Neurons. *Neuron* *27*, 499–512.
- Kuwako, K., and Okano, H. (2018a). Versatile Roles of LKB1 Kinase Signaling in Neural Development and Homeostasis. *Front. Mol. Neurosci.* *11*, 354.
- Kuwako, K., and Okano, H. (2018b). The LKB1-SIK Pathway Controls Dendrite Self-Avoidance in Purkinje Cells. *Cell Rep.* *24*, 2808-2818.e4.
- Kwon, S.-K., Sando, R., Lewis, T.L., Hirabayashi, Y., Maximov, A., and Polleux, F. (2016). LKB1 Regulates Mitochondria-Dependent Presynaptic Calcium Clearance and Neurotransmitter Release Properties at Excitatory Synapses along Cortical Axons. *PLOS Biol.* *14*, e1002516.

L

- Lai, K.-O., Wong, A.S.L., Cheung, M.-C., Xu, P., Liang, Z., Lok, K.-C., Xie, H., Palko, M.E., Yung, W.-H., Tessarollo, L., et al. (2012). TrkB phosphorylation by Cdk5 is required for activity-dependent structural plasticity and spatial memory. *Nat. Neurosci.* *15*, 1506–1515.
- Lan, F., Cacicedo, J.M., Ruderman, N., and Ido, Y. (2008). SIRT1 Modulation of the Acetylation Status, Cytosolic Localization, and Activity of LKB1: POSSIBLE ROLE IN AMP-ACTIVATED PROTEIN KINASE ACTIVATION. *J. Biol. Chem.* *283*, 27628–27635.
- Lan, F., Weikel, K.A., Cacicedo, J.M., and Ido, Y. (2017). Resveratrol-Induced AMP-Activated Protein Kinase Activation Is Cell-Type Dependent: Lessons from Basic Research for Clinical Application. *14*.
- Lanfranchi, M., Meyer-Dilhet, G., Dos Reis, R., Garcia, A., Blondet, C., Javin, L., Amar, A., and Courchet, J. (2020). The AMPK-related kinase NUAK1 controls cortical axons branching through a local modulation of mitochondrial metabolic functions (Neuroscience).
- Lang, T., Bruns, D., Wenzel, D., Thiele, C., and Reinhard, J. (2001). SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J.* *20*, 2202–2213.
- Lasagna-Reeves, C.A., de Haro, M., Hao, S., Park, J., Rousseaux, M.W.C., Al-Ramahi, I., Jafar-Nejad, P., Vilanova-Velez, L., See, L., De Maio, A., et al. (2016). Reduction of Nuak1 Decreases Tau and Reverses Phenotypes in a Tauopathy Mouse Model. *Neuron* *92*, 407–418.
- Lawrence Zipursky, S., and Grueber, W.B. (2013). The Molecular Basis of Self-Avoidance. *Annu. Rev. Neurosci.* *36*, 547–568.
- Lazo, O.M., Gonzalez, A., Ascano, M., Kuruvilla, R., Couve, A., and Bronfman, F.C. (2013). BDNF Regulates Rab11-Mediated Recycling Endosome Dynamics to Induce Dendritic Branching. *J. Neurosci.* *33*, 6112–6122.
- 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.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K., and Hempstead, B.L. (2001). Regulation of Cell Survival by Secreted Proneurotrophins. *Science* *294*, 1945–1948.
- Lefebvre, D.L., and Rosen, C.F. (2005). Regulation of SNARK activity in response to cellular stresses. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1724*, 71–85.
- Lefebvre, D.L., Bai, Y., Shahmolky, N., Sharma, M., Poon, R., Drucker, D.J., and Rosen, C.F. (2001). Identification and characterization of a novel sucrose-non-fermenting protein kinase/AMP-activated protein kinase-related protein kinase, SNARK. *Biochem. J.* *355*, 297–305.

- Leloup, N., Chataigner, L.M.P., and Janssen, B.J.C. (2018). Structural insights into SorCS2–Nerve Growth Factor complex formation. *Nat. Commun.* *9*, 2979.
- Leprivier, G., Remke, M., Rotblat, B., Dubuc, A., Mateo, A.-R.F., Kool, M., Agnihotri, S., El-Naggar, A., Yu, B., Prakash Somasekharan, S., et al. (2013). The eEF2 Kinase Confers Resistance to Nutrient Deprivation by Blocking Translation Elongation. *Cell* *153*, 1064–1079.
- Leßmann, V., and Brigadski, T. (2009). Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: An update. *Neurosci. Res.* *65*, 11–22.
- Letourneau, P.C., and Ressler, A.H. (1984). Inhibition of neurite initiation and growth by taxol. *J. Cell Biol.* *98*, 1355–1362.
- Letourneau, P.C., Shattuck, T.A., and Ressler, A.H. (1987). Pull and push in neurite elongation: Observations on the effects of different concentrations of cytochalasin B and taxol. *Cell Motil. Cytoskeleton* *8*, 193–209.
- Levi-Montalcini, R., Meyer, H., and Hamburger, V. (1954). In vitro experiments on the effects of mouse sarcomas 180 and 37 on spinal and sympathetic ganglia of the chick embryo. *Am. Assoc. Cancer Res.*
- Lewis, T.L., Turi, G.F., Kwon, S.-K., Losonczy, A., and Polleux, F. (2016). Progressive Decrease of Mitochondrial Motility during Maturation of Cortical Axons In Vitro and In Vivo. *Curr. Biol.* *26*, 2602–2608.
- Lier, M. van, Wagner, A., Mathus-Vliegen, E., Kuipers, E., Steyerberg, E., and Leerdam, M. van (2010). High Cancer Risk in Peutz–Jeghers Syndrome: A Systematic Review and Surveillance Recommendations. *Am. J. Gastroenterol.* *105*, 1258–1264.
- Lilley, B.N., Pan, Y.A., and Sanes, J.R. (2013). SAD Kinases Sculpt Axonal Arbors of Sensory Neurons through Long- and Short-Term Responses to Neurotrophin Signals. *Neuron* *79*, 39–53.
- Lim, C.S., and Walikonis, R.S. (2008). Hepatocyte growth factor and c-Met promote dendritic maturation during hippocampal neuron differentiation via the Akt pathway. *Cell. Signal.* *20*, 825–835.
- Lin, M.-Y., Cheng, X.-T., Tammineni, P., Xie, Y., Zhou, B., Cai, Q., and Sheng, Z.-H. (2017). Releasing Syntrophin Removes Stressed Mitochondria from Axons Independent of Mitophagy under Pathophysiological Conditions. *Neuron* *94*, 595-610.e6.
- Linggi, M.S., Burke, T.L., Williams, B.B., Harrington, A., Kraemer, R., Hempstead, B.L., Yoon, S.O., and Carter, B.D. (2005). Neurotrophin Receptor Interacting Factor (NRIF) Is an Essential Mediator of Apoptotic Signaling by the p75 Neurotrophin Receptor. *J. Biol. Chem.* *280*, 13801–13808.
- Liot, G., Zala, D., Pla, P., Mottet, G., Piel, M., and Saudou, F. (2013). Mutant Huntingtin Alters Retrograde Transport of TrkB Receptors in Striatal Dendrites. *J. Neurosci.* *33*, 6298–6309.
- Lipton, J.O., and Sahin, M. (2014). The Neurology of mTOR. *Neuron* *84*, 275–291.

- Liu, L., Siu, F.-M., Che, C.-M., Xu, A., and Wang, Y. (2012a). Akt blocks the tumor suppressor activity of LKB1 by promoting phosphorylation-dependent nuclear retention through 14-3-3 proteins. *Am. J. Transl. Res.* *4*, 175–186.
- Liu, Q.-R., Lu, L., Zhu, X.-G., Gong, J.-P., Shaham, Y., and Uhl, G.R. (2006). Rodent BDNF genes, novel promoters, novel splice variants, and regulation by cocaine. *Brain Res.* *1067*, 1–12.
- Liu, W., Monahan, K.B., Pfefferle, A.D., Shimamura, T., Sorrentino, J., Chan, K.T., Roadcap, D.W., Ollila, D.W., Thomas, N.E., Castrillon, D.H., et al. (2012b). LKB1/STK11 Inactivation Leads to Expansion of a Prometastatic Tumor Subpopulation in Melanoma. *Cancer Cell* *21*, 751–764.
- Liu, X.-H., Geng, Z., Yan, J., Li, T., Chen, Q., Zhang, Q.-Y., and Chen, Z.-Y. (2015). Blocking GSK3 β -mediated dynamin1 phosphorylation enhances BDNF-dependent TrkB endocytosis and the protective effects of BDNF in neuronal and mouse models of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* *74*, 377–391.
- Lizcano, J.M., Göransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N.A., Boudeau, J., Hawley, S.A., Udd, L., Mäkelä, T.P., Hardie, D.G., et al. (2004). LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J.* *23*, 833–843.
- Loudon, R.P., Silver, L.D., Yee, H.F., and Gallo, G. (2006). RhoA-kinase and myosin II are required for the maintenance of growth cone polarity and guidance by nerve growth factor. *J. Neurobiol.* *66*, 847–867.
- Lu, B. (2003). BDNF and Activity-Dependent Synaptic Modulation. *Learn. Mem.* *10*, 86–98.
- Lu, B., Pang, P.T., and Woo, N.H. (2005). The yin and yang of neurotrophin action. *Nat. Rev. Neurosci.* *6*, 603–614.
- Lui, J.H., Hansen, D.V., and Kriegstein, A.R. (2011). Development and Evolution of the Human Neocortex. *Cell* *146*, 18–36.
- Lundquist, E.A. (2003). Rac proteins and the control of axon development. *Curr. Opin. Neurobiol.* *13*, 384–390.
- Luukko, K., Ylikorkala, A., Tiainen, M., and Mäkelä, T.P. (1999). Expression of LKB1 and PTEN tumor suppressor genes during mouse embryonic development. *Mech. Dev.* *83*, 187–190.

M

MacAskill, A.F., Rinholm, J.E., Twelvetrees, A.E., Arancibia-Carcamo, I.L., Muir, J., Fransson, A., Aspenstrom, P., Attwell, D., and Kittler, J.T. (2009). Miro1 Is a Calcium Sensor for Glutamate Receptor-Dependent Localization of Mitochondria at Synapses. *Neuron* *61*, 541–555.

MacLachlan, T.K., and El-Deiry, W.S. (2002). Apoptotic threshold is lowered by p53 transactivation of caspase-6. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 9492–9497.

Manadas, B., Santos, A.R., Szabadfi, K., Gomes, J.R., Garbis, S.D., Fountoulakis, M., and Duarte, C.B. (2009). BDNF-Induced Changes in the Expression of the Translation Machinery in Hippocampal Neurons: Protein Levels and Dendritic mRNA. *J. Proteome Res.* *8*, 4536–4552.

Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* *298*, 1912–1934.

Marchesin, V., Castro-Castro, A., Lodillinsky, C., Castagnino, A., Cyrta, J., Bonsang-Kitzis, H., Fuhrmann, L., Irondelle, M., Infante, E., Montagnac, G., et al. (2015). ARF6–JIP3/4 regulate endosomal tubules for MT1-MMP exocytosis in cancer invasion. *J. Cell Biol.* *211*, 339–358.

Markham, A., Cameron, I., Franklin, P., and Spedding, M. (2004). BDNF increases rat brain mitochondrial respiratory coupling at complex I, but not complex II. *Eur. J. Neurosci.* *20*, 1189–1196.

Marshak, S., Nikolakopoulou, A.M., Dirks, R., Martens, G.J., and Cohen-Cory, S. (2007). Cell-Autonomous TrkB Signaling in Presynaptic Retinal Ganglion Cells Mediates Axon Arbor Growth and Synapse Maturation during the Establishment of Retinotectal Synaptic Connectivity. *J. Neurosci.* *27*, 2444–2456.

Martin, S.G., and St Johnston, D. (2003). A role for *Drosophila* LKB1 in anterior–posterior axis formation and epithelial polarity. *Nature* *421*, 379–384.

Matsuda, N., Lu, H., Fukata, Y., Noritake, J., Gao, H., Mukherjee, S., Nemoto, T., Fukata, M., and Poo, M.-m. (2009). Differential Activity-Dependent Secretion of Brain-Derived Neurotrophic Factor from Axon and Dendrite. *J. Neurosci.* *29*, 14185–14198.

Matsuki, T., Matthews, R.T., Cooper, J.A., van der Brug, M.P., Cookson, M.R., Hardy, J.A., Olson, E.C., and Howell, B.W. (2010). Reelin and Stk25 Have Opposing Roles in Neuronal Polarization and Dendritic Golgi Deployment. *Cell* *143*, 826–836.

Mattila, P.K., and Lappalainen, P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 446–454.

Meakin, S.O., Suter, U., Drinkwater, C.C., Welcher, A.A., and Shooter, E.M. (1992). The rat trk protooncogene product exhibits properties characteristic of the slow nerve growth factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *89*, 2374–2378.

Meechan, D.W., Maynard, T.M., Tucker, E.S., Fernandez, A., Karpinski, B.A., Rothblat, L.A., and LaMantia, A.-S. (2015). Modeling a model: Mouse genetics, 22q11.2 Deletion Syndrome, and disorders of cortical circuit development. *Prog. Neurobiol.* *130*, 1–28.

Mehenni, H., Gehrig, C., Nezu, J., Oku, A., Shimane, M., Rossier, C., Guex, N., Blouin, J.-L., Scott, H.S., and Antonarakis, S.E. (1998). Loss of LKB1 Kinase Activity in Peutz-Jeghers Syndrome, and Evidence for Allelic and Locus Heterogeneity. *Am. J. Hum. Genet.* *63*, 1641–1650.

Ménager, C., Arimura, N., Fukata, Y., and Kaibuchi, K. (2004). PIP3 is involved in neuronal polarization and axon formation: PIP3 in axon specification. *J. Neurochem.* *89*, 109–118.

Mencarelli, C., Nitarska, J., Kroecher, T., Ferraro, F., Massey, K., Riccio, A., and Pichaud, F. (2018). RanBP1 Couples Nuclear Export and Golgi Regulation through LKB1 to Promote Cortical Neuron Polarity. *Cell Rep.* *24*, 2529–2539.e4.

Menon, S., and Gupton, S.L. (2016). Building Blocks of Functioning Brain: Cytoskeletal Dynamics in Neuronal Development. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, (Elsevier), pp. 183–245.

Meyer, M.P., and Smith, S.J. (2006). Evidence from In Vivo Imaging That Synaptogenesis Guides the Growth and Branching of Axonal Arbors by Two Distinct Mechanisms. *J. Neurosci.* *26*, 3604–3614.

Meyer-Franke, A., Wilkinson, G.A., Kruttgen, A., Hu, M., Munro, E., Hanson, M.G., Reichardt, L.F., and Barres, B.A. (1998). Depolarization and cAMP Elevation Rapidly Recruit TrkB to the Plasma Membrane of CNS Neurons. *Neuron* *21*, 681–693.

Middlemas, D.S., Lindberg, R.A., and Hunter, T. (1991). trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 143–153.

Minichiello, L. (2009). TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat. Rev. Neurosci.* *10*, 850–860.

Misgeld, T., Kerschensteiner, M., Bareyre, F.M., Burgess, R.W., and Lichtman, J.W. (2007). Imaging axonal transport of mitochondria in vivo. *Nat. Methods* *4*, 559–561.

Mitchell, D.J., Blasier, K.R., Jeffery, E.D., Ross, M.W., Pullikuth, A.K., Suo, D., Park, J., Smiley, W.R., Lo, K.W.-H., Shabanowitz, J., et al. (2012). Trk Activation of the ERK1/2 Kinase Pathway Stimulates Intermediate Chain Phosphorylation and Recruits Cytoplasmic Dynein to Signaling Endosomes for Retrograde Axonal Transport. *J. Neurosci.* *32*, 15495–15510.

Miyashita, T., and Reed, J.C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* *80*, 293–299.

Miyoshi, H., Nakau, M., Ishikawa, T., Seldin, M.F., Oshima, M., and Taketo, M.M. (2002). Gastrointestinal Hamartomatous Polyposis in Lkb1 Heterozygous Knockout Mice. *Cancer Res.* *2261–2266*.

Mizui, T., Ishikawa, Y., Kumanogoh, H., and Kojima, M. (2016). Neurobiological actions by three distinct subtypes of brain-derived neurotrophic factor: Multi-ligand model of growth factor signaling. *Pharmacol. Res.* *105*, 93–98.

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.

Moller, J.C., Krüttgen, A., Heymach, J.V., Ghori, N., and Shooter, E.M. (1998). Subcellular localization of epitope-tagged neurotrophins in neuroendocrine cells. *J. Neurosci. Res.* *51*, 463–472.

Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Menezes, J.R.L., and Macklis, J.D. (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* *8*, 427–437.

Monteverde, T., Tait-Mulder, J., Hedley, A., Knight, J.R., Sansom, O.J., and Murphy, D.J. (2018). Calcium signalling links MYC to NUA1. *Oncogene* *37*, 982–992.

Moradi, M., Sivadasan, R., Saal, L., Lüningschrör, P., Dombert, B., Rathod, R.J., Dieterich, D.C., Blum, R., and Sendtner, M. (2017). Differential roles of α -, β -, and γ -actin in axon growth and collateral branch formation in motoneurons. *J. Cell Biol.* *216*, 793–814.

Mori, D., Yamada, M., Mimori-Kiyosue, Y., Shirai, Y., Suzuki, A., Ohno, S., Saya, H., Wynshaw-Boris, A., and Hirotsune, S. (2009). An essential role of the aPKC–Aurora A–NDEL1 pathway in neurite elongation by modulation of microtubule dynamics. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1057–1068.

Morton, J.P., Jamieson, N.B., Karim, S.A., Athineos, D., Ridgway, R.A., Nixon, C., McKay, C.J., Carter, R., Brunton, V.G., Frame, M.C., et al. (2010). LKB1 Haploinsufficiency Cooperates With Kras to Promote Pancreatic Cancer Through Suppression of p21-Dependent Growth Arrest. *Gastroenterology* *139*, 586–597.e6.

Moutaux, E., Charlot, B., Genoux, A., Saudou, F., and Cazorla, M. (2018). An integrated microfluidic/microelectrode array for the study of activity-dependent intracellular dynamics in neuronal networks. *Lab. Chip* *18*, 3425–3435.

Mowla, S.J., Pareek, S., Farhadi, H.F., Petrecca, K., Fawcett, J.P., Seidah, N.G., Morris, S.J., Sossin, W.S., and Murphy, R.A. (1999). Differential Sorting of Nerve Growth Factor and Brain-Derived Neurotrophic Factor in Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.* *19*, 2069–2080.

Moya-Alvarado, G., Gonzalez, A., Stuardo, N., and Bronfman, F.C. (2018). Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Regulates Rab5-Positive Early Endosomes in Hippocampal Neurons to Induce Dendritic Branching. *Front. Cell. Neurosci.* *12*, 493.

N

- Nadarajah, B., and Parnavelas, J.G. (2002). Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* *3*, 423–432.
- Nadarajah, B., Brunstrom, J.E., Grutzendler, J., Wong, R.O.L., and Pearlman, A.L. (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat. Neurosci.* *4*, 143–150.
- 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–ra76.
- Nakau, M., Miyoshi, H., Seldin, M.F., Imamura, M., Oshima, M., and Taketo, M.M. (2002). Hepatocellular Carcinoma Caused by Loss of Heterozygosity in Lkb1 Gene Knockout Mice. *Cancer Res.* *62*, 4549–4553.
- Namekata, K., Harada, C., Guo, X., Kimura, A., Kittaka, D., Watanabe, H., and Harada, T. (2012). Dock3 Stimulates Axonal Outgrowth via GSK-3 -Mediated Microtubule Assembly. *J. Neurosci.* *32*, 264–274.
- Naylor, R.L., Robertson, A.G.S., Allen, S.J., Sessions, R.B., Clarke, A.R., Mason, G.G.F., Burston, J.J., Tyler, S.J., Wilcock, G.K., and Dawbarn, D. (2002). A Discrete Domain of the Human TrkB Receptor Defines the Binding Sites for BDNF and NT-4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *291*, 501–507.
- Nezu, J., Oku, A., and Shimane, M. (1999). Loss of Cytoplasmic Retention Ability of Mutant LKB1 Found in Peutz-Jeghers Syndrome Patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *261*, 750–755.
- Nieto Guil, A.F., Oksdath, M., Weiss, L.A., Grassi, D.J., Sosa, L.J., Nieto, M., and Quiroga, S. (2017). IGF-1 receptor regulates dynamic changes in neuronal polarity during cerebral cortical migration. *Sci. Rep.* *7*, 7703.
- Nishimura, T., Kato, K., Yamaguchi, T., Fukata, Y., Ohno, S., and Kaibuchi, K. (2004). Role of the PAR-3–KIF3 complex in the establishment of neuronal polarity. *Nat. Cell Biol.* *6*, 328–334.
- 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.
- Nony, P., Gaude, H., Rossel, M., Fournier, L., Rouault, J.-P., and Billaud, M. (2003). Stability of the Peutz–Jeghers syndrome kinase LKB1 requires its binding to the molecular chaperones Hsp90/Cdc37. *Oncogene* *22*, 9165–9175.

O

Ohira, K., Homma, K.J., Hirai, H., Nakamura, S., and Hayashi, M. (2006). TrkB-T1 regulates the RhoA signaling and actin cytoskeleton in glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *342*, 867–874.

Ohnami, S., Endo, M., Hirai, S., Uesaka, N., Hatanaka, Y., Yamashita, T., and Yamamoto, N. (2008). Role of RhoA in Activity-Dependent Cortical Axon Branching. *J. Neurosci.* *28*, 9117–9121.

O’Leary, D.D., Stanfield, B.B., and Cowan, W.M. (1981). Evidence that the early postnatal restriction of the cells of origin of the callosal projection is due to the elimination of axonal collaterals rather than to the death of neurons. *Brain Res.* *227*, 607–617.

Omotade, O.F., Pollitt, S.L., and Zheng, J.Q. (2017). Actin-based growth cone motility and guidance. *Mol. Cell. Neurosci.* *84*, 4–10.

Ozdamar, B., Bose, R., Barrios-Rodiles, M., Wang, H.-R., Zhang, Y., and Wrana, J.L. (2005). Regulation of the Polarity Protein Par6 by TGF β Receptors Controls Epithelial Cell Plasticity. *Science* *307*, 1603–1609.

P

Pacheco, A., and Gallo, G. (2016). Actin filament-microtubule interactions in axon initiation and branching. *Brain Res. Bull.* *126*, 300–310.

Palma, M., Riffo, E.N., Suganuma, T., Washburn, M.P., Workman, J.L., Pincheira, R., and Castro, A.F. (2019). Identification of a nuclear localization signal and importin beta members mediating NUA1 nuclear import inhibited by oxidative stress. *J. Cell. Biochem. jcb.28890*.

Palmer, A., and Klein, R. (2003). Multiple roles of ephrins in morphogenesis, neuronal networking, and brain function. *Genes Dev.* *17*, 1429–1450.

Pang, P.T., Teng, H.K., Zaitsev, E., Woo, N.T., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K.K., Yung, W.-H., Hempstead, B.L., and Lu, B. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/Plasmin Is Essential for Long-Term Hippocampal Plasticity. *Science* *306*, 487–491.

Parkhurst, C.N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J.N., Yates, J.R., Lafaille, J.J., Hempstead, B.L., Littman, D.R., and Gan, W.-B. (2013). Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Cell* *155*, 1596–1609.

Parpura, V., and Zorec, R. (2010). Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Res. Rev.* *63*, 83–92.

Pasterkamp, R.J. (2012). Getting neural circuits into shape with semaphorins. *Nat. Rev. Neurosci.* *13*, 605–618.

Pattabiraman, P.P., Tropea, D., Chiaruttini, C., Tongiorgi, E., Cattaneo, A., and Domenici, L. (2005). Neuronal activity regulates the developmental expression and subcellular localization of cortical BDNF mRNA isoforms in vivo. *Mol. Cell. Neurosci.* *28*, 556–570.

del Pino, I., Rico, B., and Marín, O. (2018). Neural circuit dysfunction in mouse models of neurodevelopmental disorders. *Curr. Opin. Neurobiol.* *48*, 174–182.

Piper, M., and Holt, C. (2004). RNA TRANSLATION IN AXONS. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *20*, 505–523.

Polleux, F., and Snider, W. (2010). Initiating and Growing an Axon. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a001925–a001925.

Polleux, F., Morrow, T., and Ghosh, A. (2000). Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* *404*, 567–573.

Pontious, A., Kowalczyk, T., Englund, C., and Hevner, R.F. (2008). Role of Intermediate Progenitor Cells in Cerebral Cortex Development. *Dev. Neurosci.* *30*, 24–32.

Powis, G., and Kirkpatrick, L. (2004). Hypoxia inducible factor-1A as a cancer drug target. *Mol. Cancer Ther.* *3*, 647–654.

Price, N.L., Gomes, A.P., Ling, A.J.Y., Duarte, F.V., Martin-Montalvo, A., North, B.J., Agarwal, B., Ye, L., Ramadori, G., Teodoro, J.S., et al. (2012). SIRT1 Is Required for AMPK Activation and the Beneficial Effects of Resveratrol on Mitochondrial Function. *Cell Metab.* *15*, 675–690.

Q

Qanungo, S., Haldar, S., and Basu, A. (2003). Restoration of Silenced Peutz-Jeghers Syndrome Gene, LKB1, Induces Apoptosis in Pancreatic Carcinoma Cells. *Neoplasia* *5*, 367–374.

Qiang, L. (2006). Tau Protects Microtubules in the Axon from Severing by Katanin. *J. Neurosci.* *26*, 3120–3129.

R

Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.* *145*, 61–83.

Rao, S., Kirschen, G.W., Szczurkowska, J., Di Antonio, A., Wang, J., Ge, S., and Shelly, M. (2018). Repositioning of Somatic Golgi Apparatus Is Essential for the Dendritic Establishment of Adult-Born Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.* *38*, 631–647.

Reichardt, L.F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *361*, 1545–1564.

Resh, M.D. (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1451*, 1–16.

Rietveld, A., Neutz, S., Simons, K., and Eaton, S. (1999). Association of Sterol- and Glycosylphosphatidylinositol-linked Proteins with *Drosophila* Raft Lipid Microdomains. *J. Biol. Chem.* *274*, 12049–12054.

Rose, C.R., Blum, R., Pichler, B., Lepier, A., Kafitz, K.W., and Konnerth, A. (2003). Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *426*, 5.

Roux, P.P., Colicos, M.A., Barker, P.A., and Kennedy, T.E. (1999). p75 Neurotrophin Receptor Expression Is Induced in Apoptotic Neurons After Seizure. *J. Neurosci.* *19*, 6887–6896.

Rowan, A., Churchman, M., Jefferey, R., Hanby, A., Poulosom, R., and Tomlinson, I. (2000). In situ analysis of LKB1/STK11 mRNA expression in human normal tissues and tumours. *J. Pathol.* *192*, 203–206.

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.

Ruthazer, E.S., Li, J., and Cline, H.T. (2006). Stabilization of Axon Branch Dynamics by Synaptic Maturation. *J. Neurosci.* 3594–3603.

Ruthel, G., and Hollenbeck, P.J. (2003). Response of Mitochondrial Traffic to Axon Determination and Differential Branch Growth. *J. Neurosci.* *23*, 8618–8624.

S

Sainath, R., and Granato, M. (2013). Plexin A3 and Turnout Regulate Motor Axonal Branch Morphogenesis in Zebrafish. *PLoS ONE* 8, e54071.

Sainath, R., Ketschek, A., Grandi, L., and Gallo, G. (2016). CSPGs inhibit axon branching by impairing mitochondria-dependent regulation of actin dynamics and axonal translation: CSPGs Impact Mitochondria. *Dev. Neurobiol.* 77, 454–473.

Sakamoto, K., McCarthy, A., Smith, D., Green, K.A., Grahame Hardie, D., Ashworth, A., and Alessi, D.R. (2005). Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction. *EMBO J.* 24, 1810–1820.

Salehi, A.H., Roux, P.P., Kubu, C.J., Zeindler, C., Bhakar, A., Tannis, L.-L., Verdi, J.M., and Barker, P.A. (2000). NRAGE, A Novel MAGE Protein, Interacts with the p75 Neurotrophin Receptor and Facilitates Nerve Growth Factor–Dependent Apoptosis. *Neuron* 27, 279–288.

Sanchez-Cespedes, M., Parrella, P., Esteller, M., Nomoto, S., Trink, B., Engles, J.M., Westra, W.H., Herman, J.G., and Sidransky, D. (2002). Inactivation of LKB1/STK11 Is a Common Event in Adenocarcinomas of the Lung. *Cancer Res.* 62, 3659–3662.

Santi, S., Cappello, S., Riccio, M., Bergami, M., Aicardi, G., Schenk, U., Matteoli, M., and Canossa, M. (2006). Hippocampal neurons recycle BDNF for activity-dependent secretion and LTP maintenance. *EMBO J.* 25, 4372–4380.

Santos, T.E., Schaffran, B., Broguière, N., Meyn, L., Zenobi-Wong, M., and Bradke, F. (2020). Axon Growth of CNS Neurons in Three Dimensions Is Amoeboid and Independent of Adhesions. *Cell Rep.* 32, 107907.

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.

Sapkota, G.P., Kieloch, A., Lizcano, J.M., Lain, S., Arthur, J.S.C., Williams, M.R., Morrice, N., Deak, M., and Alessi, D.R. (2001). Phosphorylation of the Protein Kinase Mutated in Peutz-Jeghers Cancer Syndrome, LKB1/STK11, at Ser⁴³¹ by p90^{RSK} and cAMP-dependent Protein Kinase, but Not Its Farnesylation at Cys⁴³³, Is Essential for LKB1 to Suppress Cell Growth. *J. Biol. Chem.* 276, 19469–19482.

Sapkota, G.P., Boudeau, J., Deak, M., Kieloch, A., Morrice, N., and Alessi, D.R. (2002). Identification and characterization of four novel phosphorylation sites (Ser31, Ser325, Thr336 and Thr366) on LKB1/STK11, the protein kinase mutated in Peutz–Jeghers cancer syndrome. *Biochem. J.* 362, 481–490.

Schmidt, H., and Rathjen, F.G. (2010). Signalling mechanisms regulating axonal branching in vivo. *BioEssays* 32, 977–985.

- Schmidt, H., Stonkute, A., Jüttner, R., Schäffer, S., Buttgereit, J., Feil, R., Hofmann, F., and Rathjen, F.G. (2007). The receptor guanylyl cyclase Npr2 is essential for sensory axon bifurcation within the spinal cord. *J. Cell Biol.* *179*, 331–340.
- Schwamborn, J.C., Berezikov, E., and Knoblich, J.A. (2009). The TRIM-NHL Protein TRIM32 Activates MicroRNAs and Prevents Self-Renewal in Mouse Neural Progenitors. *Cell* *136*, 913–925.
- Scott, J.W., Norman, D.G., Hawley, S.A., Kontagiannis, L., and Hardie, D.G. (2002). Protein Kinase Substrate Recognition Studied Using the Recombinant Catalytic Domain of AMP-activated Protein Kinase and a Model Substrate. *J. Mol. Biol.* 309–323.
- Scott, J.W., Hawley, S.A., Green, K.A., Anis, M., Stewart, G., Scullion, G.A., Norman, D.G., and Hardie, D.G. (2004). CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J. Clin. Invest.* *113*, 274–284.
- Screaton, R.A., Conkright, M.D., Katoh, Y., Best, J.L., Canettieri, G., Jeffries, S., Guzman, E., Niessen, S., Yates, J.R., Takemori, H., et al. (2004). The CREB Coactivator TORC2 Functions as a Calcium- and cAMP-Sensitive Coincidence Detector. *Cell* *119*, 61–74.
- Sekine, K., Honda, T., Kawauchi, T., Kubo, K. -i., and Nakajima, K. (2011). The Outermost Region of the Developing Cortical Plate Is Crucial for Both the Switch of the Radial Migration Mode and the Dab1-Dependent “Inside-Out” Lamination in the Neocortex. *J. Neurosci.* *31*, 9426–9439.
- Setogawa, T., Shinozaki-Yabana, S., Masuda, T., Matsuura, K., and Akiyama, T. (2006). The tumor suppressor LKB1 induces p21 expression in collaboration with LMO4, GATA-6, and Ldb1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *343*, 1186–1190.
- Shackelford, D.B., Vasquez, D.S., Corbeil, J., Wu, S., Leblanc, M., Wu, C.-L., Vera, D.R., and Shaw, R.J. (2009). mTOR and HIF-1 -mediated tumor metabolism in an LKB1 mouse model of Peutz-Jeghers syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 11137–11142.
- Shah, U., Sharpless, N.E., and Hayes, D.N. (2008). LKB1 and Lung Cancer: More Than the Usual Suspects. *Cancer Res.* *68*, 3562–3565.
- Shaw, R.J. (2009). LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiol.* *196*, 65–80.
- Shaw, R.J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R.L., Witters, L.A., DePinho, R.A., and Cantley, L.C. (2004). The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 3329–3335.
- Shaw, R.J., Lamia, K.A., Vasquez, D., Koo, S., Bardeesy, N., DePinho, R.A., Montminy, M., and Cantley, L.C. (2005). The Kinase LKB1 Mediates Glucose Homeostasis in Liver and Therapeutic Effects of Metformin. *Science* *310*, 1642–1646.

- Shelly, M., Cancedda, L., Heilshorn, S., Sumbre, G., and Poo, M. (2007). LKB1/STRAD Promotes Axon Initiation During Neuronal Polarization. *Cell* 129, 565–577.
- Shelly, M., Lim, B.K., Cancedda, L., Heilshorn, S.C., Gao, H., and Poo, M. -m. (2010). Local and Long-Range Reciprocal Regulation of cAMP and cGMP in Axon/Dendrite Formation. *Science* 327, 547–552.
- Shelly, M., Cancedda, L., Lim, B.K., Popescu, A.T., Cheng, P., Gao, H., and Poo, M. (2011). Semaphorin3A Regulates Neuronal Polarization by Suppressing Axon Formation and Promoting Dendrite Growth. *Neuron* 71, 433–446.
- Shen, Y.-A.A., Chen, Y., Dao, D.Q., Mayoral, S.R., Wu, L., Meijer, D., Ullian, E.M., Chan, J.R., and Lu, Q.R. (2014). Phosphorylation of LKB1/Par-4 establishes Schwann cell polarity to initiate and control myelin extent. *Nat. Commun.* 5.
- Shi, S.-H., Jan, L.Y., and Jan, Y.-N. (2003). Hippocampal Neuronal Polarity Specified by Spatially Localized mPar3/mPar6 and PI 3-Kinase Activity. *Cell* 112, 63–75.
- Shi, S.-H., Cheng, T., Jan, L.Y., and Jan, Y.-N. (2004). APC and GSK-3^β Are Involved in mPar3 Targeting to the Nascent Axon and Establishment of Neuronal Polarity. *Curr. Biol.* 14, 2025–2032.
- Shigeoka, T., Jung, H., Jung, J., Turner-Bridger, B., Ohk, J., Lin, J.Q., Amieux, P.S., and Holt, C.E. (2016). Dynamic Axonal Translation in Developing and Mature Visual Circuits. *Cell* 166, 181–192.
- Shimojo, M., Courchet, J., Pieraut, S., Torabi-Rander, N., Sando, R., Polleux, F., and Maximov, A. (2015). SNAREs Controlling Vesicular Release of BDNF and Development of Callosal Axons. *Cell Rep.* 11, 1054–1066.
- Smith, D.P., Spicer, J., Smith, A., Swift, S., and Ashworth, A. (1999). The mouse Peutz–Jeghers syndrome gene *Lkb1* encodes a nuclear protein kinase. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1479–1385.
- Smit-Rigter, L., Rajendran, R., Silva, C.A.P., Spierenburg, L., Groeneweg, F., Ruimschotel, E.M., van Versendaal, D., van der Togt, C., Eysel, U.T., Heimel, J.A., et al. (2016). Mitochondrial Dynamics in Visual Cortex Are Limited In Vivo and Not Affected by Axonal Structural Plasticity. *Curr. Biol.* 26, 2609–2616.
- Speranza, L., Giuliano, T., Volpicelli, F., De Stefano, M.E., Lombardi, L., Chambery, A., Lacivita, E., Leopoldo, M., Bellenchi, G.C., di Porzio, U., et al. (2015). Activation of 5-HT₇ receptor stimulates neurite elongation through mTOR, Cdc42 and actin filaments dynamics. *Front. Behav. Neurosci.* 9.
- 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. *Dev. Neurobiol.* 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.
- St Pourcain, B., Robinson, E.B., Anttila, V., Sullivan, B.B., Maller, J., Golding, J., Skuse, D., Ring, S., Evans, D.M., Zammit, S., et al. (2018). ASD and schizophrenia show distinct developmental profiles in common genetic overlap with population-based social communication difficulties. *Mol. Psychiatry* *23*, 263–270.
- 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.
- Strasser, G.A., Rahim, N.A., VanderWaal, K.E., Gertler, F.B., and Lanier, L.M. (2004). Arp2/3 Is a Negative Regulator of Growth Cone Translocation. *Neuron* *43*, 81–94.
- Su, B., Ji, Y.-S., Sun, X., Liu, X.-H., and Chen, Z.-Y. (2014). Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)-induced Mitochondrial Motility Arrest and Presynaptic Docking Contribute to BDNF-enhanced Synaptic Transmission. *J. Biol. Chem.* *289*, 1213–1226.
- Su, J.-Y., Erikson, E., and Maller, J.L. (1996). Cloning and Characterization of a Novel Serine/Threonine Protein Kinase Expressed in Early *Xenopus* Embryos. *J. Biol. Chem.* *271*, 14430–14437.
- Suárez, R., Fenlon, L.R., Marek, R., Avitan, L., Sah, P., Goodhill, G.J., and Richards, L.J. (2014). Balanced Interhemispheric Cortical Activity Is Required for Correct Targeting of the Corpus Callosum. *Neuron* *82*, 1289–1298.
- Sun, Y., Lim, Y., Li, F., Liu, S., Lu, J.-J., Haberberger, R., Zhong, J.-H., and Zhou, X.-F. (2012). ProBDNF Collapses Neurite Outgrowth of Primary Neurons by Activating RhoA. *PLoS ONE* *7*, e35883.
- Suzuki, S., Numakawa, T., Shimazu, K., Koshimizu, H., Hara, T., Hatanaka, H., Mei, L., Lu, B., and Kojima, M. (2004). BDNF-induced recruitment of TrkB receptor into neuronal lipid rafts. *J. Cell Biol.* *167*, 1205–1215.
- Suzuki, S., Kiyosue, K., Hazama, S., Ogura, A., Kashihara, M., Hara, T., Koshimizu, H., and Kojima, M. (2007). Brain-Derived Neurotrophic Factor Regulates Cholesterol Metabolism for Synapse Development. *J. Neurosci.* *27*, 6417–6427.
- Svitkina, T.M., Bulanova, E.A., Chaga, O.Y., Vignjevic, D.M., Kojima, S., Vasiliev, J.M., and Borisy, G.G. (2003). Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J. Cell Biol.* *160*, 409–421.

Swanson, L.W., Hahn, J.D., and Sporns, O. (2017). Organizing principles for the cerebral cortex network of commissural and association connections. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *114*, E9692–E9701.

T

Tabata, H., and Nakajima, K. (2003). Multipolar Migration: The Third Mode of Radial Neuronal Migration in the Developing Cerebral Cortex. *J. Neurosci.* *23*, 9996–10001.

Tagawa, Y., and Hirano, T. (2012). Activity-Dependent Callosal Axon Projections in Neonatal Mouse Cerebral Cortex. *Neural Plast.* *2012*, 1–10.

Takano, T., Wu, M., Nakamuta, S., Naoki, H., Ishizawa, N., Namba, T., Watanabe, T., Xu, C., Hamaguchi, T., Yura, Y., et al. (2017). Discovery of long-range inhibitory signaling to ensure single axon formation. *Nat. Commun.* *8*, 33.

Takei, N., Kawamura, M., Ishizuka, Y., Kakiya, N., Inamura, N., Namba, H., and Nawa, H. (2009). Brain-derived Neurotrophic Factor Enhances the Basal Rate of Protein Synthesis by Increasing Active Eukaryotic Elongation Factor 2 Levels and Promoting Translation Elongation in Cortical Neurons. *J. Biol. Chem.* *284*, 26340–26348.

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*, 12.

Tamás, P., Macintyre, A., Finlay, D., Clarke, R., Feijoo-Carnero, C., Ashworth, A., and Cantrell, D. (2010). LKB1 is essential for the proliferation of T-cell progenitors and mature peripheral T cells. *Eur. J. Immunol.* *40*, 242–253.

Tanaka, E., Ho, T., and Kirschner, M.W. (1995). The role of microtubule dynamics in growth cone motility and axonal growth. *J. Cell Biol.* *128*, 139–155.

Tang, X., Chen, X.-F., Wang, N.-Y., Wang, X.-M., Liang, S.-T., Zheng, W., Lu, Y.-B., Zhao, X., Hao, D.-L., Zhang, Z.-Q., et al. (2017). SIRT2 Acts as a Cardioprotective Deacetylase in Pathological Cardiac Hypertrophy. *Circulation* *136*, 2051–2067.

Tantama, M., Hung, Y.P., and Yellen, G. (2011). Imaging Intracellular pH in Live Cells with a Genetically Encoded Red Fluorescent Protein Sensor. *J. Am. Chem. Soc.* *133*, 10034–10037.

Tantama, M., Martínez-François, J.R., Mongeon, R., and Yellen, G. (2013). Imaging energy status in live cells with a fluorescent biosensor of the intracellular ATP-to-ADP ratio. *Nat. Commun.* *4*.

Tanwar, P.S., Mohapatra, G., Chiang, S., Engler, D.A., Zhang, L., Kaneko-Tarui, T., Ohguchi, Y., Birrer, M.J., and Teixeira, J.M. (2014). Loss of LKB1 and PTEN tumor suppressor genes in the ovarian surface epithelium induces papillary serous ovarian cancer. *Carcinogenesis* *35*, 546–553.

- Tao, K., Matsuki, N., and Koyama, R. (2014). AMP-activated protein kinase mediates activity-dependent axon branching by recruiting mitochondria to axon: Role of Mitochondria in Axonal Morphogenesis. *Dev. Neurobiol.* *74*, 557–573.
- Tapia-Rojas, C., Cabezas-Opazo, F., Deaton, C.A., Vergara, E.H., Johnson, G.V.W., and Quintanilla, R.A. (2019). It's all about tau. *Prog. Neurobiol.* *175*, 54–76.
- Taylor, A., Gifondorwa, D., Robinson, M., Strupe, J., Prevette, D., Johnson, J., Hempstead, B., Oppenheim, R., and Milligan, C. (2012). Motoneuron Programmed Cell Death in Response to proBDNF. *Dev. Neurobiol.* *72*, 699–712.
- Teichmann, H.M., and Shen, K. (2011). UNC-6 and UNC-40 promote dendritic growth through PAR-4 in *Caenorhabditis elegans* neurons. *Nat. Neurosci.* *14*, 165–172.
- Teng, H.K., Teng, K.K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R.D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z.-Y., Lee, F.S., et al. (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 5455–5463.
- 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.
- Tennyson, V.M. (1970). THE FINE STRUCTURE OF THE AXON AND GROWTH CONE OF THE DORSAL ROOT NEUROBLAST OF THE RABBIT EMBRYO. *J. Cell Biol.* *44*, 62–79.
- Thomas, G.V., Tran, C., Mellinghoff, I.K., Welsbie, D.S., Chan, E., Fueger, B., Czernin, J., and Sawyers, C.L. (2006). Hypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of mTOR in kidney cancer. *Nat. Med.* *12*, 122–127.
- Tiainen, M., Vaahtomeri, K., Ylikorkala, A., and Mäkelä, T.P. (2002). Growth arrest by the LKB1 tumor suppressor: induction of p21(WAF1/CIP1). *Hum. Mol. Genet.* *11*, 1497–1504.
- Timmusk, T., Palm, K., Metsis, M., Reintam, T., Paalme, V., Saarma, M., and Persson, H. (1993). Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron* *10*, 475–489.
- Timmusk, T., Lendahl, U., Funakoshi, H., Arenas, E., Persson, H., and Metsis, M. (1995). Identification of brain-derived neurotrophic factor promoter regions mediating tissue-specific, axotomy-, and neuronal activity-induced expression in transgenic mice. *J. Cell Biol.* *128*, 185–199.
- Tognoli, C., Rossi, F., Di Cola, F., Baj, G., Tongiorgi, E., Terova, G., Saroglia, M., Bernardini, G., and Gornati, R. (2010). Acute stress alters transcript expression pattern and reduces processing of proBDNF to mature BDNF in *Dicentrarchus labrax*. *BMC Neurosci.* *11*, 4.
- Toriyama, M., Shimada, T., Kim, K.B., Mitsuba, M., Nomura, E., Katsuta, K., Sakumura, Y., Roepstorff, P., and Inagaki, N. (2006). Shootin1: a protein involved in the organization of an asymmetric signal for neuronal polarization. *J. Cell Biol.* *175*, 147–157.

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.

Towler, M.C., Fogarty, S., Hawley, S.A., Pan, D.A., Martin, D.M.A., Morrice, N.A., McCarthy, A., Galardo, M.N., Meroni, S.B., Cigorraga, S.B., et al. (2008). A novel short splice variant of the tumour suppressor LKB1 is required for spermiogenesis. *Biochem. J.* *416*, 1–14.

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

Tucker, B.A., Rahimtula, M., and Mearow, K.M. (2008). Src and FAK are key early signalling intermediates required for neurite growth in NGF-responsive adult DRG neurons. *Cell. Signal.* *20*, 241–257.

Twelvetrees, A.E., Pernigo, S., Sanger, A., Guedes-Dias, P., Schiavo, G., Steiner, R.A., Dodding, M.P., and Holzbaur, E.L.F. (2016). The Dynamic Localization of Cytoplasmic Dynein in Neurons Is Driven by Kinesin-1. *Neuron* *90*, 1000–1015.

Upadhyay, S., Liu, C., Chatterjee, A., Hoque, M.O., Kim, M.S., Engles, J., Westra, W., Trink, B., Ratovitski, E., and Sidransky, D. (2006). LKB1/STK11 Suppresses Cyclooxygenase-2 Induction and Cellular Invasion through PEA3 in Lung Cancer. *Cancer Res.* *66*, 7870–7879.

U

Utsunomiya, J., Gocho, H., Miyanaga, T., Hamaguchi, E., and Kashimure, A. (1975). Peutz-Jeghers syndrome: its natural course and management. *Johns Hopkins Med. J.* *136*, 71–82.

V

Vaarmann, A., Mandel, M., Zeb, A., Wareski, P., Liiv, J., Kuum, M., Antsov, E., Liiv, M., Cagalinec, M., Choubey, V., et al. (2016). Mitochondrial biogenesis is required for axonal growth. *Development* *143*, 1981–1992.

Vandenplas, M.L., Mamidipudi, V., Lamar Seibenhener, M., and Wooten, M.W. (2002). Nerve growth factor activates kinases that phosphorylate atypical protein kinase C. *Cell. Signal.* *14*, 359–363.

Vicario, A., Colliva, A., Ratti, A., Davidovic, L., Baj, G., Gricman, Ł., Colombrita, C., Pallavicini, A., Jones, K.R., Bardoni, B., et al. (2015). Dendritic targeting of short and long 3' UTR BDNF mRNA is regulated by BDNF or NT-3 and distinct sets of RNA-binding proteins. *Front. Mol. Neurosci.* *8*.

Volikos, E. (2005). LKB1 exonic and whole gene deletions are a common cause of Peutz-Jeghers syndrome. *J. Med. Genet.* *43*, e18–e18.

W

Wamsley, B., and Fishell, G. (2017). Genetic and activity-dependent mechanisms underlying interneuron diversity. *Nat. Rev. Neurosci.* *18*, 299–309.

Wang, D.D., and Kriegstein, A.R. (2009). Defining the role of GABA in cortical development. *J. Physiol.* *587*, 1873–1879.

Wang, C.-L., Zhang, L., Zhou, Y., Zhou, J., Yang, X.-J., Duan, S. -m., Xiong, Z.-Q., and Ding, Y.-Q. (2007). Activity-Dependent Development of Callosal Projections in the Somatosensory Cortex. *J. Neurosci.* *27*, 11334–11342.

Wang, H., Wei, Y., Pu, Y., Jiang, D., Jiang, X., Zhang, Y., and Tao, J. (2019). Brain-derived neurotrophic factor stimulation of T-type Ca²⁺ channels in sensory neurons contributes to increased peripheral pain sensitivity. *Sci. Signal.* *12*, eaaw2300.

Wang, Z., Takemori, H., Halder, S.K., Nonaka, Y., and Okamoto, M. (1999). Cloning of a novel kinase (SIK) of the SNF1/AMPK family from high salt diet-treated rat adrenal1. *FEBS Lett.* *453*, 135–139.

Watts, J.L., Morton, D.G., Bestman, J., and Kempfues, K.J. (2000). PAR-4 in *C. elegans* embryos. *Development* *127*, 1467–1475.

West, A.E., Pruunsild, P., and Timmusk, T. (2014). Neurotrophins: transcription and translation. *Handb. Exp. Pharmacol.* *220*, 67–100.

Wiesmann, C., Ultsch, M.H., Bass, S.H., and de Vos, A.M. (1999). Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature* *401*, 184–188.

Winkle, C.C., Taylor, K.L., Dent, E.W., Gallo, G., Greif, K.F., and Gupton, S.L. (2016). Beyond the cytoskeleton: The emerging role of organelles and membrane remodeling in the regulation of axon collateral branches: Organelles and Membrane Remodeling in Axon Branching. *Dev. Neurobiol.* *76*, 1293–1307.

Winnubst, J., Bas, E., Ferreira, T.A., Wu, Z., Economo, M.N., Edson, P., Arthur, B.J., Bruns, C., Rokicki, K., Schauder, D., et al. (2019). Reconstruction of 1,000 Projection Neurons Reveals New Cell Types and Organization of Long-Range Connectivity in the Mouse Brain. *Cell* *179*, 268-281.e13.

Witte, H., Neukirchen, D., and Bradke, F. (2008). Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J. Cell Biol.* *180*, 619–632.

Won, C., Lin, Z., Kumar T., P., Li, S., Ding, L., Elkhali, A., Szabó, G., and Vasudevan, A. (2013). Autonomous vascular networks synchronize GABA neuron migration in the embryonic forebrain. *Nat. Commun.* *4*.

- Wonders, C.P., and Anderson, S.A. (2006). The origin and specification of cortical interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.* *7*, 687–696.
- Wong, H.H.-W., Lin, J.Q., Ströhl, F., Roque, C.G., Cioni, J.-M., Cagnetta, R., Turner-Bridger, B., Laine, R.F., Harris, W.A., Kaminski, C.F., et al. (2017). RNA Docking and Local Translation Regulate Site-Specific Axon Remodeling In Vivo. *Neuron* *95*, 852-868.e8.
- Wong, S.T., Henley, J.R., Kanning, K.C., Huang, K., Bothwell, M., and Poo, M. (2002). A p75NTR and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nat. Neurosci.* *5*, 1302–1308.
- Wong, Y.-H., Lee, C.-M., Xie, W., Cui, B., and Poo, M. (2015). Activity-dependent BDNF release via endocytic pathways is regulated by synaptotagmin-6 and complexin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, E4475–E4484.
- Woo, N.H., Teng, H.K., Siao, C.-J., Chiaruttini, C., Pang, P.T., Milner, T.A., Hempstead, B.L., and Lu, B. (2005). Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat. Neurosci.* *8*, 1069–1077.
- Woods, A., Johnstone, S.R., Dickerson, K., Leiper, F.C., Fryer, L.G.D., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., and Carling, D. (2003). LKB1 Is the Upstream Kinase in the AMP-Activated Protein Kinase Cascade. *Curr. Biol.* *13*, 2004–2008.
- Wooten, M.W., Seibenhener, M.L., Mamidipudi, V., Diaz-Meco, M.T., Barker, P.A., and Moscat, J. (2001). The Atypical Protein Kinase C-interacting Protein p62 Is a Scaffold for NF- κ B Activation by Nerve Growth Factor. *J. Biol. Chem.* *276*, 7709–7712.
- Wu, N., Zheng, B., Shaywitz, A., Dagon, Y., Tower, C., Bellinger, G., Shen, C.-H., Wen, J., Asara, J., McGraw, T.E., et al. (2013). AMPK-Dependent Degradation of TXNIP upon Energy Stress Leads to Enhanced Glucose Uptake via GLUT1. *Mol. Cell* *49*, 1167–1175.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C., et al. (1999). Mechanisms Controlling Mitochondrial Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1. *Cell* *98*, 115–124.

X

- Xiang, X., Saha, A.K., Wen, R., Ruderman, N.B., and Luo, Z. (2004). AMP-activated protein kinase activators can inhibit the growth of prostate cancer cells by multiple mechanisms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *321*, 161–167.
- Xie, Z., Dong, Y., Zhang, M., Cui, M.-Z., Cohen, R.A., Riek, U., Neumann, D., Schlattner, U., and Zou, M.-H. (2006). Activation of Protein Kinase C ζ by Peroxynitrite Regulates LKB1-dependent AMP-activated Protein Kinase in Cultured Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* *281*, 6366–6375.
- Xie, Z., Dong, Y., Scholz, R., Neumann, D., and Zou, M.-H. (2008). Phosphorylation of LKB1 at Serine 428 by Protein Kinase C- ζ Is Required for Metformin-Enhanced Activation of the AMP-Activated Protein Kinase in Endothelial Cells. *Circulation* *117*, 952–962.
- Xie, Z., Dong, Y., Zhang, J., Scholz, R., Neumann, D., and Zou, M.-H. (2009). Identification of the Serine 307 of LKB1 as a Novel Phosphorylation Site Essential for Its Nucleocytoplasmic Transport and Endothelial Cell Angiogenesis. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 3582–3596.
- Xu, C., Funahashi, Y., Watanabe, T., Takano, T., Nakamuta, S., Namba, T., and Kaibuchi, K. (2015). Radial Glial Cell-Neuron Interaction Directs Axon Formation at the Opposite Side of the Neuron from the Contact Site. *J. Neurosci.* *35*, 14517–14532.

Y

- Yamada, K.M., Spooner, B.S., and Wessells, N.K. (1970). AXON GROWTH: ROLES OF MICROFILAMENTS AND MICROTUBULES*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *66*, 1206–1212.
- Yamada, M., Ohnishi, H., Sano, S., Nakatani, A., Ikeuchi, T., and Hatanaka, H. (1997). Insulin Receptor Substrate (IRS)-1 and IRS-2 Are Tyrosine-phosphorylated and Associated with Phosphatidylinositol 3-Kinase in Response to Brain-derived Neurotrophic Factor in Cultured Cerebral Cortical Neurons. *J. Biol. Chem.* *272*, 30334–30339.
- Yamamoto, H., Takashima, S., Shintani, Y., Yamazaki, S., Seguchi, O., Nakano, A., Higo, S., Kato, H., Liao, Y., Asano, Y., et al. (2008). Identification of a novel substrate for TNF α -induced kinase NUAK2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *365*, 541–547.
- Yamashita, T., Tucker, K.L., and Barde, Y.-A. (1999). Neurotrophin Binding to the p75 Receptor Modulates Rho Activity and Axonal Outgrowth. *Neuron* *24*, 585–593.
- Yamashita, T., Higuchi, H., and Tohyama, M. (2002). The p75 receptor transduces the signal from myelin-associated glycoprotein to Rho. *J. Cell Biol.* *157*, 565–570.

- Yang, H.W., Shin, M.-G., Lee, S., Kim, J.-R., Park, W.S., Cho, K.-H., Meyer, T., and Do Heo, W. (2012). Cooperative Activation of PI3K by Ras and Rho Family Small GTPases. *Mol. Cell* 47, 281–290.
- Yang, J., Siao, C.-J., Nagappan, G., Marinic, T., Jing, D., McGrath, K., Chen, Z.-Y., Mark, W., Tessarollo, L., Lee, F.S., et al. (2009). Neuronal release of proBDNF. *Nat. Neurosci.* 12, 113–115.
- Yang, J., Harte-Hargrove, L.C., Siao, C.-J., Marinic, T., Clarke, R., Ma, Q., Jing, D., LaFrancois, J.J., Bath, K.G., Mark, W., et al. (2014). proBDNF Negatively Regulates Neuronal Remodeling, Synaptic Transmission, and Synaptic Plasticity in Hippocampus. *Cell Rep.* 7, 796–806.
- Yi, J.J., Barnes, A.P., Hand, R., Polleux, F., and Ehlers, M.D. (2010). TGF- β Signaling Specifies Axons during Brain Development. *Cell* 142, 144–157.
- Ylikorkala, A. (1999). Mutations and impaired function of LKB1 in familial and non-familial Peutz-Jeghers syndrome and a sporadic testicular cancer. *Hum. Mol. Genet.* 8, 45–51.
- Ylikorkala, A. (2001). Vascular Abnormalities and Deregulation of VEGF in Lkb1-Deficient Mice. *Science* 293, 1323–1326.
- York, R.D., Yao, H., Dillon, T., Ellig, C.L., Eckert, S.P., McCleskey, E.W., and Stork, P.J.S. (1998). Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* 392, 622–626.
- Yoshida, H., and Goedert, M. (2012). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by AMPK-related kinases. *J. Neurochem.* 120, 165–176.
- Yoshimura, T., Kawano, Y., Arimura, N., Kawabata, S., Kikuchi, A., and Kaibuchi, K. (2005). GSK-3 β Regulates Phosphorylation of CRMP-2 and Neuronal Polarity. *Cell* 120, 137–149.
- Yoshimura, T., Arimura, N., Kawano, Y., Kawabata, S., Wang, S., and Kaibuchi, K. (2006). Ras regulates neuronal polarity via the PI3-kinase/Akt/GSK-3 β /CRMP-2 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 62–68.
- Yu, W., Centonze, V., Ahmad, F., and Baas, P. (1993). Microtubule nucleation and release from the neuronal centrosome. *J. Cell Biol.* 122, 349–359.
- 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.

Z

- Zagorska, A., Deak, M., Campbell, D.G., Banerjee, S., Hirano, M., Aizawa, S., Prescott, A.R., and Alessi, D.R. (2010). New roles for the LKB1-NUAK pathway in controlling myosin phosphatase complexes and cell adhesion. *Sci Signal* 3, ra25.
- Zakikhani, M., Dowling, R., Fantus, I.G., Sonenberg, N., and Pollak, M. (2006). Metformin Is an AMP Kinase–Dependent Growth Inhibitor for Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* 66, 10269–10273.
- Zeng, P.-Y., and Berger, S.L. (2006). LKB1 Is Recruited to the p21/WAF1 Promoter by p53 to Mediate Transcriptional Activation. *Cancer Res.* 66, 10701–10708.
- Zhang, P., Abdelmohsen, K., Liu, Y., Tominaga-Yamanaka, K., Yoon, J.-H., Ioannis, G., Martindale, J.L., Zhang, Y., Becker, K.G., Yang, I.H., et al. (2015). Novel RNA- and FMRP-binding protein TRF2-S regulates axonal mRNA transport and presynaptic plasticity. *Nat. Commun.* 6, 8888.
- Zhang, Y., Ueno, Y., Liu, X.S., Buller, B., Wang, X., Chopp, M., and Zhang, Z.G. (2013). The MicroRNA-17-92 Cluster Enhances Axonal Outgrowth in Embryonic Cortical Neurons. *J. Neurosci.* 33, 6885–6894.
- Zheng, B., Jeong, J.H., Asara, J.M., Yuan, Y.-Y., Granter, S.R., Chin, L., and Cantley, L.C. (2009). Oncogenic B-RAF Negatively Regulates the Tumor Suppressor LKB1 to Promote Melanoma Cell Proliferation. *Mol. Cell* 33, 237–247.
- Zheng, J., Shen, W.-H., Lu, T.-J., Zhou, Y., Chen, Q., Wang, Z., Xiang, T., Zhu, Y.-C., Zhang, C., Duan, S., et al. (2008). Clathrin-dependent Endocytosis Is Required for TrkB-dependent Akt-mediated Neuronal Protection and Dendritic Growth. *J. Biol. Chem.* 283, 13280–13288.
- Zheng, Y., Zhang, X., Wu, X., Jiang, L., Ahsan, A., Ma, S., Xiao, Z., Han, F., Qin, Z.-H., Hu, W., et al. (2019). Somatic autophagy of axonal mitochondria in ischemic neurons. *J. Cell Biol.* 218, 1891–1907.
- Zhou, B., Cai, Q., Xie, Y., and Sheng, Z.-H. (2012). Snapin Recruits Dynein to BDNF-TrkB Signaling Endosomes for Retrograde Axonal Transport and Is Essential for Dendrite Growth of Cortical Neurons. *Cell Rep.* 2, 42–51.
- Zhou, F.-Q., Zhou, J., Dedhar, S., Wu, Y.-H., and Snider, W.D. (2004). NGF-Induced Axon Growth Is Mediated by Localized Inactivation of GSK-3^N and Functions of the Microtubule Plus End Binding Protein APC. *Neuron* 42, 897–912.
- Zhu, H., Moriasi, C.M., Zhang, M., Zhao, Y., and Zou, M.-H. (2013a). Phosphorylation of Serine 399 in LKB1 Protein Short Form by Protein Kinase C ζ Is Required for Its Nucleocytoplasmic Transport and Consequent AMP-activated Protein Kinase (AMPK) Activation. *J. Biol. Chem.* 288, 16495–16505.

Zhu, K., Chen, X., Liu, J., Ye, H., Zhu, L., and Wu, J.Y. (2013b). AMPK interacts with DSCAM and plays an important role in Netrin-1 induced neurite outgrowth. *Protein Cell* 4, 155–161.

Zhuang, Z.-G., Di, G.-H., Shen, Z.-Z., Ding, J., and Shao, Z.-M. (2006). Enhanced Expression of LKB1 in Breast Cancer Cells Attenuates Angiogenesis, Invasion, and Metastatic Potential. *Mol. Cancer Res.* 4, 843–849.

Zibrova, D., Vandermoere, F., Göransson, O., Peggie, M., Mariño, K.V., Knierim, A., Spengler, K., Weigert, C., Viollet, B., Morrice, N.A., et al. (2017). GFAT1 phosphorylation by AMPK promotes VEGF-induced angiogenesis. *Biochem. J.* 474, 983–1001.

Zu, Y., Liu, L., Lee, M.Y.K., Xu, C., Liang, Y., Man, R.Y., Vanhoutte, P.M., and Wang, Y. (2010). SIRT1 Promotes Proliferation and Prevents Senescence Through Targeting LKB1 in Primary Porcine Aortic Endothelial Cells. *Circ. Res.* 106, 1384–1393.

PUBLICATIONS ANNEXES

Lors de ma thèse j'ai eu la chance de participer à deux autres projets. Un projet parallèle au mien au sein de l'équipe mené par Marine LANFRANCHI et un projet de l'équipe du Dr Vincent GACHE. Ces deux articles ont été soumis et sont disponibles sur la plateforme BioRxiv.

1. The AMPK-related kinase NUA1 controls cortical axons branching through a local modulation of mitochondrial metabolic functions

Marine Lanfranchi, Géraldine Meyer-Dilhet, Raphael Dos Reis, **Audrey Garcia**, Camille Blondet, Luc Javin, Alizée Amar and Julien Courchet

[\(Pré-print\)](#)

J'ai participé à l'étude de la régulation du branchement axonal par la régulation du métabolisme métabolique par la kinase NUA1. Dans cet article j'ai participé à l'électroporation *ex vivo*, la mise en culture et l'imagerie de neurones corticaux d'embryons de souris.

2. Skeletal muscle MACF1 maintains myonuclei and mitochondria localization through microtubules to control muscle functionalities

Alireza Ghasemizadeh, Emilie Christin, Alexandre Guiraud, Nathalie Couturier, Valérie Risson, Emmanuelle Girard, Christophe Jagla, Cedric Soler, Lilia Laddada, Colline Sanchez, Francisco Jaque, **Audrey Garcia**, Marine Lanfranchi, Vincent Jacquemond, Julien Gondin, Julien Courchet, Laurent Schaeffer and Vincent Gache

[\(Pré-print\)](#)

Lors de cette collaboration, j'ai apporté une aide technique en microscopie en réalisant l'imagerie de jonctions neuromusculaires (Figure 5).

ARTICLE 2

The AMPK-related kinase NUA1 controls cortical axons branching through a local modulation of mitochondrial metabolic functions

*Marine Lanfranchi, Géraldine Meyer-Dilhet, Raphael Dos Reis, **Audrey Garcia**, Camille Blondet, Luc Javin, Alizée Amar and Julien Courchet*

The AMPK-related kinase NUA1 controls cortical axons branching through a local modulation of mitochondrial metabolic functions

Marine Lanfranchi, Géraldine Meyer-Dilhet, Raphael Dos Reis, Audrey Garcia, Camille Blondet, Luc Javin, Alizée Amar and Julien Courchet[#]

Affiliation : University of Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR-5310, INSERM U-1217, Institut NeuroMyoGène, F-69622, Villeurbanne, France

[#] Correspondence: Julien Courchet, DVM, Ph.D., julien.courchet@univ-lyon1.fr

ABSTRACT

The precise regulation of the cellular mechanisms underlying axonal morphogenesis is essential to the formation of functional neuronal networks. We previously identified the autism-candidate kinase NUA1 as a central regulator of axon branching in mouse cortical neurons through the control of mitochondria trafficking. How does local mitochondrial position or function regulate axon branching during development? Here, we characterized the metabolic regulation in the developing axon and report a marked metabolic decorrelation between axon elongation and collateral branching. We next solved the cascade of event leading to presynaptic clustering and mitochondria recruitment during spontaneous branch formation. Interestingly and contrary to peripheral neurons, mitochondria are recruited after but not prior to branch formation in cortical neurons. Using flux metabolomics and fluorescent biosensors, we observed that NUA1 deficiency significantly impairs mitochondrial metabolism and axonal ATP concentration. Upregulation of mitochondrial function is sufficient to rescue axonal branching in NUA1 null neurons *in vitro* and *in vivo*. Altogether, our results indicate that NUA1 exerts a dual function during axon branching through its ability to control mitochondria distribution and activity, and suggest that a mitochondrial-dependent remodeling of local metabolic homeostasis plays a critical role during axon morphogenesis.

INTRODUCTION

In mammals, cortical circuits are organized into complex networks of neurons interconnected through long-range axonal projections. The establishment of circuit connectivity occurs during a protracted period of embryonic and postnatal development through a series of tightly regulated cellular processes whose disruption can lead to socially-devastating neurodevelopmental disorders such as autism spectrum disorders (ASD), schizophrenia, epilepsy or mental retardation (del Pino et al., 2018; Piven et al., 2017). Axon morphogenesis is a multistep process culminating with the formation of axonal branches to form a network that is later refined through a process of selection of functional contacts and elimination by pruning (Kalil and Dent, 2014; Lewis et al., 2013). The formation and refinement of terminal axonal branches relies on a balance between synaptic activity and target-derived extracellular neurotrophins (Mizuno et al., 2007; C.-L. Wang et al., 2007). These signals converge on the activation of intracellular signaling

pathways mediating a cascade of cellular events such as cytoskeleton remodeling, addition of membrane or local protein translation (Brosig et al., 2019; Dent et al., 1999; Dent and Kalil, 2001; Hu et al., 2012; Ponomareva et al., 2014; A. Schwarz et al., 1995; Spillane et al., 2012; 2013; Wong et al., 2017) that are highly taxing energetically and are thought to induce a local increase in the metabolic turnover. Yet the spatial diffusion of metabolic molecules such as ATP is limited, implying that cellular energy production must match the local demand. Understanding how these local mechanisms are set up and how they contribute to aspects of neuronal development such as the shaping of axonal complexity is therefore a key question in cellular neuroscience.

The local metabolic activity has been best studied at synapses (Lee et al., 2018; Rangaraju et al., 2019; Rossi and Pekkumaz, 2019), which account for the majority of ATP consumption in neurons to ensure ionic homeostasis and synaptic vesicle recycling (Attwell and Laughlin, 2001; Harris et al., 2012; Rangaraju et al., 2014; Vos et al., 2010). In

agreement with this local metabolic need, mitochondria are actively transported to and captured at presynapses (J. Courchet et al., 2013; Devine and Kittler, 2018; Hollenbeck and Saxton, 2005; Misgeld and T. L. Schwarz, 2017). Mitochondrial function has been proposed to support synaptic release through a crosstalk between ATP-producing oxidative phosphorylations (Ashrafi et al., 2020; Rangaraju et al., 2014) and calcium buffering (Hirabayashi et al., 2017; Kwon et al., 2016; Vaccaro et al., 2017; Villegas et al., 2014), converging on the fine-tuned regulation of synaptic vesicle release. In contrast, the regulation of local metabolism in immature neurons and during axon morphogenesis is far less well-understood. Recent studies uncovered that mitochondria function is critical for neuronal development and cortical circuits formation (Fernandez et al., 2019; Klein Gunnewiek et al., 2020; Oruganty-Das et al., 2012).

Deregulation of mitochondria positioning, morphology or function disrupts the formation of axonal projections *in vivo* (J. Courchet et al., 2013; Fernandez et al., 2019; Lewis et al., 2018). In developing retinal and sensory axons, mitochondria function has been linked to the local protein synthesis required for cytoskeleton remodeling and the conversion of filopodia into a collateral axonal branch (Cioni et al., 2019; Spillane et al., 2013; Wong et al., 2017). However it is unclear if all neuronal subtypes or if all modalities of axonal branching rely on the same mechanisms for branch formation, growth or consolidation. Hence there is a need to better understand the cellular mechanisms underlying the role of mitochondrial function in the formation and refinement of axon morphogenesis and thereby the establishment of circuit connectivity.

We previously identified that a signaling pathway formed by the kinases LKB1 (STK11) and NUA1 (ARK5) control cortical axon branching through the regulation of mitochondria capture at immature presynaptic sites (J. Courchet et al., 2013). NUA1 belongs to a family of 14 closely related kinases related to the metabolic regulator AMPK (PRKAA) defining the so-called AMPK-related kinases (AMPK-RK) family (Lizcano et al., 2004). NUA1 expression is strongly enriched in the developing mouse cortex (Hirano et al., 2006; Ohmura et al., 2012). Rare *de novo* mutations of NUA1 have been associated to several neurodevelopmental disorders including Autism Spectrum Disorders (ASD) (Iossifov et al., 2014; 2012), Attention Deficit / Hyperactivity Disorders (ADHD) (Alemany et al., 2015), cognitive impairment (Johnson et al., 2016) or hydrocephaly (Vojinovic et al., 2018). In mice, NUA1 heterozygosity affects cortical development, leading

to an array of anatomical and behavioral deficits (V. Courchet et al., 2018). So far, the cellular functions of NUA1 remain incompletely known. It has been linked to the control of the actomyosin cytoskeleton through the phosphorylation of the Protein Phosphatase 1 (PP1) regulatory subunit MYPT1 (Zagórska et al., 2010). Furthermore NUA1 directly phosphorylates the microtubule-associated protein TAU (Lasagna-Reeves et al., 2016) and accordingly NUA1 inhibition can alleviate some of the cellular and behavioral effects in a mouse model of tauopathy. In parallel NUA1 function has been tied to the regulation of mitochondrial metabolism in Myc-overexpressing cancer cells, who rely on NUA1 expression to maintain metabolic homeostasis and for survival (Liu et al., 2012).

Our previous observation that axonal mitochondria capture at nascent presynaptic boutons is essential for terminal axon branching (J. Courchet et al., 2013) raised a central and unresolved question pertaining to the function of presynaptic mitochondria in axon branching. In this study, we explored the hypothesis that presynaptic mitochondria have a unique property with regard to their ability to promote branch formation or stabilization in cortical pyramidal neurons (PNs). We observed that axon elongation and collateral branching rely on distinct metabolic pathways. We further characterized that mitochondria accumulate specifically at presynaptic sites located at axonal branch points, and that unlike presynaptic boutons that are formed before axonal branches, mitochondria recruitment occurs after the onset of branch formation. Through mitochondria photoinactivation, we confirmed that in cortical PNs, mitochondria are required for branch stabilization rather than branch initiation. We subsequently characterized mitochondrial function in NUA1 deficient neurons and report that NUA1 controls not only mitochondrial trafficking, but also mitochondrial metabolic activity. Finally using pharmacological and genetic approaches to boost mitochondrial fitness, we observed that a metabolic upregulation is sufficient to rescue axonal branching in NUA1 deficient neurons *in vitro* and *in vivo*. Overall, our results indicate that the kinase NUA1 exerts a dual effect on mitochondria trafficking and activity in cortical PNs and suggest a two-hit model by which branch stabilization relies not only on the proper localization of mitochondria, but also on their local activity.

RESULTS

Cortical axon elongation and collateral branching rely on distinct metabolic pathways

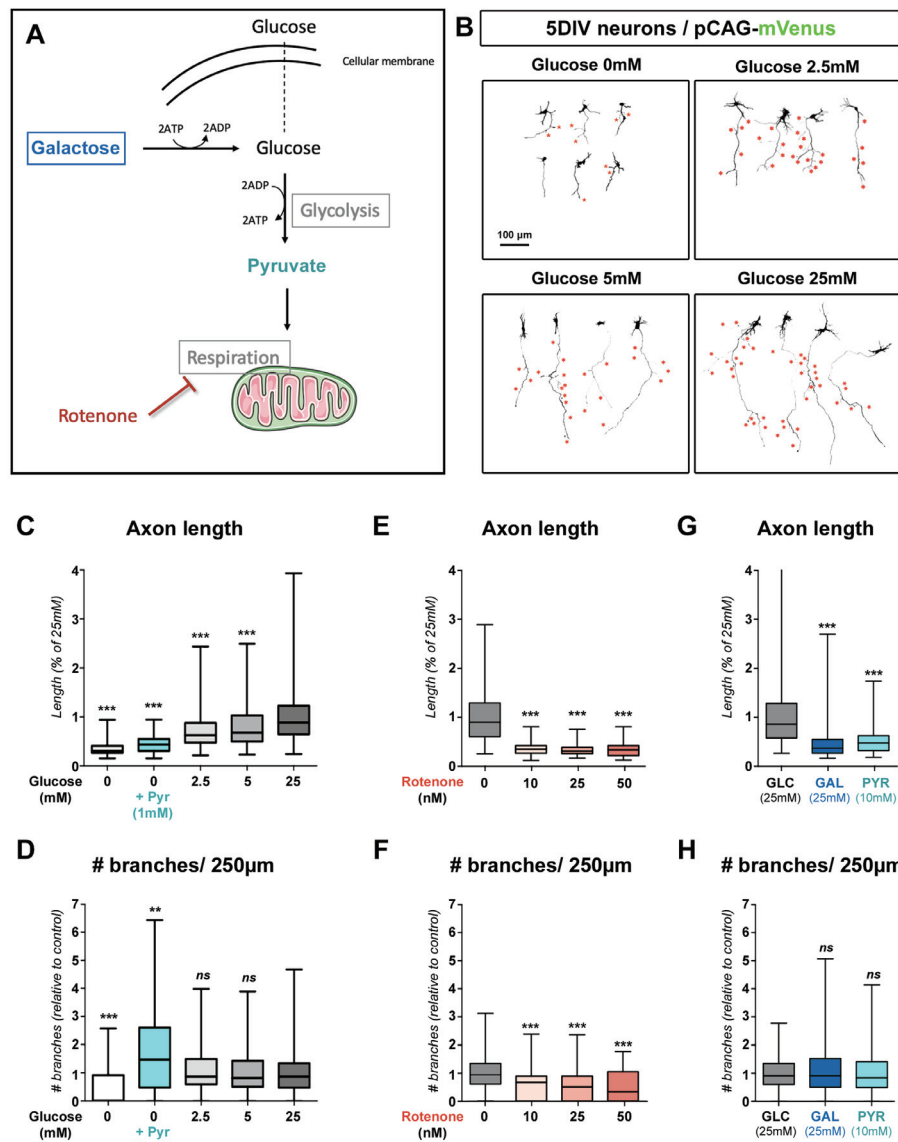


Figure 1: differential requirement of glycolysis and oxidative metabolism for axon growth and branching

(A) Main pathways of glucose metabolism. Galactose was used to negate the metabolic effect of glycolysis. Pyruvate was used to support mitochondrial metabolism in a glucose-free medium. Low doses of rotenone were used to lower mitochondrial Complex I activity.

(B) Representative images of mVenus expressing cortical neurons (5DIV) cultured in Neurobasal medium containing the indicated doses of glucose. Red stars point to collateral branches of the axon.

(C-H) Quantification of axon length and collateral branches of 5DIV neurons in the indicated conditions: (C-D) medium containing increasing concentrations of glucose. (E-F) 25mM glucose-containing medium with increasing doses of rotenone. (G-H) medium containing either glucose (25mM), or galactose (24mM) + glucose (1mM), or pyruvate (10mM) without glucose.

Box-plot: 75th percentile, median and 25th percentile. Statistical tests: Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test (each condition compared to untreated 25mM condition). (C-D) $N_{(0mM)}=48$, $N_{(0mM+Pyr)}=75$, $N_{(2.5mM)}=244$, $N_{(5mM)}=191$, $N_{(25mM)}=238$. (E-F) $N_{(0nM)}=120$, $N_{(10nM)}=102$, $N_{(20nM)}=82$, $N_{(50nM)}=44$. (G-H) $N_{(Glucose)}=246$, $N_{(Galactose)}=248$, $N_{(Pyruvate)}=130$

We first tested how axon morphogenesis rely on glucose metabolism (Fig. 1A). Cortical and hippocampal neuronal cultures are classically grown in a glucose-rich medium. To determine to what

extent axonal elongation and collateral branching rely on glucose as a source of carbon, we cultured cortical neurons in neurobasal medium with no glucose, or with low (2.5mM), medium (5mM) and high (25mM)

concentrations of glucose. We observed a marked dose-response effect of medium glucose concentration on axon development (Fig. 1B). Quantifications revealed that axonal length increases as a function of glucose concentration (Fig. 1C). In contrast, the number of collateral branches was dependent upon the presence, but not quantity of glucose (Fig. 1D). Interestingly a low dose of pyruvate (1mM) was also sufficient to support axonal branching, suggesting that collateral branch formation or stabilization is largely dependent upon mitochondrial metabolism.

To test this hypothesis further, we next used strategies to decouple the two main pathways of glucose catabolism, i.e. glycolysis and mitochondrial respiration (Fig. 1A). We used low doses of rotenone, an inhibitor of OXPHOS complex I, to downregulate mitochondrial oxidative phosphorylation capacity without affecting glycolysis. This led to a decrease of both axon length and collateral branching (Fig. 1E-F and Fig. S1A). Conversely, we bypassed glycolysis either by replacing glucose by galactose (a 6-carbon sugar catabolized by the glycolytic machinery but negating the net ATP production of glycolysis), or by adding pyruvate to a no-glucose medium. In both case, axon branching was largely equivalent to control conditions (25mM glucose) despite a strong adverse effect on axon length (Fig. 1G-H and Fig. S1B-C). Interestingly glucose concentration also affected the number of dendritic branches formed by neurons. Dendrite growth and branching was reduced, albeit slightly, in conditions where glycolysis was bypassed, whereas reduction of dendritic growth and branching was significantly more pronounced upon mitochondria inhibition by rotenone (Fig. S1D-F). Taken together, our results show distinct metabolic requirement for axon elongation and collateral branching and suggest that mitochondrial oxidative phosphorylation is necessary and sufficient for axon branch formation and/or consolidation.

Mitochondria cluster at axonal branchpoint of cortical pyramidal neurons

The importance of oxidative metabolism for axonal branching prompted us to define the position of axonal mitochondria relative to collateral branches in cortical pyramidal neurons (PNs). Indeed previous studies by us and others linked branching with the trafficking and distribution of axonal mitochondria (J. Courchet et al., 2013; Sainath et al., 2017; Spillane et al., 2013). We performed *Ex Vivo* Cortical Electroporations (EVCE) of plasmids encoding the fluorescent protein BFP together with mitochondria-targeted DsRed and the synaptic vesicle marker vGlut1-GFP as a marker of immature presynaptic

boutons in cortical layer 2/3 PNs mitochondria (Fig. 2A-B). After 5 days of culture *in vitro* (DIV), cortical PNs were fixed and imaged to analyze the distribution of mitochondria along the axon. Mitochondria were not distributed evenly along the axon, but rather we could observe zones of high mitochondrial density and zones of low mitochondrial density (Fig. 2A-C). The observed distance from a given mitochondrion to its nearest neighbor was significantly lower than the expected distance if mitochondria were evenly distributed along the axon (Fig. 2D), indicating that mitochondria form clusters along developing axons of cortical PNs. We observed that branchpoints are significantly closer to a mitochondrion than a random position in the axon (Fig. 2E) and that mitochondria density was higher at branch origin than in any random location along the axon shaft (Fig. 2F). Accordingly, branches were found in regions of high mitochondria density more frequently than in regions of low mitochondria density (Fig. 2G).

We previously identified that presynaptic capture of mitochondria is required for axonal branching *in vitro* and *in vivo* (J. Courchet et al., 2013). However, since vGlut1-positive puncta outnumber mitochondria along the axon, it is unclear if all presynaptic boutons are equally important for axonal branching. We thus performed extensive correlation of mitochondria position and presynaptic boutons along the axon (Fig. 2C). As it is the case for mitochondria, the distance between vGlut1-positive puncta was lower than expected if puncta were evenly distributed, indicating that presynaptic boutons form clusters along the axon (Fig. 2H). These clusters were significantly closer and denser at branchpoints compared to along the axon (Fig. 2I-J). Virtually all branches had a vGlut1-positive cluster at their origin, and more than half of them also had resident mitochondria (Fig. 2K). Accordingly, presynaptic boutons located to branchpoint are more likely to be associated to mitochondria compared to boutons located along the axon (Fig. 2L). Finally, we tested if the distribution of synaptic puncta and mitochondria is conserved in an *in vivo* setting by performing *In Utero* Cortical Electroporation (IUCE) targeting callosal-projecting superficial (layer 2/3) PNs. The axon formed by these neurons projects toward the white matter (WM) and form collateral branches on layer 5 specifically (Fig. S2A-B). As expected, these axons form more synaptic puncta on layer 5 compared to the adjacent layers IV and VI. In comparison mitochondria density showed a progressive reduction with distance from the soma, but no specific enrichment in the branch-rich layer 5 (Fig. S2C-D). However, as we observed *in vitro*, the large majority of axonal branches had a vGlut1-positive cluster at their origin, and branch-

associated vGlut1 puncta were more likely to harbor a mitochondrion than vGlut1 puncta along the axon (Fig. S2E-F). Taken together, our results strongly suggest that mitochondria are not randomly recruited to nascent presynaptic boutons but rather preferentially associate to vGlut1 puncta located at branch origin.

Mitochondria are recruited after, and not prior to branch formation

Since our results presented so far relied primarily on static imaging, we next sought to determine the spatio-temporal dynamics of presynaptic bouton and mitochondria recruitment relative to branch formation. To do so we used EVCE and performed time-lapse

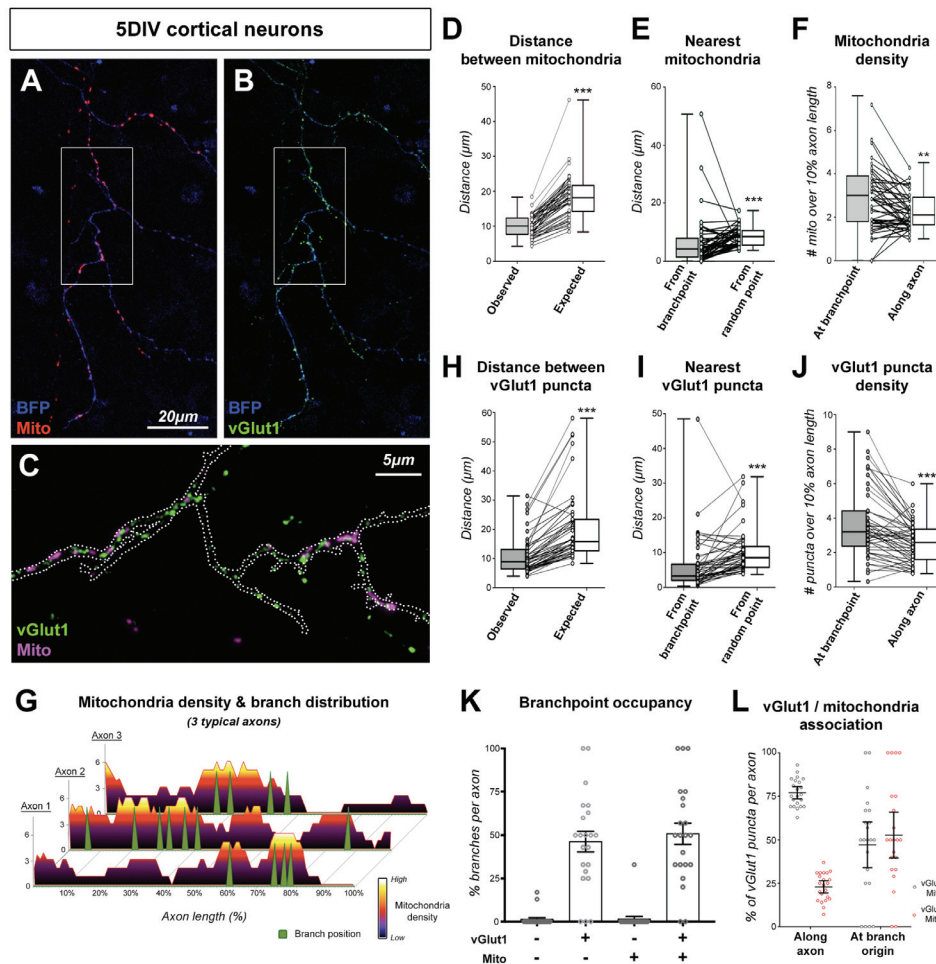


Figure 2: presynaptic sites and mitochondria clustering at axonal branchpoints

(A-B) Representative images of a 5DIV cortical neuron following expression of the mitochondrial marker mito-DsRed (A) or the presynaptic marker vGlut1-GFP (B). BFP was used to visualize neuronal morphology. Magnification of a segment of axon (C) shows vGlut1-GFP and mito-DsRed localization relative to branch origin (white dotted line).

(D-I) Quantification of mitochondria (D-F) and presynaptic puncta (G-I) distribution in the axon. The following quantifications were performed: (D;G) observed minimal distance between objects compared to expected distance if objects were evenly distributed. (E;H) Observed minimal distance from branchpoint compared to average distance from a random point along the axon. (F;I) Object density at branchpoint compared to average density along the axon. Box-plot: 75th percentile, median and 25th percentile. Individual dots represent average (per axon). Statistical tests: Wilcoxon matched-pairs ranked test. $N_{(mito)}=46$, $N_{(vGlut1)}=48$ out of 3 independent neuronal cultures.

(J) Representation of mitochondria density along the axon (normalized to axonal length from origin (0%) to extremity (100%)). Position of collateral branches (green arrowhead) correlates with regions of high mitochondrial density.

(K) Quantification of branchpoint occupancy by either vGlut1+ puncta, mitochondria, or vGlut1+ puncta and mitochondria. Each point represents the value (%) for a given axon. Bars: average \pm SEM. $N=22$ axons out of 2 independent experiments.

(L) Proportion of vGlut1 puncta devoid (grey) or associated to (red) mitochondria along the axon, and at branchpoints. $N=22$ axons out of 2 independent experiments. Bars: median \pm 95% CI

imaging of nascent presynaptic boutons (defined as vGlut1 positive puncta) and mitochondria (marked with mito-DsRed) over 24 hours periods in 5-7DIV

PNs (Fig. S3A-B). To alleviate phototoxicity while preserving spatio-temporal dynamics, we performed pulses of high-frequency imaging (5 minutes at 12

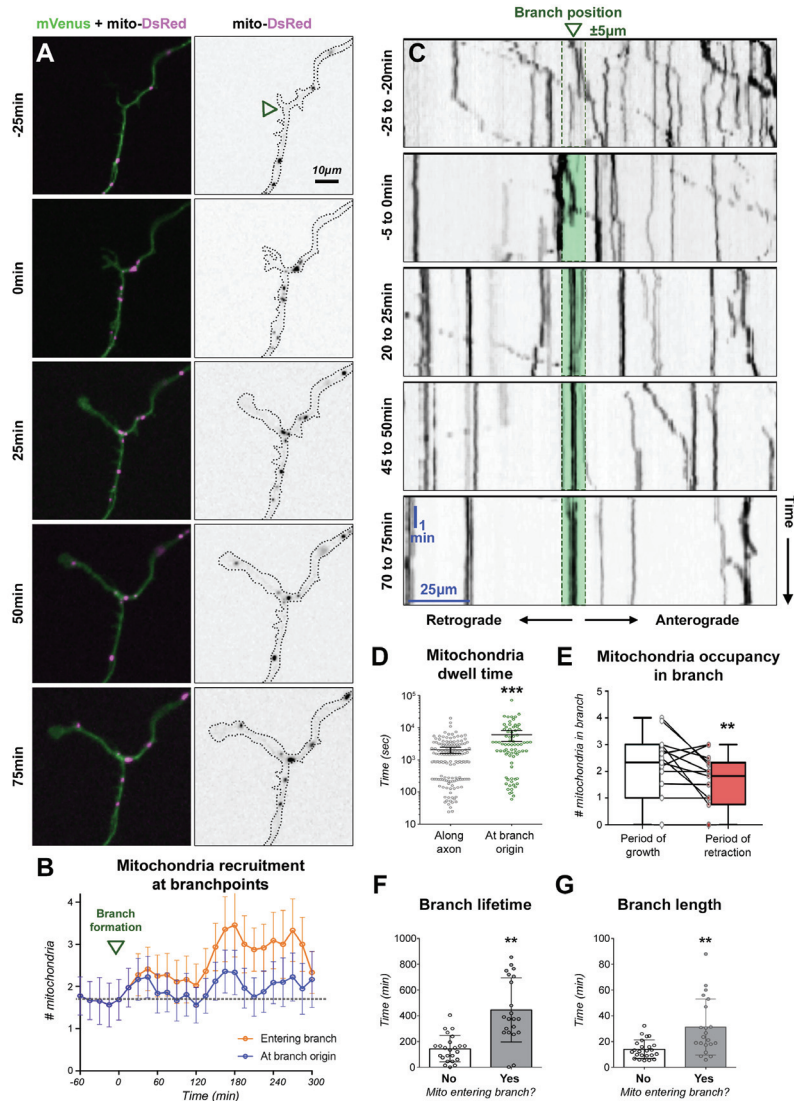


Figure 3: dynamics of mitochondria recruitment at branch origin and inside branches

(A) Time-lapse imaging of a spontaneous branch formation from the axon of a cortical PN at 5DIV following EVCE of mVenus (green) and mito-DsRed (magenta) coding plasmids. Branch apparition defined by length $>5\mu\text{m}$ and a growth-cone like structure was considered $T=0\text{min}$. (B) Dynamics of mitochondria recruitment at branch origin (blue) or at branch origin and inside branch (orange) over time. Data: average \pm SEM, $N=12$ axons. (C) Kymographs of axonal mitochondria centered around branch position (green arrowhead) from axon in (A).

(D) Mitochondria dwell time at branch origin ($\pm 5\mu\text{m}$) compared to dwell time along the axon. Time was represented on a logarithmic scale. Each point represents a mitochondrion. $N_{(\text{along axon})}=143$, $N_{(\text{branch origin})}=75$ out of 14 axons. Bars: median \pm 95% CI. Statistical test: Mann-Whitney.

(E) Comparison of mitochondria occupancy in a branch during periods of growth (white) or retraction (red). Box-plot: 75th percentile, median and 25th percentile. Individual dots represent average over period (per branch), $N=15$ branches. Statistical test: Wilcoxon matched-pairs ranked test.

(F-G) Correlation of mitochondria entry into a branch with lifetime (F) and length (G). Bars: median \pm 95% CI. Each dot represents a spontaneous branch formation event. $N_{(\text{No})}=24$; $N_{(\text{Yes})}=21$. Statistical test: Mann-Whitney

frames per minute) followed by periods with low frequency imaging (20 minutes at 0.1 frames per minute). We detected 45 events of spontaneous branch formation over 24 neurons and quantified presynaptic boutons and mitochondria localization at branchpoints and within branches, as well as axonal branch length and lifetime.

Studies in the *Xenopus* and Zebrafish demonstrated that axonal collateral branches from RGC neurons originate from presynaptic sites (Javaherian and Cline, 2005; Meyer and Smith, 2006; Ruthazer et al., 2006). We confirmed some of these findings in mouse cortical PNs (**Fig. S3C**): time-lapse longitudinal imaging revealed that presynaptic boutons form along the axon before the formation of collateral branches. Furthermore, these presynaptic boutons remained stable at branch origin and additional vGlut1 clusters formed inside the branch as it consolidates.

In mouse sensory axons, mitochondria recruitment at sites of local protein synthesis promote filopodia and branch formation (Spillane et al., 2013). However, in cortical PNs, we observed that mitochondria were recruited to branchpoints after, and not prior to, branch formation (**Fig. 3A** and **Fig. S3D**). Immediately following the turning of filopodia to new axonal branches (as defined by the formation of a growth-cone like structure, $T=0$ min), mitochondria started clustering at branch origin. On average the number of mitochondria increased by 42% at branchpoints within 30 minutes of branch formation (**Fig. 3B**). In parallel we assessed local changes in mitochondria motility around axonal branch points (**Fig. 3C**). Following branch formation, we observed clustering of immobile mitochondria within 5 μ m of branch origin (green box in **Fig. 3C**). In contrast, mitochondria passing in the corresponding region of the axon before branch formation only displayed short dwelling periods. Individual mitochondria dwell time at branch origin was significantly longer than at other positions along the axon (**Fig. 3D**).

Furthermore, we observed that mitochondria entered newly formed collateral branches shortly after clustering at branch origin (**Fig. 3A**, $T=50$ min and **Fig. S3D**). Within 2 hours of branch formation, there was a marked increase of mitochondria entering branches (**Fig. 3B**). The number of mitochondria inside branches was correlated with periods of extension and decreased when branches were retracting (**Fig. 3E**). Accordingly, mitochondria entering branches were correlated with increased length and lifetime (**Fig. 3F-G**). On the contrary branches that failed to recruit mitochondria rapidly retracted (**Fig. S3E**). Overall, our results demonstrate that contrary to sensory axons, branch formation precedes

mitochondria clustering but also revealed that mitochondria are involved in axonal branch stabilization in mouse cortical PNs.

Mitochondria are required for branch stabilization

We next tested how the local pool of mitochondria is required for branch stabilization by performing Chromophore-Assisted Light Inactivation (CALI) of mitochondria (Bulina et al., 2006a; 2006b). As a proof of principle, we co-expressed the genetically-encoded photosensitizer Killer-Red (mito-KR) (Bulina et al., 2006b; 2006a) targeted to the mitochondrial matrix together with the biosensor mito-roGFP2 (Gutscher et al., 2008) to measure ROS production in mitochondria following photosensitization in HeLa cells. Following a single 30sec laser pulse, mito-KR induced a strong production of ROS in mitochondria restricted to the laser-targeted Region Of Interest (ROI) (**Fig. S4A-D**). Furthermore, CALI led to a rapid fragmentation of mitochondria in the ROI (**Fig. S4E-G**). We observed no change in roGFP2 signal in the cytosol even 30 minutes following CALI, suggesting minimal ROS leakage from damaged mitochondria (**Fig. S4H**). CALI on control fluorescent protein mt-DsRed did not induce significant morphological changes in mitochondria or accumulation of ROS (**Fig. S4D-G**).

We subsequently expressed mito-KR in cortical PNs by EVCE and targeted axonal mitochondria for photosensitization. As observed in HeLa cells, a 30sec laser pulse induced a rapid accumulation of ROS in mitochondria, restricted to the ROI (**Fig. 4A-B**). We then assessed the local metabolic consequences of axonal CALI by expressing PercevalHR, a genetically-encoded biosensor for the ATP:ADP ratio. Following laser illumination of mito-KR, we measured an immediate drop in PercevalHR signal, indicating a local decrease of the ATP:ADP ratio (**Fig. 4C**). The reduction in PercevalHR signal was persistent over 60 minutes and largely restricted to the ROI (**Fig. 4D-E**). In contrast PercevalHR signal was not affected by laser illumination upon expression of control mt-DsRed (**Fig. 4F**).

Finally, we expressed mito-KR together with the green fluorescent protein mVenus by IUCE and observed axon morphogenesis over 12 hours time-lapse movies (**Fig. 4G**). Localized photoinactivation of mitochondria significantly altered branch dynamics in the ROI, by promoting branch retraction and decreasing branch growth, whereas this effect was not observed on the same axon outside of the ROI, indicating that overall axonal viability is not affected. In contrast, laser illumination had little effect on branch dynamics upon expression of mt-DsRed (**Fig. 4H-K**). Taken together, our results demonstrate that

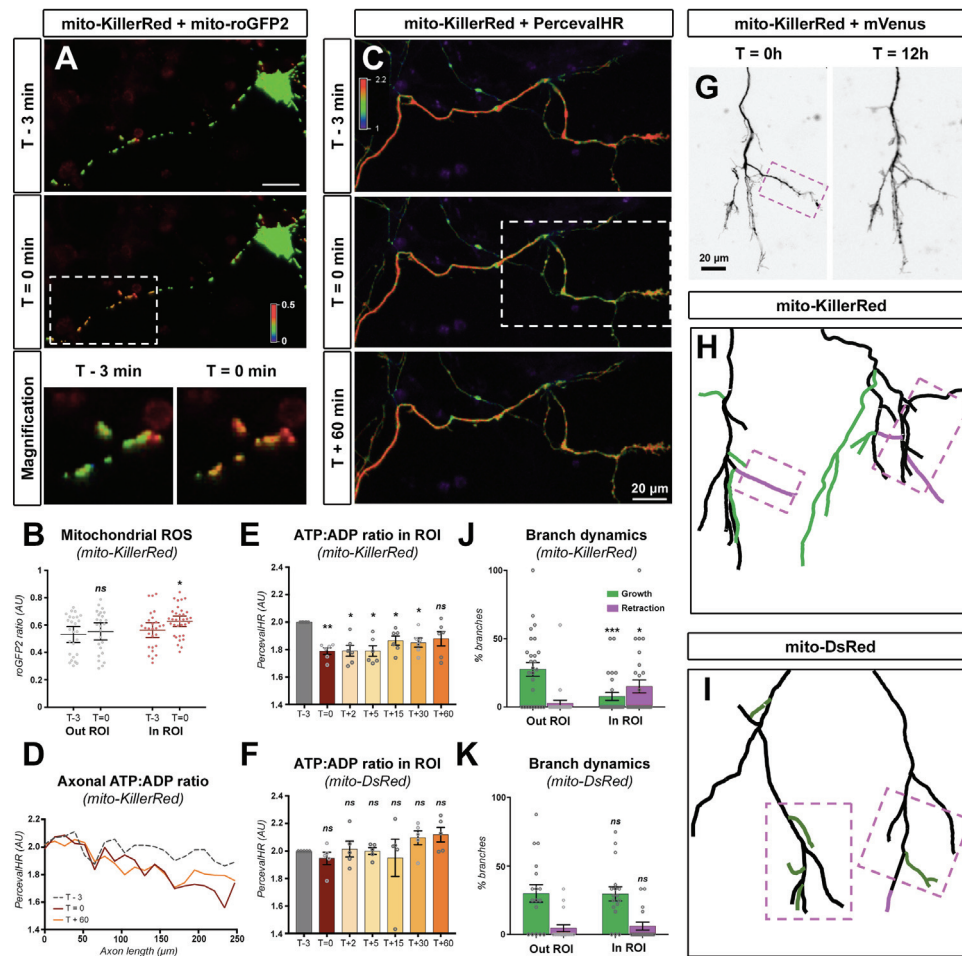


Figure 4: mitochondria CALI disrupts branch stabilization

(A) Typical neuron at 5DIV expressing mt-KR. At T=0min, CALI was performed by a 30sec laser pulse in the Region of Interest (ROI, white box). ROS was measured by mito-roGFP2 fluorescence (red = oxidized, blue = reduced). (B) Mitochondria ROS accumulation was measured outside and inside of the ROI before and immediately after CALI. Each point represents roGFP2 signal (Ex405:Ex488 ratio, see methods) for a given mitochondrion. Bars: average \pm 95% CI. Analysis: Unpaired t-test. $N_{(T=-3, OUT)}=26$, $N_{(T=0, OUT)}=25$, $N_{(T=-3, IN)}=27$, $N_{(T=0, IN)}=34$ mitochondria out of 7 independent experiments.

(C) Measurement of the ATP:ADP ratio with PercevalHR in the axon of cortical PNs expressing mt-KR. CALI was performed in the indicated ROI (white box). (D) PercevalHR signal (Ex488:Ex405 ratio, see methods) was measured along the axon in (C) at the indicated time-points. (E-F) Average PercevalHR signal in the ROI of neurons expressing mt-KR or the control mt-DsRed. Bars: average \pm SEM. Analysis: Repeated measures ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. N=5 axons out of 5 independent experiments.

(G) Time-lapse imaging of axon growth over 12 hours following CALI (magenta box). mVenus fluorescence was used to assess axonal morphology. (H-I) Examples of axon (schematic reconstruction) expressing mt-KR or the control mt-DsRed. Growing/new branches (green) and retracting branches (magenta) were observed over 12 hours and quantified in and out of the ROI (J-K). Bars: average \pm SEM. Analysis: 2way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test. Growth or retraction in ROI was compared to out ROI. $N_{(KillerRed)}=27$ axons, $N_{(DsRed)}=17$ axons out of 4 independent experiments.

mitochondria are required locally to promote branch stabilization.

NUAK1 kinase controls axonal mitochondrial metabolism

The observation that mitochondrial metabolism is necessary and sufficient to promote collateral

branching (**Fig. 1**) and that mitochondria are required locally for axonal branch stabilization (**Fig. 3**) raises the question of their local function. We previously reported that the Serine/Threonine kinase NUA1 controls terminal axon branching through the control of mitochondria capture at presynaptic sites in developing PNs (J. Courchet et al., 2013).

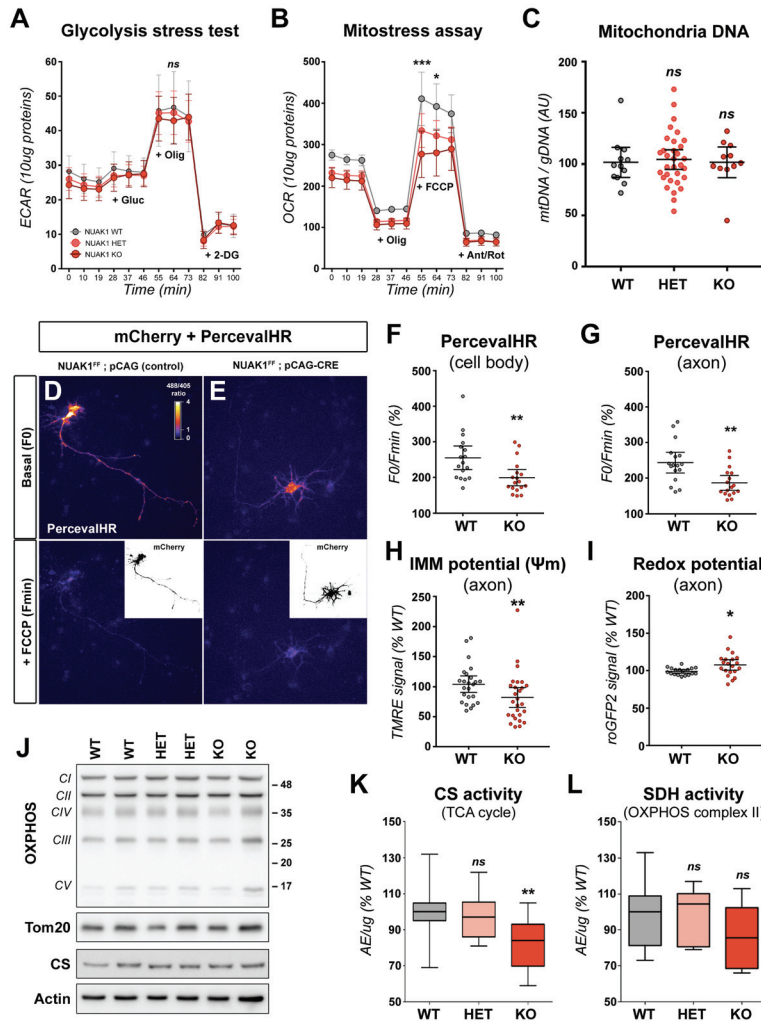


Figure 5: mitochondrial metabolism is altered in NUAK1-deficient neurons

(A-B) Measurement of glucose metabolism in 5DIV cortical neurons cultures from the indicated genotypes. ExtraCellular Acidification Rate (ECAR) and Oxygen Consumption Rate (OCR) were measured respectively to assess glycolysis and oxidative metabolism. Data: average \pm SEM. $N_{WT}=9$, $N_{HET}=27$, $N_{KO}=9$.

(C) Measurement of mitochondrial content in cortical neurons cultures of the indicated genotypes. Mitochondrial and genomic DNA was measured by quantitative PCR. Each point represents a distinct culture. Bars: average \pm 95% CI. Analysis: Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test. $N_{WT}=12$, $N_{HET}=32$, $N_{KO}=11$.

(D-E) Measurement of the ATP:ADP ratio in 5DIV NUAK1^{F/F} neurons transfected with a control (D) or a CRE coding plasmid (E). Excerpt: mCherry fluorescence was used to determine neuronal morphophogy. PercevalHR signal is displayed as a fluorescence ratio between 488 and 405 illumination using a Fire LUT (White: high ratio. Blue: low ratio)

(F-G) Measurement of the ATP:ADP ratio in NUAK1^{F/F} neurons expressing a control (WT) or CRE-expressing plasmid (KO). Each point represents average values for a given neuron. Bars: average \pm 95% CI. $N_{WT}=18$, $N_{KO}=18$ out of 3 independent experiments.

(H-I) Measurement of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) or redox potential (GRX1-roGFP2) in the axon of NUAK1^{F/F} neurons expressing a control (WT) or CRE-expressing plasmid (KO). Each point represents average values for a given neuron. Bars: average \pm 95% CI. Analysis: Unpaired t-test with Welch's correction. (H) $N_{WT}=24$, $N_{KO}=27$ out of 5 independent experiments. (I) $N_{WT}=18$, $N_{KO}=20$ out of 4 independent experiments.

(J) Typical Western-blot showing the expression of OXPHOS proteins in mitochondria from cortical neuronal cultures of the indicated genotypes.

(K-L) SDH and CS enzymatic activity relative to protein quantity (normalized to WT). Box-plot: 75th percentile, median and 25th percentile. Analysis: One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test. $N_{WT}=13$, $N_{HET}=8$, $N_{KO}=10$ independent samples.

Interestingly NUAK1, a kinase related to the master metabolic regulator AMPK (Lizcano et al., 2004) is also involved in mitochondrial metabolism in c-Myc

dependent cancer models (Liu et al., 2012). We therefore sought whether NUAK1 controls mitochondrial function as well in cortical PN. Using

a Seahorse analyzer, we measured the glycolytic and respiratory capacity of 7 DIV neuronal cultures from NUA1^{+/+} (WT), NUA1^{+/-} (HET) or NUA1^{-/-} neurons (KO). There was a dose-response decrease in both the basal and maximal respiratory rate upon deletion of NUA1, whereas glycolysis was largely unaffected (Fig. 5A-B). Importantly there was no difference in mitochondrial DNA content in NUA1 KO neuronal cultures compared to WT conditions, thus ruling out that the decreased respiratory rate is a secondary consequence of impaired mitochondria biogenesis (Fig. 5C). To confirm these results, we assessed the overall metabolic consequence of NUA1 knockout by measuring the ATP:ADP ratio with the biosensor PercevalHR. In 5DIV neuronal cultures following EVCE of plasmids encoding CRE together with PercevalHR, we observed a marked decrease of the ATP:ADP ratio in NUA1 KO neurons (Fig. 5D-E). After quantification, the average PercevalHR signal was decreased by 21.9% in NUA1 KO neurons compared to control cortical PNs (Fig. 5F). Interestingly, the decrease in PercevalHR signal was even more pronounced in the axon of NUA1 KO neurons (-23.4%) (Fig. 5G).

The decreased respiratory rate suggested that NUA1 is required not only for mitochondria trafficking, but also for proper mitochondria function in axons. To test this hypothesis, we turned to microscopy-based strategies to directly investigate mitochondrial function. Cortical neuron cultures were performed from floxed NUA1 embryos (NUA1^{FF}; (V. Courchet et al., 2018)) in order to achieve sparse, single-cell NUA1 inactivation. CRE recombinase encoding plasmids were electroporated together with plasmids encoding the fluorescent protein mVenus and the mitochondrial marker mito-BFP. At 5DIV, cultures were exposed to Tetra-Methyl-Rhodamine Ethyl-ester (TMRE) to measure mitochondrial inner membrane potential (Ψ_m). We observed a marked decrease of Ψ_m in the axon of NUA1 KO neurons, compared to control cortical PNs electroporated with a non-CRE expressing plasmid (Fig. 5H and Fig. 5SA). In parallel, we measured axonal mitochondrial redox potential using a mitochondria-targeted roGFP2. We observed a shift of roGFP2 signal toward a more oxidized state in NUA1 KO neurons, suggesting an increased ROS production by axonal mitochondria (Fig. 5I and Fig. 5SB).

To check whether the low Ψ_m and oxidized mitochondria state is a secondary consequence of the increased trafficking of NUA1 KO neurons, we measured TMRE and roGFP2 fluorescence in wild-type neuronal cultures and sorted out motile versus stationary mitochondria (Fig. 5SC-F), however there was no difference in either measured parameter.

Altogether, our results strongly argue that mitochondria function is decoupled from mitochondria trafficking in the axon and therefore suggest that NUA1 regulates not only presynaptic mitochondria capture but also mitochondrial metabolic function.

Finally, we turned to biochemical assays to determine if mitochondria are defective *per se* or if mitochondria impairment is context-dependent. Specifically we sought to confirm that the alterations in mitochondrial metabolism resulting from NUA1 loss are conserved in an *in vivo* setting. We measured the activity of two key mitochondrial enzymes, Citrate Synthase (CS), a key enzyme of the Citric Acid Cycle, and of Succinate Dehydrogenase (SDH), forming the complex II of the mitochondrial respiratory chain. We observed a marked, dose-dependent reduction of CS from mitochondria extracted of the cortex of NUA1 KO mice (Fig. 5K). We measured a similar, although not statistically significant, reduction in SDH activity from NUA1 KO cortices (Fig. 5L). As a control, we checked the expression of OXPHOS supercomplexes and CS by Western-blot but observed no change with NUA1 expression (Fig. 5J).

Taken together, our results indicate that NUA1 controls not only mitochondria positioning but also mitochondria function along the axon and suggest that a metabolic imbalance may account for the axon branching phenotype of NUA1 KO neurons.

Upregulation of mitochondria function rescues collateral branching

In order to determine if there is a direct, causal, link between the downregulation of mitochondrial metabolic activity and the reduction in collateral branching in NUA1 KO axons, we devised strategies to upregulate mitochondria function. Our prediction was that, improving mitochondrial fitness should rescue collateral branching in NUA1 deficient neurons. Based on published studies, we treated cortical PNs with the cell-permeant mitochondria modulator L-Carnitine (Dickey and Strack, 2011; Sainath et al., 2017), a cell-permeant, lysine-derived quaternary amine that acts by promoting the metabolism of long-chain fatty acids by the mitochondria. It has been shown to be neuroprotective in a wide variety of metabolic stresses (Tefera and Borges, 2016; Zanelli et al., 2005) and has clinical interest in the treatment of depression and anxiety (Chiechio et al., 2017; Filiou and Sandi, 2019).

We achieved single-cell knockout of NUA1 through EVCE of CRE-coding plasmid in NUA1^{FF} cortical

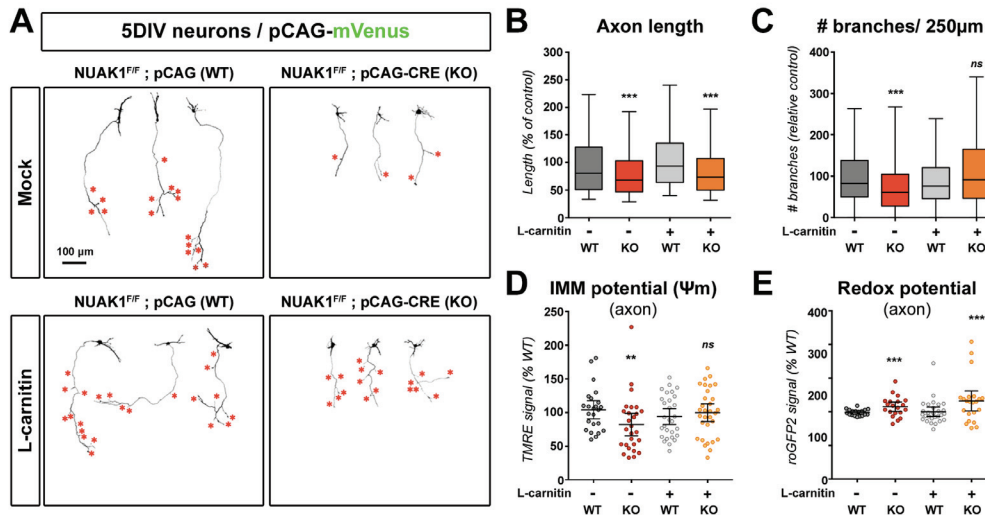


Figure 6: upregulation of mitochondrial function rescues axon branching in NUAK1-deficient neurons
 (A) Representative images of mVenus expressing cortical neurons of NUAK1^{F/F} background and electroporated with a control or CRE-coding plasmid. At DIV2 neurons were treated with L-Carnitine (1mM). Red stars indicate collateral branches.
 (B-C) Quantification of axon length and collateral branches of 5DIV neurons in the indicated conditions. Box-plot: 75th percentile, median and 25th percentile. Statistical tests: Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test (each condition compared to untreated WT condition). N_(WT)=399, N_(KO)=232, N_(WT+L-Cam)=387, N_(KO+L-Cam)=256 out of 5 independent experiments.
 (D-E) Effect of L-Carnitine on the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and redox potential of WT and KO neurons. Untreated samples from experiment in Figure 5D-E. Each point represents average values for a given neuron. Bars: average \pm 95% CI. Analysis: Unpaired t-test with Welch's correction. (D) N_(WT+L-Cam)=29, N_(KO+L-Cam)=31 out of 5 independent experiments. (E) N_(WT+L-Cam)=28, N_(KO+L-Cam)=22 out of 4 independent experiments.

PNs and quantified axon morphology at 5DIV. As previously reported (J. Courchet et al., 2013) NUAK1-null neurons had shorter axons (Fig. 6A) with a reduced number of collateral branches (red stars in Fig. 6A). Upon L-Carnitine addition to the culture medium, we observed no effects on axon length in control or NUAK1-null cortical PNs (Fig. 6B). In contrast, L-Carnitine addition to NUAK1-deficient neurons (but not control) increased collateral branch formation compared to untreated control or NUAK1-deficient neurons. When normalized to axonal length, L-Carnitine induced a complete rescue of collateral branches, without affecting axon elongation (Fig. 6B-C). Importantly, L-Carnitine treatment had no effect on wild-type neurons. As an alternative means to upregulate mitochondrial function, we treated neuronal cultures with the mitochondria-targeted electron carrier Vitamin K2/menaquinone (VK2) (Vos et al., 2012). Similar to the effect of L-Carnitine, we observed a normalization of axonal branching in NUAK1-deficient neurons without affecting axonal length in VK2 treated neurons (Fig. S6A-B). We next sought to confirm that L-Carnitine treatment upregulated mitochondrial function in NUAK1-null neurons. We turned to microscopy-based assays using TMRE to measure Ψ_m in 5DIV neuronal cultures. L-Carnitine treatment normalized Ψ_m in NUAK1 KO

neurons (Fig. 6D), indicating an upregulation of mitochondrial fitness. Interestingly, L-Carnitine had no effect on mitochondrial redox potential and failed to rescue the increased mito-roGFP2 signal in NUAK1-null neurons (Fig. 6E), thus ruling out that L-Carnitine rescues axonal branching through ROS scavenging. Accordingly, application of the ROS scavenger N-AcetylCysteine (N-AC) had no effect on axon branching despite the normalization of oxidative stress in treated neurons (Fig. S6C-E).

L-Carnitine rescues terminal axon branching in NUAK1 KO *in vivo*

Finally, we performed experiments to determine if metabolic upregulation can rescue terminal axon branching in NUAK1 KO mice *in vivo*. Our choice turned toward L-Carnitine because it presented several advantages: first it is virtually not toxic and especially it is used in humans for treatment in newborn babies to treat metabolic disorders and carnitine deficiency. Second, it is suitable for oral administration, and has been approved for use in veterinary medicine. We performed a conditional inactivation of NUAK1 in the dorsal telencephalon by breeding with the Nex^{CRE} mouse line (Goebbels et al., 2006) to induce cortex-specific post-mitotic deletion in all cortical PNs. We previously demonstrated that

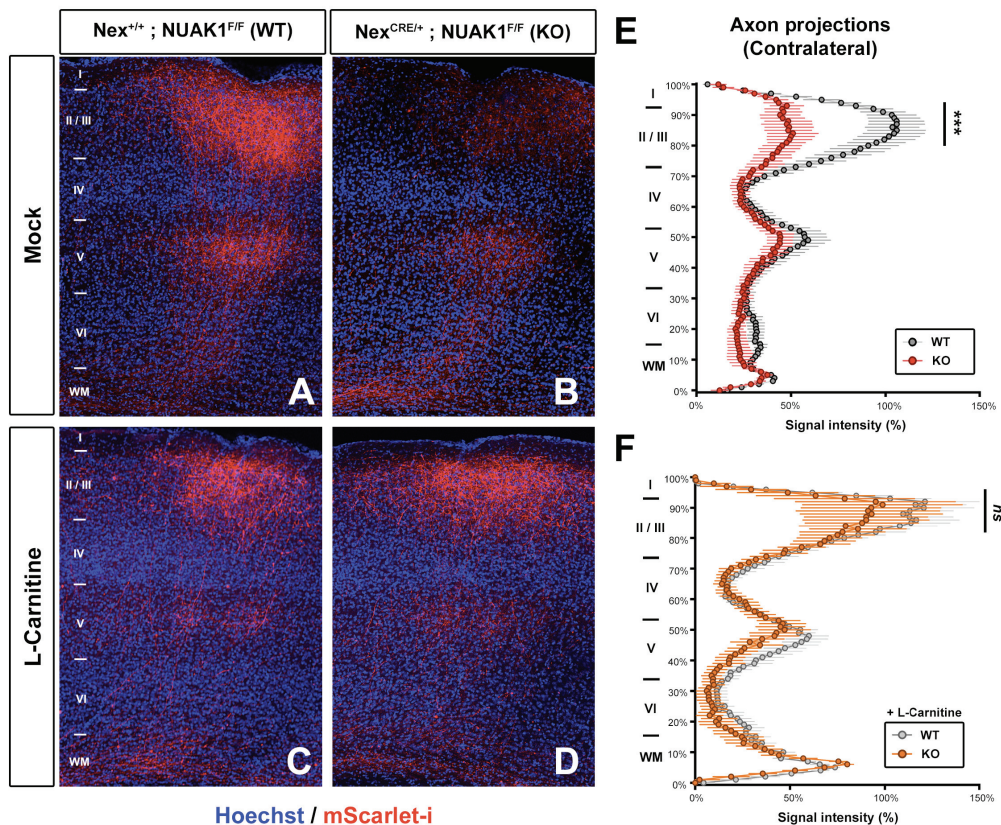


Figure 7: L-Carnitine treatment rescues terminal axon branching *in vivo*
(A-D) Representative images of contralateral terminal axon branching in Nex^{CRE/+}; NUAK1^{F/F} mice following IUCE with a plasmid coding the red fluorescent protein mScarlet-I. When indicated (C-D) animals were treated with L-Carnitine in drinking water. The observed decrease in terminal axon branching in KO animals (B) was rescued upon L-Carnitine treatment (D).
(E-F) Quantification of normalized mScarlet-I fluorescence along a radial axis in the contralateral cortex. Data: Average \pm SEM. Statistical tests: Two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison. $N_{WT}=8$, $N_{KO}=6$, $N_{WT+L-CAR}=10$, $N_{KO+L-CAR}=6$

this conditional genomic deletion leads to a significant decrease in terminal axon branching of contralaterally-projecting layer 2/3 axons (V. Courchet et al., 2018). Upon detection of gestation (at E13.5), time pregnant mice were treated with L-Carnitine in the drinking water, while the control group received only regular water. At E15.5, we performed *In Utero* Cortical Electroporation (IUCE) of plasmid coding the red fluorescent protein mScarlet-I as a neuronal cell filler (Bindels et al., 2017). Drug treatment was continued after birth and during lactation, and pups were sacrificed at weaning (P21) when cortical layer 2/3 PN axons display adult-like branching patterns (Fig. 7).

As expected, we could observe a decrease in terminal axon branching in KO mice (Nex^{CRE/+}; NUAK1^{F/F}) compared to controls (Nex^{+/+}; NUAK1^{F/F}) (Fig. 7A-B). On the contrary, terminal axon branching was undistinguishable

between WT and KO mice upon L-Carnitine treatment (Fig. 7C-D). Quantification confirmed that L-Carnitine treatment during pregnancy and lactation is sufficient to rescue axon branching, especially in contralateral layer 2/3 (Fig. 7E-F). Taken together, our results suggest that metabolic upregulation of mitochondrial function can rescue defective axon branching in NUAK1 deficient mice *in vivo*.

DISCUSSION

In the present study, we extended our previous observations that mitochondria distribution in the axon is necessary and sufficient for terminal branching, by providing new evidence that mitochondria positioning at axonal branch points and mitochondria function locally supports branch stabilization. We characterized that mitochondria capture at presynaptic boutons occurs preferentially

at boutons associated with axonal branch points. Finally, we observed that the AMPK-related kinase NUAK1 controls not only axonal mitochondria distribution but also mitochondrial function and that upregulation of mitochondrial metabolism is sufficient to rescue the axonal branching defects characterizing NUAK1-deficient axons *in vitro* and *in vivo*. Together our results suggest a two-hit model by which it is equally important to ensure that mitochondria reach their proper destination, but also that they are active locally, to stabilize nascent axonal branches.

One striking observation from our study is the fact that axon elongation and collateral branching are operatively decorrelated in terms of metabolic requirement. First, we observed a dose-response effect of D-glucose concentration on axon length, whereas collaterals formation could be supported in an all-or-nothing fashion by directly fueling mitochondrial metabolism (Fig 1). Furthermore L-Carnitine and VK2 can rescue axon branching in a NUAK1 null background, without affecting significantly axon length (Fig 6). We previously reported that an autism-linked truncated NUAK1 impairs axon branching without affecting axon elongation (V. Courchet et al., 2018), although mitochondrial function has not been explored for this mutant. Taken together these observations suggest that, in cortical axons, mitochondrial function is necessary and sufficient for collateral branching. Further studies are warranted to determine if axon elongation involves distinct metabolic pathways, and if so whether these are also dependent upon NUAK1 function.

Several lines of evidence support the idea that immature neurons differ significantly from synaptically active neurons in terms of their metabolic organization. Axonal transport of mitochondria plays a critical role in supporting axon morphogenesis (Devine and Kittler, 2018; Misgeld and T. L. Schwarz, 2017), yet mitochondria motility decreases gradually as neurons mature (Lewis et al., 2016; Moutaux et al., 2018; Obashi and Okabe, 2013). Specifically, mitochondria are recruited at immature presynaptic boutons (J. Courchet et al., 2013) where they remain captured by an actin-dependent mechanism (Gutnick et al., 2019). Here, we further demonstrate that mitochondria are recruited after, and not prior to, branch formation. Furthermore, mitochondria are not recruited to any given presynaptic boutons, but are preferentially recruited to branch-associated boutons. This differs from observations in sensory and retinal neurons where mitochondria recruitment to hot-spots of local translation induce filopodia and branch formation (Spillane et al., 2013; Wong et al., 2017). It is possible that this discrepancy stems from distinct

modalities of collateral branch formation. Indeed cortical PN branches emerge from regions where the growth cone paused during axon elongation (Kalil and Dent, 2014; Szebenyi et al., 1998), whereas NGF-induced branch can form anywhere along the axon (Gallo and Letourneau, 1998). Interestingly although NUAK1 expression is largely enriched in the developing cortex and hippocampus (Hirano et al., 2006), studies suggest other AMPK-RKs can functionally operate in regulating axon branching in sensory neurons (Lilley et al., 2013), potentially explaining mechanistic differences in the modalities of branch formation in different neuron types. Of note our study does not rule out a possible role of NUAK1 and mitochondria recruitment in supporting local protein synthesis in cortical neurons.

Our results reveal that mitochondrial function is needed to support axonal branching in connection with presynaptic boutons. Mature synapses have high metabolic need. Recent studies identified that synaptic ATP comes mostly from glucose uptake and metabolism locally (Ashrafi et al., 2017) and involves the two main components of glucose, ie. glycolysis (Jang et al., 2016; Rangaraju et al., 2014) and mitochondrial oxidative phosphorylations (Ashrafi et al., 2020; Pathak et al., 2015). However, it is unlikely that ATP by itself is sufficient to support branch formation and stabilization. Indeed the metabolic functions of mitochondria are not restricted to ATP production but contribute to most metabolic pathways in the cell including the metabolism of lipids, amino acids, nucleic acids or neurotransmitters (Martinez-Reyes and Chandel, 2020). Furthermore, axon outgrowth and branching is dependent on local calcium dynamics (Hutchins and Kalil, 2008) and calcium buffering by mitochondria is important for cortical PN axons branching (Lewis et al., 2018). Mitochondrial ATP production and calcium dynamics are intertwined (Ashrafi et al., 2020; Llorente-Folch et al., 2013). Further studies are warranted to carefully dissect the metabolome of mitochondria captured at axonal branchpoints in developing axons.

Although our evidence clearly indicate that mitochondrial function is impaired in NUAK1 deficient neurons, the molecular link between NUAK1 and mitochondria is so far unknown. In c-Myc dependent cancer cells, a knockdown of NUAK1 downregulates the expression of several essential mitochondrial proteins including multiple components of the Electron Transport Chain (ETC) (Liu et al., 2012). This broad effect on mitochondrial proteome suggests that the kinase NUAK1 might have an indirect effect on mitochondrial composition. Interestingly NUAK1 has recently been linked to RNA biogenesis (Cossa et al., 2020). Furthermore NUAK1

is an AMPK-related kinase (Lizcano et al., 2004), and AMPK activity is decreased upon NUA1 knockdown in cancer cells (Liu et al., 2012). Interestingly AMPK acts on mitochondria biogenesis through the transcription factor PGC1 α , and on mitochondria dynamics through the Mitochondrial Fission Factor MFF, which are both involved in axon morphogenesis (Lewis et al., 2018; Vaarmann et al., 2016). The potential role of a NUA1/AMPK crosstalk on axonal mitochondria function and axonal branching remains to be studied. Finally, NUA1 has a well-characterized action on actomyosin organization through the phosphorylation of the myosin phosphatase regulator MYPT1 (Zagórska et al., 2010). Interestingly a recent study uncovered that actomyosin contractility promotes axonal transport, and specifically that actomyosin affects the speed of mitochondrial transport in the axon (T. Wang et al., 2020). Furthermore in sensory neurons actomyosin contraction at branchpoint antagonizes the formation of microtubule bundles in NGF-induced branch formation (Ketschek et al., 2015). To which extent a NUA1/MYPT1 complex controls mitochondria positioning and axon morphogenesis through the regulation of actomyosin should be explored. Mitochondrial defects can cause an increased ROS production, which has been linked to defects in cortical circuits formation (Fernandez et al., 2019). The use of ROS scavenger can alleviate some of the anatomical and behavioral phenotypes in a mouse model of schizophrenia (Cabungcal et al., 2014). However, we did not observe any benefit of N-AC treatment in NUA1-deficient neurons. On the contrary L-Carnitine rescued axonal branching *in vitro* and *in vivo*. L-Carnitine has demonstrated some beneficial effects on axonal development and branching in sensory neurons (Sainath et al., 2017). Furthermore L-Carnitine has anti-depressant effect mediated by an upregulation of metabolic activity (Cherix et al., 2020; Filiou and Sandi, 2019). Our work provides further evidence that L-Carnitine might be of therapeutic interest in correcting mitochondrial dysfunction and metabolic imbalance during neurodevelopment.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank members of the Courchet lab and Institut NeuroMyoGène for useful comments and discussion. We are sincerely grateful to Franck Polleux for his support in building this project. We wish to thank Franck Polleux, Tommy Lewis, Yusuke Hirabayashi, SeokKyu Kwon, Rémi Mounier, Hélène Puccio and Thomas Boulin for technical advice, suggestions, and critical reading of the manuscript,

and Agnès Duplany, Anne Devin and Arnaud Mourier for suggestions and technical help in setting up biochemical assays. We thank the personnel from the SCAR and ALECS-SPF mouse facility for animal care. This work was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (AJE20141031276) and ERC Starting Grant (678302-NEUROMET). M.L. was the recipient of a grant from AFM-telethon.

M.L. and J.C. conceived the experiments and interpreted the results. M.L., R.D.R., C.B., L.J. and A.A. performed the experiments. J.C. and G.M-D. performed and interpreted IUCE experiments. M.L. and A.G. performed neuronal cultures. J.C. prepared the manuscript.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Mice breeding and handling was performed by following National Institutes of Health guidelines and the French and European legislation. Experimental protocols were approved by the CECCAPP Ethics committee (C2EA15) of the University of Lyon. Time-pregnant females were maintained in a 12hr light/dark cycle and obtained by overnight breeding with males of the same strain. Noon following breeding was considered as E0.5. Floxed NUA1 mice (Nuak1^{tm1a(KOMP)Wtsi}) have been described previously (V. Courchet et al., 2018). The NexCRE mouse line (Neurod6^{tm1(cre)Kan}) (Goebbels et al., 2006) were provided by Sandrine Humbert (Grenoble Institute of Neuroscience, France). Animals were maintained on a C57Bl/6J background.

DNA and plasmids

Endotoxin-free plasmid DNA was obtained using Macherey Nagel midi-prep kit. We used the following, previously described plasmids: empty vector pCAG-IRES-GFP (pCIG2), CRE- expressing vector pCAG-CRE-IRES-GFP (pCIG2-CRE) (Hand et al., 2005), mVENUS expressing vector pSCV2 (Hand and Polleux, 2011), pLKO, pCIG2-shSNPH, pCAG-mitoDsRed (J. Courchet et al., 2013), pFUGW-PercevalHR (Tantama et al., 2013), pCAG-mTagBFP2 and pCAG-mito-mTagBFP2 (Lewis et al., 2016).

pCAG-mito-KillerRed was created by cloning the photosensitizer KillerRed targeted to the mitochondria with two mitochondria targeting sequences (MTS, derived from subunit 8 of human cytochrome C oxidase) into a pCAG vector between XhoI and NotI sites, following PCR amplification from a pCMV-mito-KillerRed plasmid (Evrogen). mScarlet-i cDNA was amplified by PCR from a pmScarlet-i_C1 plasmid (gift from Dorus Gadella, Addgene #85044) (Bindels et al., 2017) and cloned into a pCAG2

backbone between XhoI and EcoRI sites. pCAG-mito-Grx1-roGFP2 and pCAG-cyto-Grx1-roGFP2 (Gutscher et al., 2008), pCAG-CRE, and pCAG-vGlut1-GFP (Herzog et al., 2011) were a kind gift from Tommy L Lewis (OMRF, USA), Seok-Kyu Kwon (KIST, Korea) and Etienne Herzog (U Bordeaux, France), respectively.

Primary neuronal culture

The electroporation of dorsal telencephalic progenitors was performed by injecting plasmid DNA (1–2 µg/µL of endotoxin-free plasmid DNA) plus 0.5% Fast Green (Sigma; 1:20 ratio) using a Picospritzer III microinjector (Harvard Apparatus) into the lateral ventricles of isolated E15.5 embryonic mouse heads (Polleux and Ghosh, 2002). Electroporation was performed with gold-coated electrodes (GenePads 5 mm, BTX) using an ECM 830 electroporator (BTX) and the following parameters: five pulses of 100 msec, 150 msec interval, at 20 V. Immediately after electroporation, cortices were dissected in Hank's buffered salt solution (HBSS) supplemented with HEPES (pH 7.4; 2.5 mM), CaCl₂ (1 mM, Sigma), MgSO₄ (1 mM, Sigma), NaHCO₃ (4 mM, Sigma), and D-glucose (30 mM, Sigma), hereafter referred to as complete HBSS (cHBSS). Isolated cortices were dissociated in cHBSS containing papain (Worthington, 20U/mg at least) for 20 min at 37°C. Cortices were washed once in cHBSS containing DNase I (2.5mg/mL, Sigma), then 3 times in cHBSS before being manipulated by trituration. Cells were then plated at 125.10³ cells per 35 mm glass bottom dish (MatTek) coated with poly-D-lysine (0.1mg/mL) and laminin (0.01mg/mL) and cultured for 5–7 days in Neurobasal medium supplemented with B27 (1x), N2 (1x), Glutamax (2mM), and penicillin (10U/mL)-streptomycin (0.1mg/mL).

In Utero Cortical Electroporation

Timed-pregnant NUA1^{FF} females were mated with Nex^{CRE/+}; NUA1^{FF} males. At E15.5, we performed in Utero Cortical Electroporation as described in (Meyer-Dilhet and J. Courchet, 2020). A mix containing 1 µg/µL endotoxin-free plasmid DNA (pCAG-mScarlet-i) plus 0.5% Fast Green (Sigma; 1:20 ratio) was injected into one lateral hemisphere. Electroporation was performed using an ECM 830 electroporator (BTX) using four pulses of 45V with 500 msec interval to target cortical progenitors. Animals were sacrificed at Postnatal day 21 by terminal perfusion of 4% paraformaldehyde (PFA, Electron Microscopy Sciences) followed by 2 h post-fixation in 4% PFA. In the treated group, L-Carnitine (Isulik 20, Sogeval laboratories) was provided in the drinking water from detection of pregnancy (E13.5) to P21.

Drug treatments

Unless indicated otherwise, drugs were from Sigma-Aldrich and diluted in water (see Supplementary Resource Table). For experiments of mitochondria inactivation (Figure 1), cells were treated with low doses of Rotenone (10, 25 or 50nM). For *in vitro* rescue experiments (Figure 6), neurons were treated at 2 DIV with either L-Carnitine (1mM), Vitamin K2 (Menaquinone K4) (1µM in ethanol), N-Acetyl-L-Cystein (1mM).

For measurements of mitochondrial Inner Membrane potential, neurons were pre-incubated in cHBSS during 30 min at 37°C, then incubated in cHBSS containing 20nM of TMRE during 30min at 37°C. Medium was replaced by cHBSS containing 5nM of TMRE immediately before live-imaging.

Immunostaining histochemistry

Cells were fixed for 15 min at room temperature in 4% (w/v) paraformaldehyde in PBS, washed 3 times in PBS, then permeabilized for 1 hr in Permeabilization buffer (PB; 0.3% Triton X-100, 0.3% BSA (Sigma), in PBS). Primary antibodies were incubated for 2 hr at room temperature in PB. Secondary antibodies were incubated for 1 hr at room temperature. Coverslips (BioCoat) were mounted on slides with Fluoromount G (EMS). Primary antibodies used for immunohistochemistry and immunocytochemistry in this study are chicken anti-GFP (Rockland) (1:2000) and anti-CRE (Millipore) (1:1000). All secondary antibodies were Alexa-conjugated (Invitrogen) and used at a 1:1000 dilution. Nuclear DNA was stained using Hoechst 33258 (1:10,000, Pierce).

Immunohistochemistry

At P21, mice were sacrificed by intracardiac perfusion of PFA (4% in PBS) followed by a 2 hours post-fixation of the whole brain in a 4% PFA solution. 75µm thick sections were performed using a Leica VT1000S vibratome. Slices were permeabilized for 30 minutes in PB, then incubated overnight with primary antibodies (chicken anti-GFP, Rockland) diluted at 1:2000 in PB. The following day, we performed 3 washes in PBS 1X, then incubated slices in secondary antibody-containing PB (Goat anti-chicken antibody, Alexa 488, 1:2000, life technology). Nuclear DNA was stained using Hoechst 33258 (1:5000).

Western blotting

Neurons were lysed in ice-cold Lysis Buffer (LB) containing 50mM Tris (pH8) (Euromedex), 0,5% sodium deoxycholate (Sigma), 0,1% SDS (Sigma), 600 mMNaCl (Sigma) and 1X protease and 1X phosphatase mixture inhibitors (Roche). Neurons put in Bioruptor (Diagenode) for break nucleus and DNA

(8 cycles with 15sec in Time on and 60sec in time off). 25µg aliquots of lysate were separated by electrophoresis on a 12% and 15% SDS-polyacrylamide gel and transferred on a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Amersham). Incubation with primary antibody was performed overnight in TBS, 0,1% Tween, 5% BSA and anti-OXPHOS antibody (abcam 110413) to 1/1000 dilution or anti-Actin antibody (MP Biomedicals) to 1/5000 dilution or anti-TOM20(Cell Signaling) to 1/1000 dilution. The next day, membranes were incubated at room temperature for 1 hr with HRP-linked secondary antibodies in TBS, 0,1% Tween. Western-blot revelation was performed using ECL Prime (Merk, Sigma). Imaging and analysis were performed on a chemidoc imager (Bio-rad) using the ImageQuant software. Images presented in the figures have been cropped around the expected bands for figure design purpose.

Metabolomic flux analyzes

We used a Seahorse XFe24 analyzer (Agilent) with the Glycolysis and Mito Stress test kits. Neurons were plated at 100,000 cells per well in Seahorse compatible 24 well plates and metabolic activity was measured at 7 days *in vitro*. The assay was conducted in Modified HBSS (1XHBSS supplemented with glucose (3.5g/L), Sodium pyruvate 1mM, Glutamax 1X, CaCl₂ 1mM, MgSO₄ 1mM, pH 7.4). Following measurement, neurons were lysed in ice-cold lysis buffer (LB) and protein concentration was measured by Bradford for post-hoc normalization.

Mitochondria DNA

Mitochondrial DNA was measured by qPCR following a protocol described elsewhere (Oruganty-Das et al., 2012). 7DIV primary neurons DNA was extracted by whole cell lysis in lysis buffer (Tris pH8 100mM, EDTA 5mM, SDS 0.2%, NaCl 200mM, proteinase K 0.5mg/mL) followed by isopropanol precipitation. Quantitative PCR was performed with the CFX-connect thermal cycler (BioRad). The following primers were used:

mtDNA_F:	ACCATTTGCAGACGCCATAA,
mtDNA_R:	TGAAATTGTTTGGGCTACGG,
betatub_F:	GCCAGAGTGGTGCAGGAAA,
betatub_R:	TCACCACGTCCAGGACAG.

Biochemical Assay

Biochemical assays were performed on mouse cortex samples from NUA1 KO, NUA1 HET or NUA1 WT mice. Samples were subjected to a chemical lysis using RIPA buffer (150mM NaCl, 0,5M EDTA pH8, 50mM Tris pH 8; 1% NP-40, 0.5% sodium

deoxycolate, 0.1% SDS) and followed by a mechanical lysis using the Precellys Evolution.

Enzymatic activity (EA) was determined by measuring absorbance using a PowerWave XS plate reader (BioTek). We used the Beer Lambert law $EA = \text{Mean } V(\epsilon \times l)$ where l is the width of the tank ($l = 0.4$ cm) and Mean V was expressed in mDO/min. For Succinate deshydrogenase activity assay, $\epsilon = 21000$ uA/M/cm. For Citrate synthase activity assay, $\epsilon = 13600$ uA/M/cm.

SDH activity was measured from a volume of 10µL (50µg of total proteins) diluted in 95µL of specific reaction buffer (65µL of 50mM KH₂PO₄, pH 7.2, 15µL of 70mM Succinate, 15µL of 560µM DCIP). Absorbance at 412nm was performed over 15 minutes at 37°C (one read per 10 seconds).

CS activity was measured from a volume of 20µL (100µg of total proteins) diluted in 90µL of specific reaction buffer (65µL of 50mM KH₂PO₄, pH 7.5, 10µL of Acetyl-CoA 4.4mM, 10µL of Oxaloacetate 4.4mM, 10µL of 150mM DTNB). Absorbance at 600nm was performed over 15 minutes at room temperature (one read per 10 seconds).

Image Acquisition and Analyses

Confocal images were acquired in 1024x1024 mode with a Nikon Ti-E microscope equipped with the C2 laser scanning confocal microscope. Time-lapse images were acquired in 1024x1024 mode using a CMOS ORCA-Flash 4.0 Camera (Hamamatsu). Microscope control and image analysis was performed using the Nikon software NIS-Elements (Nikon). We used the following objective lenses (Nikon): 10x PlanApo; NA 0.45, 20x PlanApo VC; NA 0.75, 60x Apo; NA 1.4. When live-cell imaging was carried out, the temperature was maintained at 37° C and CO₂ at 5% v/v in a humidified atmosphere. Live-cell imaging was performed in cHBSS. Representative neurons were isolated from the rest of the image using ImageJ. Contrast was enhanced and background (autofluorescence of no transfected neurons in culture) removed for better illustration of axons morphology. Kymographs were created with NIS-Elements.

Quantifications and statistical analyses

Statistical analyses were performed using Prism (GraphPad). Statistical tests and number of replicates are indicated in figures legend. For axonal morphogenesis experiments, we performed large field acquisition of neuronal cultures (typically a 4x4 tiling scan using a 20x objective). All neurons on the reconstituted image were quantified and axon length was measured with the Nikon NIS Elements software. Axons shorter than 80µm were not counted. Quantifications were performed blind to genotype.

REFERENCES

- Aleman, S., Ribasés, M., Vilor Tejedor, N., Bustamante, M., Sánchez Mora, C., Bosch, R., Richarte, V., Cormand, B., Casas, M., Ramos Quiroga, J.A., Sunyer, J., 2015. New suggestive genetic loci and biological pathways for attention function in adult attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* doi:10.1002/ajmg.b.32341
- Ashrafi, G., de Juan-Sanz, J., Farrell, R.J., Ryan, T.A., 2020. Molecular Tuning of the Axonal Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter Ensures Metabolic Flexibility of Neurotransmission. *Neuron* 105, 678–687.e5. doi:10.1016/j.neuron.2019.11.020
- Ashrafi, G., Wu, Z., Farrell, R.J., Ryan, T.A., 2017. GLUT4 Mobilization Supports Energetic Demands of Active Synapses. *Neuron* 93, 606–615.e3. doi:10.1016/j.neuron.2016.12.020
- Attwell, D., Laughlin, S.B., 2001. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21, 1133–1145. doi:10.1097/00004647-200110000-00001
- Bindels, D.S., Haarbosch, L., van Weeren, L., Postma, M., Wiese, K.E., Mastop, M., Aumonier, S., Gotthard, G., Royant, A., Hink, M.A., Gadella, T.W.J., Jr, 2017. mScarlet: a bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging. *Nat. Methods* 14, 53–56. doi:10.1038/nmeth.4074
- Brosig, A., Fuchs, J., Ipek, F., Kroon, C., Schrötter, S., Vadhvani, M., Polyzoou, A., Ledderose, J., van Diepen, M., Holzhütter, H.-G., Trimbuch, T., Gimber, N., Schmoranzler, J., Lieberam, I., Rosenmund, C., Spahn, C., Scheerer, P., Szczepek, M., Leonhardt, G., Eickholt, B.J., 2019. The Axonal Membrane Protein PRG2 Inhibits PTEN and Directs Growth to Branches. *Cell Rep* 29, 2028–2040.e8. doi:10.1016/j.celrep.2019.10.039
- Bulina, M.E., Chudakov, D.M., Britanova, O.V., Yanushevich, Y.G., Staroverov, D.B., Chepurnykh, T.V., Merzlyak, E.M., Shkrob, M.A., Lukyanov, S., Lukyanov, K.A., 2006a. A genetically encoded photosensitizer. *Nat. Biotechnol.* 24, 95–99. doi:10.1038/nbt1175
- Bulina, M.E., Lukyanov, K.A., Britanova, O.V., Onichtchouk, D., Lukyanov, S., Chudakov, D.M., 2006b. Chromophore-assisted light inactivation (CALI) using the phototoxic fluorescent protein KillerRed. *Nat Protoc* 1, 947–953. doi:10.1038/nprot.2006.89
- Cabungcal, J.-H., Counotte, D.S., Lewis, E., Tejada, H.A., Piantadosi, P., Pollock, C., Calhoun, G.G., Sullivan, E., Presgraves, E., Kil, J., Hong, L.E., Cuenod, M., Do, K.Q., O'Donnell, P., 2014. Juvenile antioxidant treatment prevents adult deficits in a developmental model of schizophrenia. *Neuron* 83, 1073–1084. doi:10.1016/j.neuron.2014.07.028
- Cherix, A., Larrieu, T., Grosse, J., Rodrigues, J., McEwen, B., Nasca, C., Gruetter, R., Sandi, C., 2020. Metabolic signature in nucleus accumbens for antidepressant-like effects of acetyl-L-carnitine. *Elife* 9. doi:10.7554/eLife.50631
- Chiechio, S., Canonico, P.L., Grilli, M., 2017. L-Acetylcarnitine: A Mechanistically Distinctive and Potentially Rapid-Acting Antidepressant Drug. *Int J Mol Sci* 19. doi:10.3390/ijms19010011
- Cioni, J.-M., Lin, J.Q., Holtermann, A.V., Koppers, M., Jakobs, M.A.H., Azizi, A., Turner-Bridger, B., Shigeoka, T., Franze, K., Harris, W.A., Holt, C.E., 2019. Late Endosomes Act as mRNA Translation Platforms and Sustain Mitochondria in Axons. *Cell* 176, 56–72.e15. doi:10.1016/j.cell.2018.11.030
- Cossa, G., Roeschert, I., Prinz, F., Baluapuri, A., Silveira Vidal, R., Schüle-Völk, C., Chang, Y.-C., Ade, C.P., Mastrobuoni, G., Girard, C., Wortmann, L., Walz, S., Lüthmann, R., Kempa, S., Kuster, B., Wolf, E., Mumberg, D., Eilers, M., 2020. Localized Inhibition of Protein Phosphatase 1 by NUA1 Promotes Spliceosome Activity and Reveals a MYC-Sensitive Feedback Control of Transcription. *Molecular Cell.* doi:10.1016/j.molcel.2020.01.008
- Courchet, J., Lewis, T.L., Lee, S., Courchet, V., Liou, D.-Y., Aizawa, S., Polleux, F., 2013. Terminal axon branching is regulated by the LKB1-NUAK1 kinase pathway via presynaptic mitochondrial capture. *Cell* 153, 1510–1525. doi:10.1016/j.cell.2013.05.021
- Courchet, V., Roberts, A.J., Meyer-Dilhet, G., Del Carmine, P., Lewis, T.L., Polleux, F., Courchet, J., 2018. Haploinsufficiency of autism spectrum disorder candidate gene NUA1 impairs cortical development and behavior in mice. *Nat Commun* 9, 4289. doi:10.1038/s41467-018-06584-5
- del Pino, I., Rico, B., Marín, O., 2018. Neural circuit dysfunction in mouse models of neurodevelopmental disorders. *Current Opinion in Neurobiology* 48, 174–182. doi:10.1016/j.conb.2017.12.013
- Dent, E.W., Callaway, J.L., Szebenyi, G., Baas, P.W., Kalil, K., 1999. Reorganization and movement of microtubules in axonal growth cones and developing interstitial branches. *J. Neurosci.* 19, 8894–8908. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-20-08894.1999
- Dent, E.W., Kalil, K., 2001. Axon branching requires interactions between dynamic microtubules and actin filaments. *J. Neurosci.* 21, 9757–9769. doi:10.1523/JNEUROSCI.21-24-09757.2001
- Devine, M.J., Kittler, J.T., 2018. Mitochondria at the neuronal presynapse in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience* 19, 63–80. doi:10.1038/nrn.2017.170
- Dickey, A.S., Strack, S., 2011. PKA/AKAP1 and PP2A/B β 2 regulate neuronal morphogenesis via Drp1 phosphorylation and mitochondrial bioenergetics. *J. Neurosci.* 31, 15716–15726. doi:10.1523/JNEUROSCI.3159-11.2011
- Fernandez, A., Meechan, D.W., Karpinski, B.A., Paronetti, E.M., Bryan, C.A., Rutz, H.L., Radin, E.A., Lubin, N., Bonner, E.R., Popratiloff, A., Rothblat, L.A., Maynard, T.M., LaMantia, A.-S., 2019. Mitochondrial Dysfunction Leads to Cortical Under-Connectivity and Cognitive Impairment. *Neuron* 102, 1127–1142.e3. doi:10.1016/j.neuron.2019.04.013
- Fillou, M.D., Sandi, C., 2019. Anxiety and Brain Mitochondria: A Bidirectional Crosstalk. *Trends Neurosci.* 42, 573–588. doi:10.1016/j.tins.2019.07.002
- Gallo, G., Letourneau, P.C., 1998. Localized sources of neurotrophins initiate axon collateral sprouting. *Journal of Neuroscience* 18, 5403–5414. doi:10.1523/JNEUROSCI.18-14-05403.1998
- Goebbels, S., Bormuth, I., Bode, U., Hermanson, O., Schwab, M.H., Nave, K.-A., 2006. Genetic targeting of principal neurons in neocortex and hippocampus of NEX-Cre mice. *Genesis* 44, 611–621. doi:10.1002/dvg.20256
- Gutnick, A., Banghart, M.R., West, E.R., Schwarz, T.L., 2019. The light-sensitive dimerizer zapalag reveals distinct modes of immobilization for axonal mitochondria. *Nat. Cell Biol.* 96, 1. doi:10.1038/s41556-019-0317-2

- Gutscher, M., Pauleau, A.-L., Marty, L., Brach, T., Wabnitz, G.H., Samstag, Y., Meyer, A.J., Dick, T.P., 2008. Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nat. Methods* 5, 553–559. doi:10.1038/nmeth.1212
- Hand, R., Bortone, D., Mattar, P., Nguyen, L., Heng, J.I.-T., Guerrier, S., Boutt, E., Peters, E., Barnes, A.P., Parras, C., Schuurmans, C., Guillemot, F., Polleux, F., 2005. Phosphorylation of Neurogenin2 specifies the migration properties and the dendritic morphology of pyramidal neurons in the neocortex. *Neuron* 48, 45–62. doi:10.1016/j.neuron.2005.08.032
- Hand, R., Polleux, F., 2011. Neurogenin2 regulates the initial axon guidance of cortical pyramidal neurons projecting medially to the corpus callosum. *Neural Dev* 6, 30. doi:10.1186/1749-8104-6-30
- Harris, J.J., Jolivet, R., Attwell, D., 2012. Synaptic energy use and supply. *Neuron* 75, 762–777. doi:10.1016/j.neuron.2012.08.019
- Herzog, E., Nadrigny, F., Silm, K., Biesemann, C., Helling, I., Bersot, T., Steffens, H., Schwartzmann, R., Nägerl, U.V., Mestikawy, E.I., S., Rhee, J., Kirchhoff, F., Brose, N., 2011. In vivo imaging of intersynaptic vesicle exchange using VGLUT1 Venus knock-in mice. *J. Neurosci.* 31, 15544–15559. doi:10.1523/JNEUROSCI.2073-11.2011
- Hirabayashi, Y., Kwon, S.-K., Paek, H., Pernice, W.M., Paul, M.A., Lee, J., Erfani, P., Raczkowski, A., Petrey, D.S., Pon, L.A., Polleux, F., 2017. ER-mitochondria tethering by PDZD8 regulates Ca(2+) dynamics in mammalian neurons. *Science* 358, 623–630. doi:10.1126/science.aan6009
- Hirano, M., Kiyonari, H., Inoue, A., Furushima, K., Murata, T., Suda, Y., Aizawa, S., 2006. A new serine/threonine protein kinase, Omphk1, essential to ventral body wall formation. *Dev Dyn* 235, 2229–2237. doi:10.1002/dvdy.20823
- Hollenbeck, P.J., Saxton, W.M., 2005. The axonal transport of mitochondria. *J. Cell. Sci.* 118, 5411–5419. doi:10.1242/jcs.02745
- Hu, J., Bai, X., Bowen, J.R., Dolat, L., Korobova, F., Yu, W., Baas, P.W., Svitkina, T., Gallo, G., Spiliotis, E.T., 2012. Septin-driven coordination of actin and microtubule remodeling regulates the collateral branching of axons. *Curr. Biol.* 22, 1109–1115. doi:10.1016/j.cub.2012.04.019
- Hutchins, B.I., Kalil, K., 2008. Differential outgrowth of axons and their branches is regulated by localized calcium transients. *J. Neurosci.* 28, 143–153. doi:10.1523/JNEUROSCI.4548-07.2008
- Iossifov, I., O’Roak, B.J., Sanders, S.J., Ronemus, M., Krumm, N., Levy, D., Stessman, H.A., Witherspoon, K.T., Vives, L., Patterson, K.E., Smith, J.D., Paepfer, B., Nickerson, D.A., Dea, J., Dong, S., Gonzalez, L.E., Mandell, J.D., Mane, S.M., Murtha, M.T., Sullivan, C.A., Walker, M.F., Waqar, Z., Wei, L., Willsey, A.J., Yamrom, B., Lee, Y.-H., Grabowska, E., Dalkic, E., Wang, Z., Marks, S., Andrews, P., Leotta, A., Kendall, J., Hakker, I., Rosenbaum, J., Ma, B., Rodgers, L., Troge, J., Narzisi, G., Yoon, S., Schatz, M.C., Ye, K., McCombie, W.R., Shendure, J., Eichler, E.E., State, M.W., Wigler, M., 2014. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature* 515, 216–221. doi:10.1038/nature13908
- Iossifov, I., Ronemus, M., Levy, D., Wang, Z., Hakker, I., Rosenbaum, J., Yamrom, B., Lee, Y.-H., Narzisi, G., Leotta, A., Kendall, J., Grabowska, E., Ma, B., Marks, S., Rodgers, L., Stepansky, A., Troge, J., Andrews, P., Bekritsky, M., Pradhan, K., Ghiban, E., Kramer, M., Parla, J., Demeter, R., Fulton, L.L., Fulton, R.S., Magrini, V.J., Ye, K., Darnell, J.C., Darnell, R.B., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Schatz, M.C., McCombie, W.R., Wigler, M., 2012. De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron* 74, 285–299. doi:10.1016/j.neuron.2012.04.009
- Jang, S., Nelson, J.C., Bend, E.G., Rodríguez-Laureano, L., Tueros, F.G., Cartagenova, L., Underwood, K., Jorgensen, E.M., Colón-Ramos, D.A., 2016. Glycolytic Enzymes Localize to Synapses under Energy Stress to Support Synaptic Function. *Neuron* 90, 278–291. doi:10.1016/j.neuron.2016.03.011
- Javaherian, A., Cline, H.T., 2005. Coordinated motor neuron axon growth and neuromuscular synaptogenesis are promoted by CPG15 in vivo. *Neuron* 45, 505–512. doi:10.1016/j.neuron.2004.12.051
- Johnson, M.R., Shkura, K., Langley, S.R., Delahaye-Duriez, A., Srivastava, P., Hill, W.D., Rackham, O.J.L., Davies, G., Harris, S.E., Moreno-Moral, A., Rotival, M., Speed, D., Petrovski, S., Katz, A., Hayward, C., Porteous, D.J., Smith, B.H., Padmanabhan, S., Hocking, L.J., Starr, J.M., Liewald, D.C., Visconti, A., Falchi, M., Bottolo, L., Rossetti, T., Danis, B., Mazzuferi, M., Foerch, P., Grote, A., Helmstaedter, C., Becker, A.J., Kaminski, R.M., Deary, I.J., Petretto, E., 2016. Systems genetics identifies a convergent gene network for cognition and neurodevelopmental disease. *Nat Neurosci* 19, 223–232. doi:10.1038/nn.4205
- Kalil, K., Dent, E.W., 2014. Branch management: mechanisms of axon branching in the developing vertebrate CNS. *Nature Reviews Neuroscience* 15, 7–18. doi:10.1038/nrn3650
- Ketschek, A., Jones, S., Spillane, M., Korobova, F., Svitkina, T., Gallo, G., 2015. Nerve growth factor promotes reorganization of the axonal microtubule array at sites of axon collateral branching. *Dev Neurobiol* 75, 1441–1461. doi:10.1002/dneu.22294
- Klein Gunnewiek, T.M., Van Hugte, E.J.H., Frega, M., Guardia, G.S., Foreman, K., Panneman, D., Mossink, B., Linda, K., Keller, J.M., Schubert, D., Cassiman, D., Rodenburg, R., Vidal Folch, N., Oglesbee, D., Perales-Clemente, E., Nelson, T.J., Morava, E., Nadif Kasri, N., Kozicz, T., 2020. m.3243A > G-Induced Mitochondrial Dysfunction Impairs Human Neuronal Development and Reduces Neuronal Network Activity and Synchronicity. *Cell Rep* 31, 107538. doi:10.1016/j.celrep.2020.107538
- Kwon, S.-K., Sando, R., Lewis, T.L., Hirabayashi, Y., Maximov, A., Polleux, F., 2016. LKB1 Regulates Mitochondria-Dependent Presynaptic Calcium Clearance and Neurotransmitter Release Properties at Excitatory Synapses along Cortical Axons. *PLoS Biol.* 14, e1002516. doi:10.1371/journal.pbio.1002516
- Lasagna-Reeves, C.A., de Haro, M., Hao, S., Park, J., Rousseaux, M.W.C., Al-Ramahi, I., Jafar-Nejad, P., Vilanova-Velez, L., See, L., De Maio, A., Nitschke, L., Wu, Z., Troncoso, J.C., Westbrook, T.F., Tang, J., Botas, J., Zoghbi, H.Y., 2016. Reduction of Nuak1 Decreases Tau and Reverses Phenotypes in a Tauopathy Mouse Model. *Neuron* 92, 407–418. doi:10.1016/j.neuron.2016.09.022
- Lee, A., Hirabayashi, Y., Kwon, S.-K., Lewis, T.L., Polleux, F., 2018. Emerging roles of mitochondria in synaptic transmission and neurodegeneration. *Curr Opin Physiol* 3, 82–93. doi:10.1016/j.cophys.2018.03.009
- Lewis, T.L., Courchet, J., Polleux, F., 2013. Cell biology in neuroscience: Cellular and molecular mechanisms

- underlying axon formation, growth, and branching. *J. Cell Biol.* 202, 837–848. doi:10.1083/jcb.201305098
- Lewis, T.L., Kwon, S.-K., Lee, A., Shaw, R., Polleux, F., 2018. MFF-dependent mitochondrial fission regulates presynaptic release and axon branching by limiting axonal mitochondria size. *Nat Commun* 9, 5008. doi:10.1038/s41467-018-07416-2
- Lewis, T.L., Turi, G.F., Kwon, S.-K., Losonczy, A., Polleux, F., 2016. Progressive Decrease of Mitochondrial Motility during Maturation of Cortical Axons In Vitro and In Vivo. *Curr. Biol.* 26, 2602–2608. doi:10.1016/j.cub.2016.07.064
- Lilley, B.N., Pan, Y.A., Sanes, J.R., 2013. SAD kinases sculpt axonal arbors of sensory neurons through long- and short-term responses to neurotrophin signals. *Neuron* 79, 39–53. doi:10.1016/j.neuron.2013.05.017
- Liu, L., Ulbrich, J., Müller, J., Wüstefeld, T., Aeberhard, L., Kress, T.R., Muthalagu, N., Rycak, L., Rudalska, R., Moll, R., Kempa, S., Zender, L., Eilers, M., Murphy, D.J., 2012. Deregulated MYC expression induces dependence upon AMPK-related kinase 5. *Nature* 483, 608–612. doi:10.1038/nature10927
- Lizzano, J.M., Göransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N.A., Boudeau, J., Hawley, S.A., Udd, L., Mäkelä, T.P., Hardie, D.G., Alessi, D.R., 2004. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J.* 23, 833–843. doi:10.1038/sj.emboj.7600110
- Llorente-Folch, I., Rueda, C.B., Amigo, I., del Arco, A., Saheki, T., Pardo, B., Satrustegui, J., 2013. Calcium-regulation of mitochondrial respiration maintains ATP homeostasis and requires ARALAR/AGC1-malate aspartate shuttle in intact cortical neurons. *Journal of Neuroscience* 33, 13957–71–13971a. doi:10.1523/JNEUROSCI.0929-13.2013
- Martínez-Reyes, I., Chandel, N.S., 2020. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun* 11, 102. doi:10.1038/s41467-019-13668-3
- Meyer, M.P., Smith, S.J., 2006. Evidence from in vivo imaging that synaptogenesis guides the growth and branching of axonal arbors by two distinct mechanisms. *J. Neurosci.* 26, 3604–3614. doi:10.1523/JNEUROSCI.0223-06.2006
- Meyer-Dilhet, G., Courchet, J., 2020. In Utero Cortical Electroporation of Plasmids in the Mouse Embryo: STAR Protocols. *STAR Protocols* 1. doi:10.1016/j.xpro.2020.100027
- Misgeld, T., Schwarz, T.L., 2017. Mitostasis in Neurons: Maintaining Mitochondria in an Extended Cellular Architecture. *Neuron* 96, 651–666. doi:10.1016/j.neuron.2017.09.055
- Mizuno, H., Hirano, T., 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. doi:10.1523/JNEUROSCI.1215-07.2007
- Moutaux, E., Christaller, W., Scaramuzzino, C., Genoux, A., Charot, B., Cazoria, M., Saudou, F., 2018. Neuronal network maturation differently affects secretory vesicles and mitochondria transport in axons. *Scientific Reports* 8, 13429. doi:10.1038/s41598-018-31759-x
- Obashi, K., Okabe, S., 2013. Regulation of mitochondrial dynamics and distribution by synapse position and neuronal activity in the axon. *Eur J Neurosci* 38, 2350–2363. doi:10.1111/ejn.12263
- Ohmura, T., Shioi, G., Hirano, M., Aizawa, S., 2012. Neural tube defects by NUA1 and NUA2 double mutation. *Dev Dyn* 241, 1350–1364. doi:10.1002/dvdy.23816
- Oruganty-Das, A., Ng, T., Udagawa, T., Goh, E.L.K., Richter, J.D., 2012. Translational control of mitochondrial energy production mediates neuron morphogenesis. *Cell Metabolism* 16, 789–800. doi:10.1016/j.cmet.2012.11.002
- Pathak, D., Shields, L.Y., Mendelsohn, B.A., Haddad, D., Lin, W., Gerencser, A.A., Kim, H., Brand, M.D., Edwards, R., Nakamura, K., 2015. The role of mitochondrially derived ATP in synaptic vesicle recycling. *J. Biol. Chem.* 290, 22325–22336. doi:10.1074/jbc.M115.656405
- Piven, J., Elison, J.T., Zylka, M.J., 2017. Toward a conceptual framework for early brain and behavior development in autism. *Mol. Psychiatry* 22, 1385–1394. doi:10.1038/mp.2017.131
- Polleux, F., Ghosh, A., 2002. The slice overlay assay: a versatile tool to study the influence of extracellular signals on neuronal development. *Sci. STKE* 2002, pl9–pl9. doi:10.1126/stke.2002.136.pl9
- Ponomareva, O.Y., Holmen, I.C., Sperry, A.J., Eliceiri, K.W., Halloran, M.C., 2014. Calsynenin-1 regulates axon branching and endosomal trafficking during sensory neuron development in vivo. *J. Neurosci.* 34, 9235–9248. doi:10.1523/JNEUROSCI.0561-14.2014
- Rangaraju, V., Calloway, N., Ryan, T.A., 2014. Activity-driven local ATP synthesis is required for synaptic function. *Cell* 156, 825–835. doi:10.1016/j.cell.2013.12.042
- Rangaraju, V., Lewis, T.L., Hirabayashi, Y., Bergami, M., Motori, E., Cartoni, R., Kwon, S.-K., Courchet, J., 2019. Pleiotropic Mitochondria: The Influence of Mitochondria on Neuronal Development and Disease. *J. Neurosci.* 39, 8200–8208. doi:10.1523/JNEUROSCI.1157-19.2019
- Rossi, M.J., Pekkurnaz, G., 2019. Powerhouse of the mind: mitochondrial plasticity at the synapse. *Current Opinion in Neurobiology* 57, 149–155. doi:10.1016/j.conb.2019.02.001
- Ruthazer, E.S., Li, J., Cline, H.T., 2006. Stabilization of axon branch dynamics by synaptic maturation. *J. Neurosci.* 26, 3594–3603. doi:10.1523/JNEUROSCI.0069-06.2006
- Sainath, R., Ketschek, A., Grandi, L., Gallo, G., 2017. CSPGs inhibit axon branching by impairing mitochondria-dependent regulation of actin dynamics and axonal translation. *Dev Neurobiol* 77, 454–473. doi:10.1002/dneu.22420
- Schwarz, A., Rapaport, E., Hirschberg, K., Futerman, A.H., 1995. A regulatory role for sphingolipids in neuronal growth. Inhibition of sphingolipid synthesis and degradation have opposite effects on axonal branching. *J. Biol. Chem.* 270, 10990–10998. doi:10.1074/jbc.270.18.10990
- Spillane, M., Ketschek, A., Donnelly, C.J., Pacheco, A., Twiss, J.L., 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. doi:10.1523/JNEUROSCI.1079-12.2012
- Spillane, M., Ketschek, A., Merianda, T.T., Twiss, J.L., Gallo, G., 2013. Mitochondria coordinate sites of axon branching through localized intra-axonal protein synthesis. *Cell Rep* 5, 1564–1575. doi:10.1016/j.celrep.2013.11.022

- Szebenyi, G., Callaway, J.L., Dent, E.W., Kalil, K., 1998. Interstitial branches develop from active regions of the axon demarcated by the primary growth cone during pausing behaviors. *Journal of Neuroscience* 18, 7930–7940. doi:10.1523/JNEUROSCI.18-19-07930.1998
- Tantama, M., Martínez-François, J.R., Mongeon, R., Yellen, G., 2013. Imaging energy status in live cells with a fluorescent biosensor of the intracellular ATP-to-ADP ratio. *Nat Commun* 4, 2550. doi:10.1038/ncomms3550
- Tefera, T.W., Borges, K., 2016. Metabolic Dysfunctions in Amyotrophic Lateral Sclerosis Pathogenesis and Potential Metabolic Treatments. *Front. Neurosci.* 10, 611. doi:10.3389/fnins.2016.00611
- Vaarmann, A., Mandel, M., Zeb, A., Wareski, P., Liiv, J., Kuum, M., Antsov, E., Liiv, M., Cagalinec, M., Choubey, V., Kaasik, A., 2016. Mitochondrial biogenesis is required for axonal growth. *Development* 143, 1981–1992. doi:10.1242/dev.128926
- Vaccaro, V., Devine, M.J., Higgs, N.F., Kittler, J.T., 2017. Miro1-dependent mitochondrial positioning drives the rescuing of presynaptic Ca²⁺ signals during homeostatic plasticity. *EMBO Rep* 18, 231–240. doi:10.15252/embr.201642710
- Villegas, R., Martinez, N.W., Lillo, J., Pihan, P., Hernandez, D., Twiss, J.L., Court, F.A., 2014. Calcium Release from Intra-Axonal Endoplasmic Reticulum Leads to Axon Degeneration through Mitochondrial Dysfunction. *Journal of Neuroscience* 34, 7179–7189. doi:10.1523/JNEUROSCI.4784-13.2014
- Vojinovic, D., Adams, H.H., Jian, X., Yang, Q., Smith, A.V., Bis, J.C., Teumer, A., Scholz, M., Armstrong, N.J., Hofer, E., Saba, Y., Luciano, M., Bernard, M., Trompet, S., Yang, J., Gillespie, N.A., van der Lee, S.J., Neumann, A., Ahmad, S., Andreassen, O.A., Ames, D., Amin, N., Arfanakis, K., Bastin, M.E., Becker, D.M., Beiser, A.S., Beyer, F., Brodaty, H., Bryan, R.N., Bülow, R., Dale, A.M., De Jager, P.L., Deary, I.J., DeCarli, C., Fleischman, D.A., Gottesman, R.F., van der Grond, J., Gudnason, V., Harris, T.B., Homuth, G., Knopman, D.S., Kwok, J.B., Lewis, C.E., Li, S., Loeffler, M., Lopez, O.L., Maillard, P., Marroun, El, H., Mather, K.A., Mosley, T.H., Muetzel, R.L., Nauck, M., Nyquist, P.A., Panizzon, M.S., Pausova, Z., Psaty, B.M., Rice, K., Rotter, J.I., Royle, N., Satizabal, C.L., Schmidt, R., Schofield, P.R., Schreiner, P.J., Sidney, S., Stott, D.J., Thalamuthu, A., Uitterlinden, A.G., Valdés Hernández, M.C., Vernooij, M.W., Wen, W., White, T., Witte, A.V., Wittfeld, K., Wright, M.J., Yanek, L.R., Tiemeier, H., Kremen, W.S., Bennett, D.A., Jukema, J.W., Paus, T., Wardlaw, J.M., Schmidt, H., Sachdev, P.S., Villringer, A., Grabe, H.J., Longstreth, W.T., van Duijn, C.M., Launer, L.J., Seshadri, S., Ikram, M.A., Fornage, M., 2018. Genome-wide association study of 23,500 individuals identifies 7 loci associated with brain ventricular volume. *Nat Commun* 9, 3945. doi:10.1038/s41467-018-06234-w
- Vos, M., Esposito, G., Edirisinghe, J.N., Vilain, S., Haddad, D.M., Slabbaert, J.R., Van Meensel, S., Schaap, O., De Strooper, B., Meganathan, R., Morais, V.A., Verstreken, P., 2012. Vitamin K2 is a mitochondrial electron carrier that rescues pink1 deficiency. *Science* 336, 1306–1310. doi:10.1126/science.1218632
- Vos, M., Lauwers, E., Verstreken, P., 2010. Synaptic mitochondria in synaptic transmission and organization of vesicle pools in health and disease. *Front. Synaptic Neurosci.* 2, 139. doi:10.3389/fnsyn.2010.00139
- Wang, C.-L., Zhang, L., Zhou, Y., Zhou, J., Yang, X.-J., Duan, S.-M., Xiong, Z.-Q., Ding, Y.-Q., 2007. Activity-dependent development of callosal projections in the somatosensory cortex. *J. Neurosci.* 27, 11334–11342. doi:10.1523/JNEUROSCI.3380-07.2007
- Wang, T., Li, W., Martin, S., Papadopoulos, A., Joensuu, M., Liu, C., Jiang, A., Shamsollahi, G., Amor, R., Lanoue, V., Padmanabhan, P., Meunier, F.A., 2020. Radial contractility of actomyosin rings facilitates axonal trafficking and structural stability. *J. Cell Biol.* 219. doi:10.1083/jcb.201902001
- Wong, H.H.-W., Lin, J.Q., Ströhl, F., Roque, C.G., Cioni, J.-M., Cagnetta, R., Turner-Bridger, B., Laine, R.F., Harris, W.A., Kaminski, C.F., Holt, C.E., 2017. RNA Docking and Local Translation Regulate Site-Specific Axon Remodeling In Vivo. *Neuron* 95, 852–868.e8. doi:10.1016/j.neuron.2017.07.016
- Zagórska, A., Deak, M., Campbell, D.G., Banerjee, S., Hirano, M., Aizawa, S., Prescott, A.R., Alessi, D.R., 2010. New roles for the LKB1-NUAK pathway in controlling myosin phosphatase complexes and cell adhesion. *Sci Signal* 3, ra25–ra25. doi:10.1126/scisignal.2000616
- Zanelli, S.A., Solenski, N.J., Rosenthal, R.E., Fiskum, G., 2005. Mechanisms of ischemic neuroprotection by acetyl-L-carnitine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1053, 153–161. doi:10.1196/annals.1344.013

ARTICLE 3

Skeletal muscle MACF1 maintains myonuclei and mitochondria localization through microtubules to control muscle functionalities

*Alireza Ghasemizadeh, Emilie Christin, Alexandre Guiraud, Nathalie Couturier, Valérie Risson, Emmanuelle Girard, Christophe Jagla, Cedric Soler, Lilia Laddada, Colline Sanchez, Francisco Jaque, **Audrey Garcia**, Marine Lanfranchi, Vincent Jacquemond, Julien Gondin , Julien Courchet, Laurent Schaeffer and Vincent Gache*

1 **Skeletal muscle MACF1 maintains myonuclei and** 2 **mitochondria localization through microtubules to control** 3 **muscle functionalities**

4
5
6 **Alireza Ghasemizadeh¹, Emilie Christin¹, Alexandre Guiraud¹, Nathalie Couturier¹,**
7 **Valérie Risson¹, Emmanuelle Girard¹, Christophe Jagla², Cedric Soler², Lilia Laddada²,**
8 **Colline Sanchez¹, Francisco Jaque¹, Audrey Garcia¹, Marine Lanfranchi¹, Vincent**
9 **Jacquemond¹, Julien Gondin¹, Julien Courchet¹, Laurent Schaeffer¹ and Vincent Gache³.**

10
11
12 1 Institut NeuroMyoGène, CNRS UMR5310, INSERM U1217, Faculté de Médecine,
13 Rockefeller, Université Claude Bernard Lyon I, 8 Avenue Rockefeller, 69373, Lyon Cedex 08,
14 France.

15 2 GReD Laboratory, Clermont-Auvergne University, INSERM U1103, CNRS,
16 UMR6293, 63000 Clermont-Ferrand, France.

17 3 Institut NeuroMyoGène, CNRS UMR5310, INSERM U1217, Faculté de Médecine,
18 Rockefeller, Université Claude Bernard Lyon I, 8 Avenue Rockefeller, 69373, Lyon Cedex 08,
19 France. vincent.gache@inserm.fr

20 21 22 **Abstract**

23
24 Skeletal muscle is made from multinuclear myofiber, where myonuclei are positioned at the
25 periphery or clustered below neuromuscular junctions (NMJs). While mispositioned myonuclei
26 are the hallmark of numerous muscular diseases, the molecular machinery maintaining
27 myonuclei positioning in mature muscle is still unknown. Here, we identified microtubule-
28 associated protein MACF1 as an evolutionary conserved regulator of myonuclei positioning, in
29 vitro and in vivo, controlling the “microtubule code” and stabilizing the microtubule dynamics
30 during myofibers maturation, preferentially at NMJs. Specifically, MACF1 governs myonuclei
31 motion, mitochondria positioning and structure and acetylcholine receptors (AChRs)
32 clustering. Macf1-KO in young and adult mice decreases muscle excitability and causes
33 evolutionary myonuclei positioning alterations in adult mice, paralleled with high mitochondria
34 content and improved resistance to fatigue. We present MACF1 as a primary actor of the
35 maintenance of synaptic myonuclei and AChRs clustering, peripheral myonuclei positioning
36 and mitochondria organization through the control of microtubule network dynamics in muscle
37 fibers.

38 39 40 **Introduction**

41
42 Throughout muscle development, myonuclei actively position themselves and adapt special
43 localization in mature myofibers where myonuclei are regularly spaced along muscle fibers and
44 localized at the periphery (Roman and Gomes, 2017). The density of myonuclei along
45 myofibers' length remains relatively constant with the exception of immediately below the
46 neuromuscular junction (NMJ) where about 5-6 myonuclei (synaptic myonuclei) are clustered
47 (Manhart et al., 2018; Ravel-Chapuis et al., 2007; Bruusgaard et al., 2006). Failure in extra-

48 synaptic myonuclei patterning has been linked to different myopathies and muscle weakness
49 (Metzger et al., 2012; Roman et al., 2017; Falcone et al., 2014; Collins et al., 2017; Perillo and
50 Folker, 2018). This precise organization of myonuclei is correlated with particular myonuclei
51 shape in muscle fibers, the alteration of which has recently emerged as potentially contributing
52 to several muscular diseases (Norton and Phillips-Cremins, 2017; Cho et al., 2017; Puckelwartz
53 et al., 2009; Méjat et al., 2009; Janin and Gache, 2018).

54 Proteins localized inside myonuclei such as Lamin A/C, Emerin or Nuclear Envelope Proteins
55 (NEPs), that couple the nuclear lamina to cytoskeleton through the “Linker of Nucleoskeleton
56 and Cytoskeleton” (LINC) complex, play critical roles in the maintenance of myonuclei shape
57 and localization (Chang et al., 2015; Lee and Burke, 2017; Levy et al., 2018; Mattioli et al.,
58 2011). Additionally, molecular motors, Microtubule-Associated Proteins (MAPs), in interaction
59 with actin/microtubule networks are also involved in myonuclei localization during muscle
60 formation (Gache et al., 2017; Rivero et al., 2009; Casey et al., 2003; Metzger et al., 2012).
61 Most importantly, this precise localization and shape, determined by mechanical forces
62 emanating from different cytoskeletons networks, acts directly on myonuclei-triggered
63 chromatin organization and gene expression (Ramdas and Shivashankar, 2015; Robson et al.,
64 2016; Chojnowski et al., 2015; Kirby and Lammerding, 2018). Still, how late positioning of
65 myonuclei in myofibers is set and how it regulates signaling within cells that contributes to
66 different pathways to maintain muscle integrity are still poorly understood.

67 To identify proteins involved in the late positioning of myonuclei, we used primary
68 myotubes/myofibers culture and identified MACF1 (Microtubule Actin Cross Factor 1) as a
69 regulator of myonuclei positioning in late phases of myofiber maturation. MACF1 is a member
70 of the plakin family. It is a large protein composed of multiple domains capable of interacting
71 with actin filaments and microtubules that helps stabilizing them towards adhesion structures in
72 a variety of tissues (Kodama et al., 2003; Sanchez-Soriano et al., 2009). In addition, other
73 supporting evidences have shown a role of MACF1 in myonuclei position. The *C. elegans*
74 orthologous, VAB-10 and the *Drosophila* orthologous, Shot, are essential for nuclei migration
75 in distal tip cells of the somatic gonad and myotendinous junction formation respectively (Kim
76 et al., 2011; Lee and Kolodziej, 2002; Bottenberg et al., 2009). Nevertheless, a duplication of
77 *MACF1* gene (inducing a decrease in the total amount of MACF1 protein) has been linked to a
78 new neuromuscular disease (Jørgensen et al., 2014). Also important in this respect, it was
79 recently proposed that Shot/MACF1 participates in the formation and maintenance of a
80 perinuclear shield in the muscle of drosophila larvae, contributing once again in myonuclei
81 localization (Wang et al., 2015).

82 Here, we demonstrate *in vitro* and *in vivo* that MACF1 is implicated in the maintenance of
83 myonuclei patterning in myofibers, starting at the NMJs, and controlling both myonuclei and
84 mitochondria dynamics through the regulation of microtubules.

85

86

87 Results

88

89 **MACF1 is not required in precocious myonuclei positioning but is essential during**
90 **myofibers maturation in the maintenance of myonuclei localization.**

91

92 To identify new factors that contribute specifically to myonuclei spreading in myofibers, we
93 purified proteins able to bind to microtubules, stabilized with Taxol[®], from 3 days mouse
94 primary myotubes (Fig1A). The major Microtubule Associated Protein (MAP) identified by
95 mass-spectrometry using this protocol revealed the significant presence of MACF1/ACF7
96 protein, a member of the plakin family (Supplementary Fig1A-B). Although MACF1 is initially

97 described to be predominantly expressed in neurons and muscle (Bernier et al., 2000), its role
98 during muscle fibers formation and behavior is poorly understood. Published work suggests
99 that plakin family members play specific roles through the regulation of placement and
100 function of specific organelles such as nucleus, mitochondria, Golgi apparatus, and
101 sarcoplasmic reticulum (Boyer et al., 2010). Mouse *Macf1* mRNA was previously show to
102 increase steadily during myogenesis (Sun et al., 1999) and MACF1 was proposed to contribute
103 in muscle fiber to form a flexible perinuclear shield in collaboration with two other MAPs
104 named EB1 and Nesprin (Wang et al., 2015). We confirmed the increase of *Macf1* mRNA and
105 MACF1 protein during early steps of myotubes formation (3 to 5 days of differentiation) using
106 RT-qPCR and Western blotting on mouse myoblast C2C12 cells (Supplementary Fig1C-D).

107 We first addressed the role of MACF1 in early steps of myotubes formation (Fig1A). Briefly,
108 isolated murine myoblasts were treated with either short interfering RNA (siRNA) or small
109 hairpin RNA (shRNA) targeting either a scrambled sequence or the *Macf1* gene to obtain a
110 strong reduction of MACF1 expression after 3 or 10 days of differentiation (Fig1B-C). Primary
111 myoblasts were then induced *in vitro* to form myotubes that were fixed and analyzed after 3
112 days of differentiation (Fig1D-E). At this step, myoblasts have fused together and formed
113 immature myofibers (myotubes) characterized by myonuclei alignment in the middle of
114 myotubes, mainly organized by an interplay between MAP7, Kif5b and microtubules (Metzger
115 et al., 2012). Surprisingly at this early step of differentiation, MACF1 down-regulation had no
116 impact on parameters related to myotubes architecture, reflected by myotubes areas and/or
117 length according to myonuclei content (Supplementary Fig1E-F). Additionally, myonuclei
118 repartition reflected by the mean distance of each myonuclei from myotubes centroid or by the
119 statistical repartition of myonuclei along the length of myotubes, was not affected by the down
120 regulation of MACF1 (Fig1F-H). These results were confirmed in C2C12 myoblasts cells,
121 treated with either siRNA or shRNA targeting *Macf1* and induced to form myotubes
122 (Supplementary Fig1G-J). This suggested that for a defined myonuclei content in myotubes,
123 MACF1 does not act as an early “anti-elongation” factor and is not involved in the process that
124 contributes to the early equilibrium in force spreading emanating on myonuclei in myotubes
125 (Manhart et al., 2018).

126 To further investigate the implication of MACF1 in late steps of differentiation, primary mice
127 myotubes were maintained in differentiation media for 10 days as previously described
128 (Pimentel et al., 2017; Falcone et al., 2014), covered by matrigel[®] and supplemented with
129 neural Agrin (Fig1A). In these conditions of maturation, myonuclei are compressed between
130 the membrane of the myofiber and sarcomere structure, adopt a flatten architecture and spread
131 all along myofibers (Roman et al., 2017). This long-term differentiation approach allowed the
132 identification of MACF1 as a regulator of myonuclear positioning in the maturation steps of
133 developing myofibers (Fig1I-J). Actually, MACF1 depletion caused a 40% decrease of the
134 mean distance between adjacent myonuclei using either each of 3 individual siRNA or a pool
135 of individual siRNAs (Fig1K). We confirmed this data with an alternative approach using 4
136 individual shRNA or a pool of these 4 shRNAs (Fig1K) and observed a 30% decrease in the
137 mean distance between myonuclei.

138 Altogether, these results suggests that MACF1 is progressively expressed and accumulates
139 during early steps of differentiation processes without implication in the precocious
140 microtubules-dependent localization of myonuclei, yet during myofibers maturation steps,
141 MACF1 gets involved in the maintenance of the distance between adjacent myonuclei.

142 **MACF1 controls Myonuclei shape, microtubule network, mitochondria localization and**
143 **AChRs clustering in mature myofibers.**

144

145 MACF1 is a member of the plakin family (Gong et al., 2001; Goryunov and Liem, 2016),
146 composed of multiple domains interacting with and stabilizing both actin filaments and
147 microtubules network (Supplementary Fig1B) in variety of tissues (Kodama et al., 2003;
148 Sanchez-Soriano et al., 2009). To further investigate the specific roles of MACF1 in mature
149 myofibers, we analyzed the structure of actin and microtubule cytoskeleton networks (Fig2A).
150 The structure of sarcomeres reflected by actin and alpha-actinin staining did not seem to be
151 affected in the absence of MACF1, as evidenced by the proper peripheral localization of
152 myonuclei (Fig2A)(Roman et al., 2017). However, the microtubule network was slightly
153 altered all along myofibers with a net architectural modification at the vicinity of myonuclei
154 (Fig2A). To discard an effect of the absence of MACF1 on the global shape of myofibers, we
155 analyzed the width of each individual myofiber and did not observe significant differences
156 between scrambled and *macf1* si/shRNA treated myofibers (Fig2B).

157 The obvious phenotype regarding myonuclei aspect was an increase of the apparent sphericity
158 of myonuclei (Fig2C). We measured the mean feret diameter of each myonuclei compressed
159 between myofibrils network and the external membrane (Roman et al., 2017) and observed that
160 in mature myofibers, the mean length of myonuclei was decreased by 11 and 16% in the
161 absence of MACF1, using siRNA and shRNA strategies respectively, compared to control
162 conditions (Fig2C).

163 We also addressed the structure and localization of the mitochondrial network in the presence
164 or absence of MACF1, as revealed by a Cytochrome-C staining in mature myofibers (Fig2A-
165 B). In myofibers treated with scrambled siRNA, mitochondria lined up in the bulk of
166 myofibers, in-between myofibrils, where they followed the microtubule network. However in
167 *Macf1* siRNA/shRNA treated myofibers, we observed a 30% increase of mitochondria
168 fragmentation (Fig2D). Furthermore unlike in control condition where mitochondria clustered
169 in the vicinity of myonuclei with a preference for both extremities of polarized myonuclei
170 (Fig2A, purple arrows), we observed a loss of mitochondria localization at the periphery of
171 myonuclei upon MACF1 knock-down (Fig2E). These results confirmed a role of MACF1 in
172 muscles specifically related to microtubule network alteration, as myonuclei and mitochondria
173 localization were both affected.

174 Interestingly, the MACF1-dependent microtubule network in charge of both transmitted forces
175 on myonuclei and mitochondria localization, occurred specifically during the maturation
176 process and especially on extracellular matrix treated and Agrin stimulated myofibers. The use
177 of Agrin in this system is known to induce clustering of acetylcholine receptors (AChRs), a
178 synaptic receptor expressed locally at NMJs (Lin et al., 2005; Schmidt et al., 2012; Vilmont et
179 al., 2016) (Fig 2A, green arrows). Thus, we next focused on AChRs clustering and found that
180 even though the proportion of myofibers expressing AChRs was not changed (Fig2F), the
181 ability of myofibers to efficiently cluster AChRs was highly affected resulting in a drop of at
182 least 20% in this clustering ability, determined by the presence of cluster larger than 8 μ m
183 (Fig2G). To confirm these results on the potential role of MACF1 on AChRs clustering
184 specifically at the neuromuscular junction, we used the muscle specific driver (*Mef2-GAL4*) to
185 express RNAi against *Drosophila Shot* (*Macf1* orthologous) as described previously (Wang et
186 al., 2015). Immunostaining against Shot confirmed a preferential localization of the protein
187 around myonuclei and showed a significant reduction of protein level around myonuclei in
188 Shot-KD larval muscles (Supplementary Fig2A-B). In accordance with our *in vitro* system, we
189 found that actives zones of synaptic button and post-synaptic terminals were decreased in Shot-
190 KD larval muscles (Supplementary Fig2C-D).

191 Altogether, these results suggest that MACF1 is implicated in late steps of the myofibers
192 maturation process by maintaining microtubule related spreading of both myonuclei and
193 mitochondria and by controlling AChRs clustering at the NMJs.

194 **MACF1 controls myonuclei dynamics in a microtubule dependent manner.**

195
196 MACF1 was previously shown to regulate microtubule polymerization (Ka and Kim, 2016;
197 Alves-Silva et al., 2012; Wang et al., 2015). We tested whether in our system microtubule
198 dynamics were changed using the tracking of fluorescently tagged EB1. As expected, EB1
199 localization at the tips of microtubule was not dependent on the presence of MACF1, however
200 the velocity of EB1 was increased by 20% when MACF1 was down-regulated, confirming the
201 role of MACF1 in the regulation of microtubule polymerization (Fig3A-B; Supplementary
202 movie 1-2). As myonuclei use preferentially the microtubule network to move longitudinally
203 along myotubes (Gache et al., 2017; Metzger et al., 2012), we next investigated the impact of
204 the increase in microtubule dynamicity on myonuclei movements in mature myofibers. Just
205 before fusion occurs, myoblasts were transfected with lamin-chromobody® to allow the
206 visualization of myonuclei concomitantly with shRNA targeting either scramble sequence or
207 *Macf1* with a GFP reporter to select myotubes containing both construction (shRNA and lamin-
208 chromobody®) (Fig3C, Supplementary movie 3-4). In 5-day differentiated myofibers (already
209 covered by matrigel® and supplemented with neural Agrin), myonuclei were tracked every 15
210 minutes for a time period of 14 hours. Myonuclei displacements parameters were analyzed
211 using SkyPad method (Cadot et al., 2014). In control condition, myonuclei moved during 32 %
212 of the time at a median speed of 0,16 µm/min, resulting in a displacement of 24 µm after 14
213 hours (more than twice the distance between 2 myonuclei) mainly in the same direction
214 (persistence of 0,98). Interestingly in the absence of MACF1, the median velocity of myonuclei
215 was not significantly changed (Fig3D). On the other hand, the percentage of time that
216 myonuclei spent in motion was doubled to reach 66% of the time (Fig3E). Similarly, the
217 median duration of pause was 530 minutes in the control condition while it fell to 330 minutes
218 in the absence of MACF1 (Fig3F). Interestingly, we also observed a decreased tendency in the
219 persistence of the movement of myonuclei (persistence is 0,68 in absence of MACF1). All in
220 all, in the absence of MACF1, myonuclei travelled twice more distance than in control
221 condition with a mean distance of 44 µm in 14 hours (Fig3G). This result suggests that
222 MACF1, through the increase of microtubule dynamics, increase the movements of myonuclei
223 that will induce a reduction of the distance between adjacent myonuclei.

224 225 **MACF1 conditional muscle-KO adult mice exhibit myonuclei mislocalization.**

226
227 To further investigate the role played by MACF1 in skeletal muscles development, we used a
228 conditional *Macf1* knockout mouse line in which exons 6 and 7 of the *Macf1* gene are floxed
229 (Goryunov et al., 2010). Homozygous mice were then crossed with mice carrying the Cre-
230 recombinase expression under the control of the Human Skeletal muscle Actin (HSA)(Miniou
231 et al., 1999). Briefly, mice carrying two floxed alleles of *Macf1* (*Macf1^{fl/fl}*) were crossed with
232 heterozygous mice for *Macf1* (*Macf1^{fl/-}*) that carried Hsa::Cre transgene (*Hsa::Cre; Macf1^{fl/-}*),
233 generating the conditional mutant (*Hsa::Cre; Macf1^{fl/fl}* referred as *Macf1^{fl/fl} Cre+*) and control
234 mice (WT; *Macf1^{fl/fl}* referred as *Macf1^{fl/fl} Cre-*) (Supplementary Fig3A-B). We quantified the
235 loss of *Macf1* by measuring the amount of MACF1 mRNA and protein in muscle tissue lysates
236 (Supplementary Fig3C-D). MACF1 levels were reduced by more than half in muscle tissue,
237 indicating that MACF1 is efficiently removed from myofibers in *Macf1* muscle-conditional
238 mutant mice. We can attribute the remaining presence of MACF1 proteins from other tissues
239 such as fibroblasts, motoneurons and schawm cells. Mice were born at Mendelian frequencies

240 and appeared indistinguishable from WT littermates (data not shown). The comparative global
241 body weight evolution of conditional mutant (*Macf1^{fl/fl} Cre+*) and control mice (*Macf1^{fl/fl} Cre-*)
242 did not show any apparent problems in growing and maturation phase (Supplementary Fig3E).
243

244 Myonuclei localization in different type of muscles was studied using a histological staining
245 approach in muscle cross-section. Laminin staining was used to determine the limit of each
246 myofiber and Dapi to detect myonuclei (Fig4A). We observed a dramatic delocalization of
247 myonuclei in 12-month-adult muscle fibers revealed by the presence of myonuclei in the center
248 or dispatched in the myofibers rather than at the periphery in the *Tibialis Anterior*, *Soleus* and
249 *Gastrocnemius* with a respective increase of 275, 153 and 230% of the delocalization index
250 (Fig4B, Supplementary Fig3F). Interestingly, no significant delocalization of myonuclei was
251 observed in 3- and 8- month-adult mice (Fig4B). At the fiber level, no significant alteration was
252 detected in the distribution of myofibers cross-sectional area (CSA) in 3-months-adult mice in
253 the *Tibialis Anterior* (Fig4C). Nonetheless, we observed a shift of myofibers repartition to a
254 smaller CSA sizes in 8-month mice (Fig4D) and this shift was maintained in 12-month-adult
255 mice (Fig4E). The change in myonuclei positioning was not associated with an alteration in the
256 total number of myofibers per muscle (Supplementary Fig3G) or with a massive regeneration
257 process as evidenced by the absence of staining for embryonic myosin heavy chain in
258 myofibers with mispositioned myonuclei (data not shown). We confirmed the accumulation of
259 mislocalized myonuclei in myofibers from 12-month-adult mice, using single isolated
260 myofibers from the *Tibialis Anterior* or *Extensor Digitorum Longus* muscles (Fig4F-G, green
261 arrows). Altogether, these results demonstrate that MACF1 is implicated in the maintenance of
262 myonuclei localization in muscle myofibers of adult mice that is not associated to a
263 regeneration process. This role for MACF1 seems to be a long-term process since no
264 significant myonuclei mis-localization is observed in younger mice.
265

266 **MACF1 muscle-KO mice exhibit early neuromuscular junction alteration with a reset of** 267 **the related “muscle-microtubule code”.**

268
269 Our *in vitro* results suggested that MACF1 is implicated in myonuclei spreading in an
270 Agrin/NMJ dependent manner (Fig1-2). Thus, we wondered if in our *in vivo* conditional mutant
271 model, synaptic AChRs clustering size and density were impacted by the absence of MACF1.
272 To address this question, we isolated individual's myofibers from the *Tibialis Anterior* and the
273 *Extensor Digitorum Longus* muscles and visualized AChRs clustering using bungarotoxin
274 staining in 12-months-adult mice (Fig5A). In this condition, we found that the size of synaptic
275 AChRs clusters was highly diminished in both muscles. To determine if the fragmentation of
276 NMJ-related AChRs was an early process, we isolated individual's myofibers from the *Rectus*
277 *Lateralis* muscle, known to be multi-innervated, allowing an access to multiple NMJs, from 4-
278 months-young mice (Fig 5B). In this muscle, NMJs were much more fragmented in
279 conditionally mutant mice compared to control mice reflected by the doubling of individual
280 clusters stained for AChRs (Fig5C). Accordingly we measured a reduction of myonuclei
281 associated with the NMJs, with a mean value of 5 myonuclei in control mice (*Macf1^{fl/fl} Cre-*) as
282 compared to 3 in mutant mice (*Macf1^{fl/fl} Cre+*) (Fig5D). These data further demonstrate that
283 MACF1 is required to maintain neuromuscular synapses integrity through AChRs clustering in
284 young and adult mice and this alteration seems to precede myonuclei disorganization in
285 myofibers.
286

287 MACF1 contains a microtubule-binding domain (MTB) in the C-terminus part (Supplementary
288 Fig1B) and has been shown to modulate microtubule dynamics through the interaction with
289 different partners such as CLAPS2, EB1, CAMSAP3, Nesprin, Map1B, ErbB2 (Ryan et al.,

290 2012; Ka et al., 2014; Drabek et al., 2006; Noordstra et al., 2016; Wang et al., 2015; Zaoui et
291 al., 2010). In addition, microtubules are subjected to a variety of post-translational
292 modifications (PTMs). A combination of different α - and β -tubulin isoforms and PTMs are
293 referred as the “tubulin code” (Nieuwenhuis and Brummelkamp, 2019). Among these different
294 PTMs, Tubulin de-tyrosination is associated with longer-lived microtubules, whereas more
295 dynamic microtubules are found to be mainly tyrosinated (Bulinski and Gundersen, 1991). To
296 see if MACF1 plays a role in the correct formation of tubulin code, we addressed changes in
297 microtubule tyrosination/de-tyrosination status in conditionally mutant mice compared to
298 control mice (Fig5E). In *Macf1^{fl/fl}* Cre- muscle, tyrosinated-tubulin was found to locate
299 preferentially at the vicinity of myonuclei along myofibers. No particular enrichment was
300 found close to the AChRs clusters at the NMJ (Fig5E, top). Nonetheless, de-tyrosinated-tubulin
301 was found at the vicinity of myonuclei with a noticeable enrichment at the NMJ, close to the
302 AChRs clusters (Fig5E, top). In conditionally mutant mice (*Macf1^{fl/fl}* Cre+), although myonuclei
303 shape was changed, tyrosinated-tubulin was still found at the vicinity of myonuclei associated
304 with few aggregates along myofibers, but this time, the presence of tyrosinated-tubulin was
305 enriched at the vicinity of AChRs clusters. In the same perspective, de-tyrosinated-tubulin was
306 highly reduced both around myonuclei and near AChRs clusters (Fig5E, bottom). These data
307 show that MACF1 plays a role in the maintenance of the pool of de-tyrosinated-tubulin which
308 consequently stabilizes the microtubule network at both the vicinity of myonuclei and at the
309 NMJs.

310

311 **Adult MACF1 muscle-KO mice exhibit increased myofibers with high mitochondria**
312 **content.**

313

314 Our *in vitro* results suggested that MACF1 is implicated in mitochondria spreading and
315 fragmentation in muscle fibers (Fig2A, D-E). Since skeletal muscles are composed of a
316 functional and metabolic continuum of slow (type I) and fast fibers (types IIa and IIx), we first
317 questioned whether there were changes in the mitochondrial pool in adult conditional mice. We
318 measured the intensity of succinate dehydrogenase staining, indicative of mitochondrial activity
319 and found a significant increase in the number of fibers with positive succinate dehydrogenase
320 staining in *Tibialis Anterior* muscle in conditionally mutant mice (*Macf1^{fl/fl}* Cre+) compared to
321 control mice, while no effect was observed in *Soleus* muscle (Fig6A-B). Quantification of
322 proteins comprising the electron transport chain was then performed on *Gastrocnemius* muscles
323 and our results confirmed an increase in total amount of mitochondria (Tom20 relative to actin)
324 and no changes in protein contents from the electron transport chain (CI, II, III, IV and V
325 relative to Tom20) (Fig6C). The intensity of succinate dehydrogenase staining is commonly
326 used to discriminate slow and fast fibers. Since our quantification suggests a change in the
327 repartition of slow/fast fibers in *Macf1^{fl/fl}* Cre+ muscle, we next investigated if the proportion of
328 slow fibers was changed in conditional mutant mice (*Macf1^{fl/fl}* Cre+). Cross-sections of 12-
329 month-adult muscles from the *Tibialis Anterior*, *Soleus* and *Gastrocnemius* were analyzed for
330 slow myosin content and no alteration of the proportion in each muscle type was observed
331 compared to control mice (Fig6D-E). We then used electron microscopy to visualize the
332 ultrastructure of mitochondria in *Tibialis Anterior* muscle of *Macf1^{fl/fl}* Cre+ mice (Fig6F). This
333 approach confirmed an apparent increase in mitochondria content in muscle fibers associated
334 with the presence of spherical mitochondria in-between myofibrils and close to myonuclei
335 (Fig6F). All together, these data show that MACF1 is involved in the maintenance of
336 mitochondria architecture in muscle fibers and that the loss of MACF1 is associated with a
337 redistribution of mitochondrial content dependent on muscle type.

338

339 **Muscle fibers from MACF1-KO mice show muscle function defects and increased fatigue**
340 **resistance but preserved excitation-contraction coupling.**
341

342 To see if the observed alterations have any impact on muscle force of our MACF1 muscle-KO
343 mice, we examined the muscle performance in *Macf1* conditional KO mutant mice. We used a
344 strictly non-invasive experimental setup offering the possibility to stimulate the Hindlimb
345 muscles to record the force production concomitantly. For both *Macf1^{flf} Cre-* and *Macf1^{flf}*
346 *Cre+* mice, we assessed the force production from the Hindlimb muscles in response to various
347 incremental stimulation frequencies (i.e., from 1 to 100 Hz) in order to obtain the force-
348 frequency relation. In young 4-months-old mice, we observed a large rightward shift of the
349 force-frequency relation in conditional *Macf1* KO mice (Fig7A), suggesting an alteration of the
350 excitation-contraction coupling process. Interestingly, this shift was maintained in adult mice
351 but in a less significant manner indicating compensation mechanisms to thwart the loss of
352 efficiency in response to motoneurons stimulation. As the absolute maximal force developed by
353 *Macf1* conditional KO mice was not changed compared to control mice (data not shown), we
354 next questioned the fatigability of those muscles. In accordance with the increased SDH
355 staining, we found that in both young and old mice, *Macf1* conditional KO mice are more
356 resistant to fatigue compared to control mice (Fig7B). We then used electron microscopy to
357 study the ultrastructure of muscle in *Macf1^{flf} Cre+* mice and analyzed sarcomeres, transverse
358 tubules (T-tubules) and sarcoplasmic reticulum (SR) organization (Fig7C). We found that
359 global muscle organization reflected by sarcomeric structure (myofibrils) is not dependent on
360 MACF1. However, T-tubules and the SR appeared severely affected in some myofibers
361 (Fig7C) confirming a possible direct modification of excitation-contraction coupling in muscle
362 of the *Macf1^{flf} Cre+* mice. To test this possibility, we compared voltage-activated SR Ca²⁺
363 release in *Flexor Digitalis Brevis* (FDB) muscle fibers isolated from conditional *Macf1^{flf} Cre+*
364 mice and control mice. Confocal staining using di-8-anepps showed an overall comparable
365 structure of T-tubule network in *Macf1^{flf} Cre-* and in *Macf1^{flf} Cre+* FDB muscle fibers (Fig7D-
366 top, & -middle panels). However, some isolated muscle fibers exhibited strong alteration of T-
367 tubule orientation without perturbation in T-tubules density or sarcomere length (Fig7D-
368 Bottom panel, E-G). We next tested if SR Ca²⁺ release amplitude and kinetics are affected in
369 *Macf1^{flf} Cre+* muscles fibers. Figure 7H shows rhod-2 Ca²⁺ transients elicited by membrane
370 depolarizing steps of increasing amplitude in a *Macf1^{flf} Cre-* and in a *Macf1^{flf} Cre+* fibers. As
371 routinely observed under these conditions (Kutchukian et al., 2017), transients in control fibers
372 exhibit a fast early rising phase upon depolarization followed by a slower phase at low and
373 intermediate voltages and by slowly decaying phase for the largest depolarizing steps. As
374 shown in figure 7I, rhod-2 transients from *Macf1^{flf} Cre+* fibers exhibit an overall similar time-
375 course, not distinguishable from control muscle fibers. In each tested fiber, the rate of SR Ca²⁺
376 release was calculated from the rhod-2 Ca²⁺ transients. Traces for the calculated rate of SR Ca²⁺
377 release corresponding to the transients shown in figure 7I are shown in figure 7J. In both fibers,
378 the rate exhibits a similar early peak, the amplitude of which increases with the amplitude of
379 the pulse, followed by a spontaneous decay down to a low level. The SR Ca²⁺ release peak
380 amplitude was similar in *Macf1^{flf} Cre-* and in a *Macf1^{flf} Cre+* muscle fibers for all voltages
381 (Fig7J) and the time to reach the peak was also not affected in the *Macf1^{flf} Cre+* muscle fibers
382 (Fig.7K, values not shown). Mean values for maximal rate of SR Ca²⁺ release (Max d[Ca_{tot}]/dt),
383 mid-activation voltage (V_{0.5}) and slope factor (k) of the voltage-dependence were statistically
384 unchanged in *Macf1^{flf} Cre+* muscle fibers compared to control fibers (Fig7K). Accordingly,
385 there was also no change in the voltage-dependent Ca²⁺ channel activity of the dihydropyridine
386 receptor (also referred to as Ca_v1.1, the voltage-sensor of excitation-contraction coupling) in
387 fibers from *Macf1^{flf} Cre+* mice (not shown). All in all, these data show that muscle from *Macf1*
388 conditional mutant mice exhibit delay in excitability in response to nerve stimulation and

389 although the T-tubule network organization seems affected in some myofibers, the global
390 efficiency of SR-Ca²⁺ release seems not engaged. Interestingly, muscles from *Macf1*
391 conditional mice display a higher resistance to fatigue compared to muscles of control mice.

392

393 Discussion

394

395 Different mechanisms control myonuclei positioning during muscle fiber formation (Roman
396 and Gomes, 2017; Starr, 2017; Manhart et al., 2018). Early steps of myonuclei positioning in
397 immature fibers (myotubes) depend on an interplay between microtubule, microtubule-
398 associated-proteins and motors proteins such as MAP4, MAP7, Dynein and Kif5b (Gimpel et
399 al., 2017; Mogessie et al., 2015; Metzger et al., 2012; Cadot et al., 2012; Wang et al., 2013;
400 Wilson and Holzbaur, 2014). This process also depends on myonuclei membrane associated
401 components such as Nesprin-1 or AKAP9 (Wilson and Holzbaur, 2015; Gimpel et al., 2017). In
402 mature myofibers, myonuclei are found at the periphery of fibers and reach this localization by
403 a process dependent on actin network, contraction and myonuclei rigidity (Roman et al., 2017).
404 However, processes involved in maintenance of myonuclei at the periphery of muscle fibers are
405 still unknown.

406

407 The present study is the first to demonstrate that a protein related to the microtubule network
408 controls and maintains peripheral myonuclei localization in mature myofibers. Here, we show
409 that MACF1 is progressively accumulated at the onset of myotubes formation, with no evident
410 implication in early steps of myonuclei spreading or myotubes elongation but remarkable
411 actions in maturation steps to set the distance between adjacent myonuclei (Fig1-2).
412 Accordingly, conditionally mutant mice (*Macf1^{ff} Cre+*) exhibit a strong decrease in peripheral
413 myonuclei, but surprisingly, this alteration becomes significant only at 12-months of age
414 (Fig4). This alteration comes after a slight reduction in myonuclear domains in myofibers
415 reflected by a decrease in the mean diameter of myofibers in 8-month-adult mice. These data
416 suggest a complex interplay between factors that maintain peripheral myonuclei localization
417 and demonstrate that the absence of MACF1 contributes to a long-term modification of this
418 equilibrium that breaks in 12 month-adult *Macf1^{ff} Cre+* mice.

419

420 It has already been shown that atrophy can result from a progressive alteration of NMJs
421 (Bonaldo and Sandri, 2013). In fact, in our *in vivo* model, the first alterations in myonuclei
422 localization occurred at the NMJs in 4-month-adult mice (Fig5). This is in accordance with
423 results from our *in vitro* system, where myonuclei disruption in myofibers occurs when
424 myofibers are stimulated with extra-cellular matrix and neural Agrin, which seems to be the
425 starting point of myonuclei positioning alteration in myofibers. Myonuclei clustering beneath
426 the NMJ is known to be dependent on proteins of the LINC complex such as Nesprin and Sun
427 proteins and implicated myonuclei rigidity, as mutation or depletion of Lamin A/C leads also to
428 aberrant and fragile NMJs with myonuclei lying out of it (Razafsky and Hodzic, 2015; Méjat et
429 al., 2009). In the present study, we show that MACF1 contributes in a first instance to synaptic
430 myonuclei clustering at the NMJs. This property seems to be related to the control of MACF1
431 on microtubule dynamics and stability (Fig3 & 5). Microtubule dynamics and associated MAPs
432 (Claps2, Clip170) and motors (Dynein) mediate microtubule capture at the vicinity of synaptic
433 myonuclei and seem to be crucial for the stabilization of acetylcholine receptors (AChRs) and
434 Musk (muscle-specific receptor tyrosine kinase) at the post-synaptic region (Basu et al., 2015;
435 Vilmont et al., 2016; Schmidt et al., 2012; Basu et al., 2014). Here, we found that MACF1
436 controls myonuclei-related “microtubule code” affecting the ratio between tyrosinated and non-
437 tyrosinated tubulin and thus longer-lived microtubules at the vicinity of myonuclei (Bulinski
438 and Gundersen, 1991). Interestingly, our observations point to a strong influence of MACF1 at

439 axons endplates to control myonuclei clustering and microtubule organization dynamics and
440 this make sense as this site is known to strongly accumulates microtubule network (Ralston et
441 al., 2001). Synaptic alteration in the local “microtubule code” can itself drive changes in forces
442 applied locally on synaptic myonuclei, independently of myonuclei membrane proteins, and
443 contribute to the NMJ integrity. Interestingly, extra-synaptic myonuclei are affected by this
444 change of dynamics after the synaptic myonuclei, suggesting a different pool of proteins
445 controlling myonuclei localization between synaptic and extra-synaptic myonuclei.

446
447 Genetic inactivation of *Macf1* redistributes microtubule dynamic equilibrium, which acts on
448 diverse pathways that control muscle functionality. MACF1 directly affects NMJ integrity
449 through the control of AChRs clustering (Fig2 & 4). We observe an early failure in the capacity
450 to cluster AChRs *in vitro* in mature myofibers (Fig2). This effect is confirmed in conditionally
451 mutant mice (*Macf1^{fl/fl} Cre+*), which exhibit failure in AChRs clustering at the contact with
452 motoneurons. This specific alteration of NMJ integrity is most likely responsible for the
453 decrease in muscle performance (Fig5). This possibility is reinforced by the facts that first,
454 myofibril genesis is not impacted either *in vitro* in mature *Macf1*-KD myofibers or *in vivo*
455 in mutant mice (*Macf1^{fl/fl} Cre+*) and second, there is no alteration in SR- Ca^{2+} release even though
456 the overall structure of T-tubule network seems to be affected in few myofibers (Fig7). In
457 contrast, we observed, in our *in vitro* model, an alteration in the organization of the
458 mitochondrial network (Fig2). This modification is translated in the conditional mutant mice
459 into a strong increase of mitochondria with shape alteration, mainly smaller and rounder (Fig6).
460 Interestingly, we also observe an increase in the number of oxidative fibers by muscle and it
461 appears to be dependent on muscle type, without changes in myofibers typology according to
462 myosin type expression (fast or slow muscle fibers). This alteration in oxidative fibers content
463 is correlated with an increase of the resistance to fatigue (Fig6). This effect of MACF1 down-
464 expression on mitochondria organization is consistent with a number of previous observations,
465 namely, microtubule network, through molecular motors such as Kif5b and Dynein, previously
466 shown to control mitochondrial movements in myoblasts (iqbal and Hood, 2014). Additionally,
467 MACF1 was shown to affect mitochondria localization through nuclear positioning in oocyte
468 egg (Escobar-Aguirre et al., 2017). Interestingly, the interplay between actin branching and
469 microtubule acetylation has been recently pointed out as a mitochondrial distribution keeper in
470 fibroblasts cells (Shi et al., 2019). Increase in microtubule dynamic run against stabilization of
471 microtubules partners, but even worse, it can contribute to the delocalization of few MAPs that
472 preferentially bind to stable microtubule (Gache et al., 2010). Among them, DNM2, is a MAP
473 that preferentially associate with stable microtubules (Tanabe and Takei, 2009). The absence of
474 MACF1 could contribute to the release of DNM2 clustered on stable microtubule and
475 consequently trigger mitochondria fission in mutant mice (*Macf1^{fl/fl} Cre+*) (Kraus and Ryan,
476 2017). Alternatively, increase in microtubule dynamic instability directly impact local
477 concentration of free tubulin (Gache et al., 2005) whereas free available tubulin- β II was shown
478 to affect mitochondrial metabolism and organization (Kumazawa et al., 2014; Guzun et al.,
479 2011; Guerrero et al., 2009). In this perspective, MACF1 could command mitochondria shape
480 and functionality through the control of microtubule dynamics in muscle fibers.

481
482 Various diseases can directly affect NMJs integrity, resulting in a progressive disconnection
483 between muscles and motoneurons. Two of the most common laminopathies, Limb-Girdle
484 Muscular Dystrophy (LGMD) and Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy (EDMD), which affect
485 striated skeletal muscles, typically lead to a disproportion of fiber size, myonuclei aggregation
486 along myofibers and dispersion under NMJs (Chojnowski et al., 2015). Conversely
487 pathological mechanisms affecting presynaptic site can similarly lead to synaptic myonuclei
488 dispersion as is the case in MotoNeuron Diseases (MNDs), such as Amyotrophic Lateral

489 Sclerosis (ALS), a fatal neurodegenerative condition characterized by progressive motoneuron
490 denervation and muscle atrophy associated with synaptic myonuclei dispersion (Geevasinga et
491 al., 2016). Additionally, there are several conditions where peripheral myonuclei localization is
492 affected. For example, in a heterogeneous group of inherited muscle diseases, CentroNuclear
493 Myopathies (CNMs), are defined pathologically by an abnormal localization of myonuclei in
494 the center of muscle fibers (Jungbluth and Gautel, 2014). But unlike many myopathies, CNMs
495 are not linked to excessive degeneration/regeneration processes. Genes implicated in various
496 forms of CNMs as well as encode proteins that participate in different aspect of membrane
497 remodeling and trafficking such as Mtm1, Amphiphysin-2/BIN1, Dynamin-2 and Hacd1 have
498 been already identified (Laporte et al., 1996; Bitoun et al., 2005; Muller et al., 2003;
499 Muhammad et al., 2013). In addition, in the case of Sarcopenia, peripheral myonuclei are also
500 progressively lost (Edström et al., 2007; Malatesta et al., 2009; Brooks et al., 2009). Altogether,
501 MACF1 will be a perfect candidate, from the postsynaptic muscle view, to investigate the basis
502 of motoneuron diseases and the “de-peripherization” of myonuclei in skeletal muscle in various
503 types of myopathies.

504

505 **Figures legend**

506

507 **Figure 1: MACF1 is an essential regulator of myonuclei positioning in mature myofibers.**

508 (A) Schema of sequential steps in order to obtain immature myotubes and mature myofibers
509 from primary myoblasts. siRNA/shRNA were transfected in early phases of myotubes fusion.
510 (B). Western blot analysis of MACF1 protein expression in total protein extracts of primary
511 myoblast not treated (WT), treated with 3 individual siRNAs (#952, #954, #958) or a pool of 3
512 individual siRNAs targeting *Macf1* after 3 days of differentiation. Tubulin is used as “loading
513 control”. (C) Western blot analysis of MACF1 protein expression in total protein extracts of
514 primary myoblast treated with a pool of 3 individual siRNAs or a pool of 4 shRNAs targeting
515 *Macf1* after 11 days of differentiation. HSP90 is used as “loading control”. (D-E)
516 Representative images of immunofluorescence staining from 3 individual experiments
517 presenting Myosin Heavy Chain (green, MHC) and myonuclei (red) in primary myotubes
518 treated with scramble (D) or a pool of 3 individual siRNAs targeting *Macf1* (E) after 3 days of
519 differentiation. Scale Bar = 150 μ m. (F) Mean distances between each myonuclei and
520 myotube’s centroid ranked by myonuclei content per myotubes were quantified after 3 days of
521 differentiation in cells treated with a scramble or a pool of 3 individual *Macf1* siRNAs. (G-H)
522 Myonuclei Spreading Graph (MSG) represents statistical spatial distribution of myonuclei
523 along myotubes in scramble (G) and in *Macf1* siRNA-treated myotubes (H). In F-H, 3
524 individual experiments, n=170 for scramble and n=365 for SiRNA *Macf1* conditions. (I-J)
525 Representative images of 10 days differentiated myofibers stained, for DiHydroPyridine
526 Receptor (green) and Dapi (red) in cells treated with scramble siRNA (I) or a pool of 3
527 individual siRNAs targeting *Macf1* (J). Scale Bar= 50 μ m. (K) Mean distance between adjacent
528 myonuclei in primary myotubes treated with scramble, 3 individual siRNAs (#952, #954, #958)
529 or a pool of 3 individual siRNA targeting *Macf1* and in primary myotubes treated with
530 scramble, 4 individual shRNAs (#1, #2, #3, #4) or a pool of 4 individual shRNAs targeting
531 *Macf1* after 10 days of differentiation from 3 individual experiments with at least n=400 by
532 conditions.

533

534 **Figure 2: MACF1 control myonuclei shape, microtubule integrity, mitochondria**

535 **localization and AChRs clustering in mature myofibers.** (A) Representative images of 10
536 days differentiated myofibers, stained, from the top to the bottom respectively, for Tyrosinated-
537 Tubulin (green), Alpha-actinin (green), Actin (red), Cytochrome-C (green) and acetylcholine
538 receptor (Green) in cells treated with scramble siRNA (left panels) or a pool of 3 individual

539 siRNAs targeting *Macf1* (right panel). Myonuclei are stained in blue or red. Scale Bar= 20 μ m.
540 (B) Myofibers width (3 individual experiments with at least n=190 by conditions) and (C)
541 myonuclei ferret (3 individual experiments with at least n=170 by conditions) in primary
542 myotubes treated with scramble, 3 individual siRNAs (#952, #954, #958) or a pool of 3
543 individual siRNAs targeting *Macf1* and in primary myotubes treated with scramble, 4
544 individual shRNAs (#1, #2, #3, #4) or a pool of 4 individual shRNAs targeting *Macf1* after 10
545 days of differentiation. (D) Mitochondria fragmentation (2 individual experiments with at least
546 n=800 by conditions) and (E) distribution around myonuclei (2 individual experiments with at
547 least n=30 by conditions) in cells treated with scramble siRNA/shRNA, a pool of 3 individual
548 siRNAs or a pool of 4 individuals shRNAs targeting *Macf1* after 10 days of differentiation. (F)
549 Percentage of myofibers expressing immunofluorescence staining for acetylcholine receptors in
550 primary myotubes treated with scramble shRNA, 4 individual shRNAs (#1, #2, #3, #4) or a
551 pool of 4 individual shRNAs targeting *Macf1* after 10 days of differentiation. 3 individual
552 experiments with at least n=130 by conditions. (G) Acetylcholine receptors (AChR) clustering
553 distribution in cells treated with scramble shRNA or 4 individual shRNAs (#1, #2, #3, #4) or a
554 pool of 4 individual shRNAs targeting *Macf1* after 10 days of differentiation. 3 individual
555 experiments with at least n=130 by condition. Error bars, s.e.m. ***p < 0.001, **p < 0.01, *p <
556 0.05.

557
558 **Figure 3: MACF1 controls microtubules and myonuclei dynamics.** (A) Representative
559 images of primary myotubes transfected with EB1-GFP with either scramble or a pool of 3
560 individual siRNAs targeting *Macf1* (#952, #954, #958) showing colored comets. (B)
561 Quantification of EB1 comets speed in myoblasts treated with scramble or a pool of 3
562 individual siRNAs targeting *Macf1* in primary myotubes after 3 days of differentiation. At least
563 200 comets were mapped per condition from 3 independent experiments. Error bars, s.e.m.
564 ***p < 0.001. (C) Representatives frames from a 14h time-lapse movie in two channels
565 (shRNA in green and lamin-chromobody® in red) of primary myotubes in the presence of
566 Agrin and covered by matrigel. In the first frame (on the left), myofibers are selected in white,
567 which corresponds to the region used to create the adjacent kymograph. Primary myotubes
568 were treated with scramble or a pool of 4 individual shRNAs targeting *Macf1* after 5 days of
569 differentiation. 3 individual experiments with at least n=200 by conditions. Speed (D), Time in
570 motion (E), Duration of pauses (F) and Distance crossed by myonuclei (G) were quantified
571 using SkyPad analysis (Cadot et al., 2014). ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05.

572
573 **Figure 4: muscle specific MACF1 knockout presents myonuclei organization failure.** (A)
574 Representative images of Tibialis Anterior muscle cross-section from *Macf1^{fl/fl}* Cre- and *Macf1^{fl/fl}*
575 Cre+ mice at the age of 8 and 12 months-old, stained for Dapi (red) and Laminin (green).
576 Example of myofibers with mis-localized myonuclei are stamped by white arrows. Scale Bar =
577 150 μ m. (B) Quantification of the percentage of myofibers with mis-localized myonuclei in 3,
578 8 and 12 months-old *Macf1^{fl/fl}* Cre- and *Macf1^{fl/fl}* Cre+ in *Tibialis Anterior*, *Soleus* and
579 *Gastrocnemius* muscles. ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05. Distribution of cross-sectioned
580 myofibers areas from the *Tibialis Anterior* in 3 (C), 8 (D) and 12 (E) months-old *Macf1^{fl/fl}* Cre-
581 and *Macf1^{fl/fl}* Cre+ mice. Representative images of *Tibialis Anterior* (F) or *Extensor Digitorum*
582 *Longus* (G) extracted myofibers stained for Dapi (blue) and Phalloidin (purple) from 12
583 months-old *Macf1^{fl/fl}* Cre- and *Macf1^{fl/fl}* Cre+ mice. Mis-localized myonuclei are stamped by
584 green arrows. At least 3 mice per condition were analyzed. Scale Bar = 150 μ m.

585
586 **Figure 5: muscle specific MACF1 knockout mice display NMJ integrity failure in parallel**
587 **with the loss of dynamic microtubules.** (A) Representative images of *Tibialis Anterior* (Top)
588 or *Extensor Digitorum Longus* (Bottom) extracted myofibers from 12 months-old *Macf1^{fl/fl}* Cre-

589 and *Macfl^{ff}* Cre+ mice stained for Dapi (blue), Phalloidin (purple) and Bungarotoxin (green).
590 Scale Bar = 150 μ m. (B) Representative images of extracted myofibers from *Rectus Lateralis*
591 muscle stained for Dapi (blue), presynaptic markers (Neurofilament & Synaptic vesicles 2
592 (red)) and Bungarotoxin (green) from 4 months-old *Macfl^{ff}* Cre- and *Macfl^{ff}* Cre+ mice. Scale
593 Bar = 150 μ m. (C) Quantification of NMJ (bungarotoxin staining) fragmentation. (D)
594 Quantification of myonuclei number under Bungarotoxin staining. ***p < 0.001. At least 3
595 mice per condition were used, n=37. (E) Representative images of *Tibialis Anterior* extracted
596 myofibers stained for Tyrosinated-Tubulin or de-Tyrosinated-Tubulin. In the overlay
597 Tyrosinated-Tubulin (blue), de-Tyrosinated-Tubulin (green) and Bungarotoxin (red) from 12
598 months-old *Macfl^{ff}* Cre- and *Macfl^{ff}* Cre+ mice.
599

600 **Figure 6: muscle specific MACF1 knockout affects mitochondrial content and structure.**
601 (A) Representative images of transversal cross section of *Tibialis Anterior* muscle from 12
602 months-old *Macfl^{ff}* Cre- and *Macfl^{ff}* Cre+ mice stained Succinate DeHydrogenase activity.
603 Scale Bar = 150 μ m. (B) Quantification of the Succinate DeHydrogenase activity relative to
604 myofibers repartition in conditional mutant mice compare to control, **p < 0.01. (C) Western
605 blot analysis of OXPHOS proteins, TOM20 and Actin expressions in total *Gastrocnemius*
606 muscles protein extracts from 12 months-old *Macfl^{ff}* Cre- and *Macfl^{ff}* Cre+ mice. (D)
607 Representative images of transversal cross section of *Tibialis Anterior* muscle from 12 months-
608 old *Macfl^{ff}* Cre- and *Macfl^{ff}* Cre+ mice stained for slow myosin (red) and laminin (green).
609 Scale Bar = 150 μ m. (E) Quantification of the percentage of myofibers with slow myosin
610 expression in 12 months-old *Macfl^{ff}* Cre- and *Macfl^{ff}* Cre+ in *Tibialis Anterior*, *Soleus* and
611 *Gastrocnemius* muscles. (F) Representative electronic microscopy images of myofibrils and
612 mitochondria organization of *Tibialis Anterior* muscles from 12 months-old *Macfl^{ff}* Cre- and
613 *Macfl^{ff}* Cre+ mice. Scale Bar = 1 μ m.
614

615 **Figure 7: muscle specific *Macfl* knockout affects muscle functions and T-tubule
616 formation but not RS Ca²⁺ release.** (A) Force production from the *Hindlimb* muscles in
617 young (4 months) and adult (12 months) *Macfl^{ff}* Cre- and *Macfl^{ff}* Cre+ mice in response to
618 various incremental stimulation frequencies (from 1 to 100 Hz). **p < 0.01, *p < 0.05. (B)
619 Quantification of the fatigue index from the *Hindlimb* muscles in young (4 months) and adult
620 (12 months) *Macfl^{ff}* Cre- and *Macfl^{ff}* Cre+. *p < 0.05. (C) Representative electronic
621 microscopy images of myofibrils and T-tubule organization of *Tibialis Anterior* muscles from
622 12 months-old *Macfl^{ff}* Cre- and *Macfl^{ff}* Cre+ mice. Scale Bar = 0,5 μ m. (D) Representatives
623 fluorescence images of di-8-anepbs staining of the T-tubule network in a *Macfl^{ff}* Cre- and
624 *Macfl^{ff}* Cre+ mice muscle fibers. Quantification of T-tubule density index (E), Sarcomere
625 length (F) and T-Tubules orientation (G) in a *Macfl^{ff}* Cre- and *Macfl^{ff}* Cre+ mice muscle
626 fibers. (H) Representative rhod-2 Ca²⁺ transients in a *Macfl^{ff}* Cre- and in a *Macfl^{ff}* Cre+ fiber
627 in response to 0.5s long depolarizing pulses from -80mV to the range of indicated values, with
628 intervals of 10 mV. (I) Corresponding Ca²⁺ release flux (d[CaTot]/dt) traces calculated as
629 described in the Methods. (J) Mean voltage-dependence of the peak rate of SR Ca²⁺ release in
630 *Macfl^{ff}* Cre- and in a *Macfl^{ff}* Cre+ fibers. (K) Inset shows the mean values for maximal rate,
631 half velocity and k index of SR Ca²⁺ release in the two groups of fibers, as assessed from
632 Boltzmann fits to data from each fiber.
633

634 **Supplementary figure 1: MACF1 expression in myotubes and myofibers.** (A) Table
635 showing mass spectrometry identification of MACF1 and Kif4b in 3 days-old primary
636 myotubes. (B) Schematic representation of MACF1 already identified domains. ABD is the
637 "Actin Binding Domain" and MBD is the "Microtubule Binding Domain". (C) QRT-PCR
638 analysis of *Macfl* gene expression level relative to *Hprt1* and *Gapdh* gene in proliferating

639 C2C12 cells (GM) and after 1, 3, or 5 days of differentiation. Data's means are \pm SEM (n=3).
640 (D) Western blot analysis of MACF1 protein expression in total protein extracts from
641 proliferating cells (GM) to differentiating C2C12 myotubes after 1, 3, or 5 days of
642 differentiation in cells treated with either Scramble shRNA (control) or a pool of 4 individual
643 shRNAs targeting *Macf1* gene. Tubulin is used as "loading control". Myotubes Area (E) and
644 myotubes length (F) ranked by myonuclei content per myotubes were quantified after 3 days of
645 differentiation in cells treated with a scramble or a pool of 3 individual *Macf1* siRNAs. In E-H,
646 3 individual experiments, n=170 for scramble and n=365 for siRNA *Macf1* conditions. (G-J)
647 Immunofluorescence staining of Myosin Heavy Chain (green) and myonuclei (red) in 5-days
648 old C2C12 myotubes treated with scramble siRNA (G) or a pool of 3 individual siRNAs
649 targeting *Macf1* (H) and in C2C12 myotubes treated with scramble shRNA (I) or a pool of 4
650 individual shRNAs targeting *Macf1* (J). Scale Bar = 50 μ m.

651

652 **Supplementary figure 2: MACF1/Shot in myotubes and myofibers.** (A-B) Larval muscles
653 labeled with Shot (Green), Dapi (blue) and Phalloidin (red) in WT (left) or RNAi treated
654 muscle-targeting *Shot* (right panel). (C) Larval muscles labeled with Discs-Large, Dlg (Green),
655 Dapi (blue) and Phalloidin (red) in WT (left) or RNAi treated muscle targeting *Shot* (right
656 panel). (D) Larval muscles labeled with Bruchpilot, BRP (Green), Dapi (blue) and Phalloidin
657 (red) in WT (left) or RNAi treated muscle targeting *Shot* (right panel). Scale Bar = 50 μ m.

658

659 **Supplementary figure 3: Muscle specific *Macf1* knockout mice.** (A) Schema of the strategy
660 used to generate mouse muscle specific *Macf1* knockout mouse model (B) Mutant mice
661 carrying a Cre transgene under the control of the Human Skeletal Actin (HSA) promoter
662 confirmed by genomic PCR. (C) Total MACF1 expression is reduced by Half-fold in
663 *Gastrocnemius* muscle lysates. Mean \pm SEM values from three independent experiments. ***p
664 < 0.001. (D) Dot blot assay for MACF1 expression in Heart, Brain and *Gastrocnemius* lysates
665 from *Macf1^{fl}Cre-* and *Macf1^{fl}Cre+* (E) Evolution of *Macf1^{fl}Cre-* and *Macf1^{fl}Cre+* body mass
666 of mice during 12 month (n=4). (F) Representative images of *Gastrocnemius* and *Soleus*
667 muscle cross-section in 8 and 12 months-old *Macf1^{fl}Cre-* and *Macf1^{fl}Cre+* mice ^f stained for
668 Dapi (red) and Laminin (green). Example of myofibers with mis-localized myonuclei are
669 stamped by white arrow. Scale Bar = 150 μ m. (G) Quantification of the total number of
670 myofibers in 3, 8 and 12 months-old *Macf1^{fl}Cre-* and *Macf1^{fl}Cre+* mice from in *Tibialis*
671 *Anterior*, *Soleus* and *Gastrocnemius* muscles.

672

673 Video legend

674

675 **Movie 1.** EB1 comets velocity in primary myotubes transfected with EB1-GFP and scrambled
676 siRNA. Picture were recorded every 500 ms. Movie correspond to Figure 3A Scramble.

677

678 **Movie 2.** EB1 comets velocity in primary myotubes transfected with EB1-GFP and a pool of 3
679 individual siRNAs (#952, #954, #958) targeting *Macf1*. Picture were recorded every 500 ms.
680 Movie correspond to Figure 3A MACF1 siRNA.

681 **Movie 3.** Nuclear movements in primary myotubes transfected with a scrambled shRNA
682 (green) and lamin-chromobody® (red). Picture were recorded every 15 min. Movie correspond
683 to Figure 3C sh-Scramble.

684

685 **Movie 4.** Nuclear movements in primary myotubes transfected with a pool of 4 individual
686 shRNAs targeting *Macf1* (green) and lamin-chromobody® (red). Picture were recorded every
687 15 min. Movie correspond to Figure 3C sh-MACF1.

688

689 **Materials and methods**

690

691 **Cell culture**

692

693 Primary myoblasts were collected from wild type C57BL6 mice as described before (Falcone et
694 al., 2014; Pimentel et al., 2017). Briefly, Hindlimb muscles from 6 days pups were extracted
695 and digested with collagenase (Sigma, C9263-1G) and dispase (Roche, 04942078001). After a
696 pre-plating step to discard contaminant cells such as fibroblasts, myoblasts were cultured on
697 matrigel coated-dish (Corning, 356231) and induced to differentiate in myotubes for 2-3 days
698 in differentiation media (DM: IMDM (Gibco, 21980-032) + 2% of horse serum (Gibco, 16050-
699 122) + 1% penicillin-streptomycin (Gibco, 15140-122)). Myotubes were then covered by a
700 concentrated layer of matrigel and maintained for up to 10 days in long differentiation culture
701 medium (LDM: IMDM (Gibco, 21980-032) + 2% of horse serum (Gibco, 16050-122) + 0.1%
702 Agrin + 1% penicillin-streptomycin (Gibco, 15140-122)) until the formation of mature and
703 contracting myofibers. LDM was changed every two days.

704 Mouse myoblast C2C12 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM
705 (Gibco, 41966029) + 15% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, 10270-106) + 1% penicillin-
706 streptomycin (Gibco, 15140-122))) and were plated on 0.1% matrigel-coated dishes for 1-2
707 days before differentiation. Differentiation was induced by switching to differentiation media
708 (DMEM + 1% horse serum).

709 **Production of wild type Agrin recombinant proteins**

710 For production of recombinant proteins, the stably transfected HEK293-EBNA cell lines were
711 grown to about 80 % confluence and were transferred to expression medium without FBS.
712 Conditioned medium containing secreted proteins was collected every 3 days and replaced with
713 fresh expression media for 12 days. Conditioned medium was centrifuged at 2,000xg for 10
714 min to pellet the cells before storing at -20°C. After thawing, recombinant proteins were
715 purified from conditioned media by HPLC, on a HiTRAP ImaC HP column (GE Healthcare,
716 17-0920-03), eluted with imidazol and desalted on silica column with PBS (HiPrep
717 26 /10Desalting, GE Healthcare) or on a Vivaspin column (Vivaspin Sartorius). The absolute
718 concentration of soluble Agrins was estimated on a coomassie blue stained gel by comparison
719 with a known amount of a commercial purified Agrin.

720 **Cell transfection**

721

722 For C2C12 cells, 3 different siRNAs Silencer per gene were transfected in cells using
723 Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientifics, 11668-019) at the final concentration of 10
724 nM, following manufacturer instructions, 2 days before differentiation. For shRNA cDNA
725 (Geneocopia), we used Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientifics, 11668-019) was used
726 following manufacturer instructions as well.

727

728 For primaries cells, siRNA were transfected using Lipofectamine 2000 (ThermoFisher
729 Scientifics, 11668-019) at the final concentration of 2nM. shRNA (Geneocopia), Eb1 or RFP-
730 Lamin-chromobody (Chromotek) cDNA were transfected in cells using Llipofectamine 3000
731 (ThermoFisher Scientifics, L3000-008).

732

siRNA	Sense oligonucleotide sequence	Anti-Sense oligonucleotide sequence
-------	--------------------------------	-------------------------------------

MACF1 #952	GAGUUUCAAAAAGAACCUUAtt	UAAGGUUCUUUUGAAACUCtt
MACF1 #954	CAAUACAGCUGAAAAAGUUtt	AACUUUUUCAGCUGUAUUGgg
MACF1 #958	GGAUGAAAUAUACUCGAtt	UCGAGUAUUAUUUCAUCCat
shRNA	Clone Name	Target Sequence
MACF1 #1	MSH071923-1-CU6 (OS398499)	GCACATCAATGATCTCTATGA
MACF1 #2	MSH071923-2-CU6 (OS398500)	GCAGGTGAAGCTAGTGAATAT
MACF1 #3	MSH071923-3-CU6 (OS398501)	GCAGATTGCAAAACAAGATACA
MACF1 #4	MSH071923-4-CU6 (OS398502)	GCTAAAGAATATCCGACTACT

733

734

Protein sample preparation

735

736 For primary cultured cells or C2C12 cell lines, cells were harvested, using 1X Trypsin for 5min
737 at 37°C and centrifuged at 1500RPM for 5min at 4°C. Cell pellets were diluted and incubated
738 in the optimal volume of RIPA lysis buffer containing phosphatases inhibitors (Sigma, P5726-
739 5mL) and proteases inhibitors (Sigma, P8340) for 10min at 4°C. Following a sonication and a
740 centrifugation at 12000RPM for 10min at 4°C, protein samples were collected for further uses.
741 The concentration of proteins was determined using BCA protein assay kit (Thermo Fisher
742 Scientifics, 23225) as described by the manufacturer.

743

744

Western blot and dot blot analysis

745 To carry out western blots, the same amount of sample were loaded in 6% acrylamide gels and
746 were migrated at 130V for 10min followed by 160V for 90min. iBlot 2 mini slacks (Thermo
747 Fisher Scientifics, IB23002) semi-dry system was used to transfer the proteins to nitrocellulose
748 membranes. Membranes were then saturated in 5% milk in TBS for 1H at RT and were
749 incubated in primary antibodies in 5% milk in TBS over night at 4°C. Following washes by
750 0.1% Tween-20-1X TBS, the membranes were incubated in HRP conjugated secondary
751 antibodies in 5% milk in TBST for 1H at RT. Following washes by 0.1% Tween-20-1X TBS
752 the detection of the target proteins was carried out using Super Signal West Femto (Thermo
753 Fisher Scientifics, 34095) and ChemiDoc imaging system (BioRad).

754

755 To carry out dot blots, Bio-Dot SF Microfiltration Apparatus plates (BioRad) were used to
756 transfer the protein samples onto the nitrocellulose membranes. Membranes were then saturated
757 in 5% milk in TBS for 1H at RT and were incubated in primary antibodies over night at 4°C.
758 Following washes by 0.1% Tween-20-1X TBS, the membranes were incubated in HRP
759 conjugated secondary antibodies in 5% milk in TBST for 1H at RT. Following washes by 0.1%
760 Tween-20 in TBS the detection of the target proteins was carried out using Super Signal West
761 Femto (Thermo Fisher Scientifics, 34095) and ChemiDoc imaging system (BioRad).

762

Primary cells immunofluorescence staining

763

764
765 Cells were fixed in 4%PFA in PBS for 20min at 37°C followed by washes with PBS and
766 permeabilization with 0.5% Triton-X100 in PBS for 5min at RT. Following washes with PBS,
767 cells were saturated with 1% BSA in PBS for 30min at 37°C and incubated in primary
768 antibodies over night at 4°C. Following washes with 0.05% Triton-X100-1X PBS, cells were
769 incubated in secondary antibodies or dyes for 2H at RT followed by washes with 0.05% Triton-
770 X100 in PBS and a last wash in PBS. Cultured myofibers were imaged using either Z1-
771 AxioObserver (Zeiss) or confocal SP5 microscope (Leica).

772

Isolation of mono-myofibers and immunofluorescence staining

773

774

775 Following the dissection of the whole muscle from the mice, TA or EDL muscle blocks were
 776 fixed in 4%PFA in PBS for 2H at RT. After washes, 30 to 50 mono-myofibers were isolated
 777 per staining from each muscle. Myofibers were then permeabilized using 0.5% Triton-X100 in
 778 PBS for 5min at RT and saturated in 1% BSA in PBS for 30min at RT. Based on the
 779 experiments, myofibers were incubated in desired primary antibodies at 4°C over night.
 780 Following washes with 0.05% Triton-X100 in PBS, myofibers were incubated in secondary
 781 antibodies or dyes for 2H at RT followed by washes with 0.05% Triton-X100 in PBS and a last
 782 wash in PBS. Myofibers were mounted on slides using fluromount Aqueous mounting (Sigma,
 783 F4680-25mL) and kept at 4°C or -20°C. Slides were analyzed using confocal SP5 microscope
 784 (Leica) or TI-Eclipse (Nikon).

785

786 **Antibodies**

787

Antibody or Dye	Species and Utility	Dilution Factor	Manufacturer and Reference
Anti-Cytochrome-C	Mouse - primary	1:300	Cell Signaling Technologies 12963S
Anti-MACF1	Rabbit - primary	1:100	Santa Cruz SC-68430
Anti-TOM20	Rabbit - primary	1:1000	Cell Signaling Technologies D8T4N
Anti-OXPHOS	Mouse - primary	1:1000	Abcam Ab110413
Anti- α -Tubulin	Mouse - primary	1:1000	Sigma T6074-200uL
Anti-HSP90	Mouse - primary	1:1000	Enzo life SPA830
Anti-Tyrosinated Tubulin	Rat - primary	1:100	Andrieux's Lab gift
Anti-deTyrosinated Tubulin	Rabbit - primary	1:100	Andrieux's Lab gift
MF20	Mouse-primary	1:10	DSHB
Dapi-brilliant blue	Dye	1:50000	Thermo Fisher Scientifics D1306
α -Bungarotoxin-Alexa Flour 488	Dye	1:1000	Thermo Fisher Scientifics B13422
α -Bungarotoxin-Alexa Flour 555	Dye	1:200	Thermo Fisher Scientifics B35451
Phalloidin-Alexa Flour 647	Dye	1:100	Thermo Fisher Scientifics A22287
Anti-mouse-HRP	Goat - secondary	1:3000	Invitrogen 62-6520
Anti-rabbit-HRP	Goat - secondary	1:3000	Invitrogen 65-6120
Anti-rat-Alexa Flour 488	Donkey - secondary	1:500	Thermo Fisher Scientifics A-21208
Anti-rabbit-Alexa Flour 647	Goat - secondary	1:500	Thermo Fisher Scientifics A-21245

Anti-mouse-Alexa Flour 647	Goat - secondary	1:500	Thermo Fisher Scientifics A-21240
----------------------------	------------------	-------	--------------------------------------

788

789 **Video-Microscopy**

790

791 Time-lapse images were acquired using Z1-AxioObserver (Zeiss) with intervals of 15minutes.
792 Final videos were analyzed using Metamorph (Zeiss) and SkyPad plugin as described before
793 (Cadot et al., 2014).

794

795 **Electronic-Microscopy**

796

797 Tissues were cut into small pieces and fixed in 2% glutaraldehyde for 2H at 4°C. Samples were
798 washed three times for 1H at 4°C and post-fixed with 2% OsO₄ 1H at 4°C. Then tissues were
799 dehydrated with an increasing ethanol gradient (5min in 30%, 50%, 70%, 95%) and 3 times for
800 10min in absolute ethanol. Impregnation was performed with Epon A (75%) plus Epon B
801 (25%) plus DMP30 (1,7%). Inclusion was obtained by polymerization at 60°C for 72H.
802 Ultrathin sections (approximately 70 nm thick) were cut on a UC7 (Leica) ultra-microtome,
803 mounted on 200 mesh copper grids coated with 1:1,000 polylysine, and stabilized for 1 day at
804 room temperature (RT) and contrasted with uranyl acetate and lead citrate. Sections were
805 acquired with a Jeol 1400JEM (Tokyo,Japan) transmission electron microscope, 80Kv,
806 equipped with a Orius 600 camera and Digital Micrograph.

807

808 **Drosophila model**

809

810 Shot GD9507 UAS-RNAi line from VDRC collection crossed to Mef2-GAL4 driver has been
811 used to attenuate shot gene expression specifically in muscles. Third instar larvae were
812 dissected in physiological salt with 25mM EDTA. Body wall muscles were fixed with 4%
813 formaldehyde in PBS for 15min and then rinsed three times for 5min each in PBS with 0.5%
814 Tween 20 (PBT). Muscles were blocked for 30min with 20% horse serum in PBT at RT.
815 Staining was performed by using primary antibodies applied overnight at 4°C and after washing
816 3 times in PBT secondary antibodies were applied at RT for 1H. The following primary
817 antibodies were used: anti-Brp1 (1:100; DSHB, Nc82-s), anti-Shot (1:100; DSHB, mAbRod1).

818

819 **Mouse model**

820 The following mice have been described previously, mice that carry a loxP-flanked allele of
821 *Macf1* (Goryunov et al., 2010) and Hsa-Cre transgenic mice (Miniou et al., 1999). All of the
822 experiments and procedures were conducted in accordance with the guidelines of the local
823 animal ethics committee of the University Claude Bernard – Lyon 1 and in accordance with
824 French and European legislation on animal experimentation and approved by the ethics
825 committee CECCAPP and the French ministry of research. At least 3 *Macf1^{ff}* Cre- or Cre+
826 mice were tested for each experiment.

827 **Genotyping of mice**

828

829 In order to extract the DNA, samples (mice tails) were incubated in extraction solution (25mM
830 NaOH – 0.2mM EDTA) for 30min at 95°C. Following the addition of neutralization solution
831 (40mM Tris-HCL), samples were centrifuged at 13000RPM for 2min at RT and the DNA were
832 collected. DNA concentration was evaluated using Nanodrop (ThermoFisher Scientifics). PCR
833 were carried (Hot Start Taq polymerase (QIAGEN, 1007837), PCR buffer mix (QIAGEN,

834 1005479) DNTP mix (Biolabs, 447)) using following primers. The same amount of PCR
 835 products were then loaded in 2X Agarose-1X TAE gels and were migrated for 2H at 130V.
 836 Results were obtained using GelDoc (BioRad).
 837

Primer	Sequence
MACF1 F	CATCAGAAGAGATCAACCAACC
MACF1 R	AAAGGAAGAGAGGTCCAAGGT
Cre F	GAGTTGATAGCTGGCTGGTGGCAGATG
Cre R	CCTGGAAAATGCTTCTGTCCGTTTGCC
CD8 F	GGTGCATTCTCACTCTGAGTTCC
CD8 R	GCAGACAGAGCTGATTTTCCTATGTG

838

839 RNA extraction

840 After the addition of Trizol (Sigma, T9424-200mL) on each sample, lysing matrix D and fast
 841 prep system (MPbio, 6913-100) were used for sample digestion and pre-RNA extraction. In
 842 order to extract RNA, samples were incubated in chloroform for 5min at RT, centrifuged for
 843 15min at 12000 rcf at 4°C and incubated in the tubes containing isopropanol (precipitation of
 844 RNA) for 10min at RT. following a centrifuge of samples for 15min at 12000rcf at 4°C,
 845 samples were washed 2 times with 70% ethanol and the final RNA pellets were diluted in ultra-
 846 pure RNase free water (Invitrogen, 10977-035). RNA concentration was calculated using
 847 Nanodrop (ThermoFisher Scientific).

848 RT-q-PCR

849 Goscript Reverse Transcriptase System (Promega, A5001) was used, as described by the
 850 manufacturer to produce the cDNA. Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox)(Roche,
 851 04913914001) and CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (BioRad) were used to
 852 carry out the quantitative PCR using the following primer sets. The CT of target genes were
 853 normalized on 3 control genes.

Primers	Sequence
MACF1 isoforms 1&2 F	AATACCGGTTCTTCCTCGGC
MACF1 isoforms 1&2 R	CATCCTCCACCAACTCGGAC
MACF1 isoform 2 F	TTGCGTGTGCTGAAGAAGAC
MACF1 isoform 2 R	GCAGAGTCTTTTGTTCGGTCTG
ChRNA F	TTCTTCGATGAGCAGAACT
ChRNA R	GGCAGCAGGAGTAGAACAC
Gusb F	GAGGATTGCCAACGAAACCG
Gusb R	GTGTCTGGGGACCACCTTTGA
GAPDH F	AACTTTGGCATTGTGGAAGG
GAPDH R	ACACATTGGGGGTAGGAACA
RpL4 F	GCCATGAGAGCGAAGTGG
RpL4 R	CTCCTGCAGGCGTCGTAG

854

855 Histological staining and analysis

856 *Tibialis anterior*, *Soleus* and *Gastrocnimius* muscles were collected, embedded in tragacanth
857 gum, and quickly frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen. Cross-sections (10µm thick)
858 were obtained from the middle portion of frozen muscles and processed for histological,
859 immunohistochemical, enzymohistological analysis according to standard protocols. The fibre
860 cross-sectional area and the number of centrally nucleated fibers were determined using
861 Laminin and Dapi-stained sections. Fluorescence microscopy and transmission microscopy
862 were performed using Axioimager Z1 microscope with CP Achromat 5x/0.12, 10x/0.3 Ph1, or
863 20x/0.5 Plan NeoFluar objectives (Zeiss). Images were captured using a charge- coupled device
864 monochrome camera (Coolsnap HQ, Photometrics) or color camera (Coolsnap colour) and
865 MetaMorph software. For all imaging, exposure settings were identical between compared
866 samples. Fiber number and size, central nuclei and peripheral myonuclei were calculated using
867 ImageJ software.

868 **Succinate DeHydrogenase (SDH) staining and analysis**

869 SDH staining was performed as previously described (NACHLAS et al., 1957). Briefly,
870 transverse sections (8µm) were cut from the mid-belly of the TA muscles on a cryostat at
871 -20°C and stored at -80°C until SDH staining was performed. The sections were dried at room
872 temperature for 30min before incubation in a solution made up of 0.2M phosphate buffer (pH
873 7.4), 0.1M MgCl₂, 0.2M Succinic Acid (Sigma) and 2.4mM NitroBlue Tetrazolium (NBT,
874 Sigma) at 37°C in a humidity chamber for 45min. The sections were then washed in deionized
875 water for 3min, dehydrated in 50% ethanol for 2min, and mounted for viewing with DPX
876 mount medium (Electron Microscopy Sciences). Images were acquired as described above.

877 **Confocal imaging of T-tubule network**

878
879 *FDB* muscle fibers were incubated for 30min in the presence of 10µm di-8-anepps in Tyrode
880 solution. Estimation of the T-tubule density from the di-8-anepps fluorescence was carried out
881 from a largest possible region of interest excluding the plasma membrane, within each fiber.
882 For each fiber, two images taken at distinct locations were used. Analysis was carried out with
883 the ImageJ software (National Institute of Health). Automatic threshold with the Otsu method
884 was used to create a binary image of the surface area occupied by T-tubules. The “skeletonize”
885 function was then used to delineate the T-tubule network. T-tubule density was expressed as
886 the percent of positive pixels within the region. Sarcomere length was estimated from half the
887 number of fluorescence peaks (T-tubules) along the length of the main axis of a given fiber. To
888 assess variability in T-tubule orientation, objects within two T-tubule binary images of each
889 fiber were outlined and particle analysis was performed to determine the angle of all objects
890 yielding a perimeter larger than an arbitrary value of 10µm. For each fiber, the standard
891 deviation of angle values was then calculated. This analysis was performed on 10 muscle fibers
892 from 3 *Mac1f/f Cre-* and from 3 *Mac1f/f Cre+* mice, respectively.

893 894 **Intracellular Ca²⁺ in voltage-clamped fibers**

895
896 Single fibers were isolated from *FDB* muscles as described previously (Jacquemond, 1997). In
897 brief, muscles were incubated for 60min at 37 °C in the presence of external Tyrode containing
898 2 mg/mL collagenase (Sigma, type 1). Single fibers were obtained by triturating the
899 collagenase-treated muscles within the experimental chamber.
900 Isolated muscle fibers were handled with the silicone voltage-clamp technique (Lefebvre et al.,
901 2014). Briefly, fibers were partly insulated with silicone grease so that only a short portion (50-
902 100µm long) of the fiber extremity remained out of the silicone. Fibers were bathed in a
903 standard voltage-clamp extracellular solution containing (in mM) 140 TEA-methanesulfonate,

904 2.5 CaCl₂, 2 MgCl₂, 1 4-aminopyridine, 10 HEPES and 0.002 tetrodotoxin. An RK-400 patch-
905 clamp amplifier (Bio-Logic, Claix) was used in whole-cell configuration in combination with
906 an analog-digital converter (Axon Instruments, Digidata 1440A) controlled by pClamp 9
907 software (Axon Instruments). Voltage-clamp was performed with a micropipette filled with a
908 solution containing (in mM) 120 K-glutamate, 5 Na₂-ATP, 5 Na₂-phosphocreatine, 5.5 MgCl₂,
909 15 EGTA, 6 CaCl₂, 0.1 rhod-2, 5 glucose, 5 HEPES. The tip of the micropipette was inserted
910 through the silicone within the insulated part of the fiber and was gently crushed against the
911 bottom of the chamber to ease intracellular equilibration and decrease the series resistance.
912 Intracellular equilibration of the solution was allowed for 30min before initiating
913 measurements. Membrane depolarizing steps of 0.5s duration were applied from -80mV.
914 Confocal imaging was conducted with a Zeiss LSM 5 Exciter microscope equipped with a 63x
915 oil immersion objective (numerical aperture 1.4). Rhod-2 fluorescence was detected in line-
916 scan mode (x,t, 1.15 ms per line) above 560nm, upon excitation from the 543nm line of a HeNe
917 laser. Rhod-2 fluorescence transients were expressed as F/F₀ where F₀ is the baseline
918 fluorescence. The Ca²⁺ release flux (rate of SR Ca²⁺ release) was estimated from the time
919 derivative of the total myoplasmic Ca²⁺ ([Ca_{tot}]) calculated from the occupancy of
920 intracellular calcium binding sites following a previously described procedure (Kutchukian et
921 al., 2017).

922

923 ***In vivo* force measurements**

924 Mice were initially anesthetized in an induction chamber using 4% isoflurane. The right
925 *Hindlimb* was shaved before an electrode cream was applied at the knee and heel regions to
926 optimize electrical stimulation. Each anesthetized mouse was placed supine in a cradle
927 allowing for a strict standardization of the animal positioning. Throughout a typical experiment,
928 anesthesia was maintained by air inhalation through a facemask continuously supplied with
929 1.5% isoflurane. The cradle also includes an electrical heating blanket in order to maintain the
930 animal at a physiological temperature during anesthesia. Electrical stimuli were delivered
931 through two electrodes located below the knee and the Achille's tendon. The right foot was
932 positioned and firmly immobilized through a rigid slipper on a pedal of an ergometer
933 (NIMPHEA_Research, AII Biomedical SAS) allowing for the measurement of the force
934 produced by the Hindlimb muscles (i.e., mainly the *Gastrocnemius* muscle). The right knee
935 was also firmly maintained using a rigid fixation in order to optimize isometric force
936 recordings. Monophasic rectangular pulses of 0.2ms were delivered using a constant-current
937 stimulator (Digitimer DS7AH, maximal voltage: 400V). The force-frequency curves were
938 determined by stepwise increasing stimulation frequency, with resting periods > 30s between
939 stimuli in order to avoid effects due to fatigue. For each stimulation train, isometric peak force
940 was calculated. After a 3-min recovery period, force was assessed during a fatigue protocol
941 consisting of 30Hz stimulation trains of 0.3s delivered once every second for 180s. The peak
942 force of each contraction was measured and averaged every 5 contractions. A fatigue index
943 corresponding to the ratio between the last five and the first five contractions was determined.
944 Force signal was sampled at 1000Hz using a Powerlab system and Labchart software
945 (ADInstruments).

946 **Quantification methods for myonuclei spreading in myotubes**

947 Quantifications in immature myotubes were assessed using an analysis tool developed in our
948 team. An image analysis performed in ImageJ® software is combined with a statistical analysis
949 in RStudio® software. This provides quantifications of parameters, ranked by myonuclei
950 content per myotubes, regarding phenotype of myotubes (area, length) and their respective
951 myonuclei positioning compare to centroid of myotubes (DMcM).

952 MSG diagrams were obtained through the normalization of lengths of all analyzed myotubes
953 (independently to their myonuclei content) to 100%. White lines represent myonuclei density
954 curves assessing the statistical frequency for myonuclei positioning along myotubes. Each color
955 group reflects statistical estimation of myonuclei clustering along myotubes.

956

957 **Quantification methods for EB1 Comets**

958 To determine EB1 comets speed, four continuous frame of a time-lapse movie of EB1-GFP
959 were overlapped, the first two are color-coded in green and the last two are color-coded in red.
960 Comets length was counted if green and red length were equal, traducing a comets growing in
961 the same focal plan.

962 **Quantification of mitochondria fragmentation**

963 In order to analyze mitochondria repartition, Cytochrome-C staining was used as representative
964 of the mitochondrial network in long differentiated myofibers. Representative images were
965 taken from myofibers and the analysis of images was done using ImageJ® software. One or
966 several Regions Of Interest (ROI) were selected per image, these regions were set just next-to
967 or close to myonuclei. Following a threshold determination, the whole information of each
968 stained particle (representing a single or a group of mitochondria) was extracted from ImageJ
969 software. The particles with circularity equivalent to 1 were eliminated in order to purify our
970 results from any unwanted background errors. Particles with feret less than 0.75µm (mean size
971 of mitochondria) were eliminated to purify our results. Finally, the ratio of number of particles
972 per area of ROI was calculated.

973

974 **Quantification of AChRs fragmentation**

975 Bungarotoxin staining was used to analyze formation of acetylcholine receptors clusters in
976 mature myofibers. Representative images were taken from myofibers of each condition as
977 described before and the analysis of images was done using ImageJ® software. Briefly, a
978 threshold of 8µm was set as the minimal size for AChRs clusters. Myofibers with at least one
979 cluster of 8µm or bigger were considered as positive.

980

981

982 **Statistical analysis**

983 The statistical analyses were performed using Student's t test or the Mann-Whitney test
984 according to samples amount and distribution

985 **References**

986

987 Alves-Silva, J., N. Sanchez-Soriano, R. Beaven, M. Klein, J. Parkin, T.H. Millard, H.J. Bellen, K.J.T.
988 Venken, C. Ballestrem, R.A. Kammerer, and A. Prokop. 2012. Spectraplakins promote microtubule-
989 mediated axonal growth by functioning as structural microtubule-associated proteins and EB1-
990 dependent +TIPs (tip interacting proteins). *J. Neurosci.* 32:9143–9158.
991 doi:10.1523/JNEUROSCI.0416-12.2012.

992 Basu, S., S. Sladeczek, H. Pemble, T. Wittmann, J.A. Slotman, W. van Cappellen, H.R. Brenner, and N.
993 Galjart. 2014. Acetylcholine Receptor (AChR) Clustering Is Regulated Both by Glycogen Synthase
994 Kinase 3β (GSK3β)-dependent Phosphorylation and the Level of CLIP-associated Protein 2
995 (CLASP2) Mediating the Capture of Microtubule Plus-ends. *J. Biol. Chem.* 289:30857–30867.
996 doi:10.1074/jbc.M114.589457.

997 Basu, S., S. Sladeczek, I. Martinez de la Peña y Valenzuela, M. Akaaboune, I. Smal, K. Martin, N. Galjart,

- 998 and H.R. Bremer. 2015. CLASP2-dependent microtubule capture at the neuromuscular junction
999 membrane requires LL5 β and actin for focal delivery of acetylcholine receptor vesicles. *Mol. Biol.*
1000 *Cell*. 26:938–951. doi:10.1091/mbc.E14-06-1158.
- 1001 Bernier, G., M. Pool, M. Kilcup, J. Alfoldi, Y. De Repentigny, and R. Kothary. 2000. Acf7 (MACF) is an
1002 actin and microtubule linker protein whose expression predominates in neural, muscle, and lung
1003 development. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of*
1004 *Anatomists*. 219:216–225. doi:10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::AID-DVDY1041>3.0.CO;2-
1005 O.
- 1006 Bitoun, M., S. Maugenre, P.-Y. Jeannet, E. Lacène, X. Ferrer, P. Laforêt, J.-J. Martin, J. Laporte, H.
1007 Lochmüller, A.H. Beggs, M. Fardeau, B. Eymard, N.B. Romero, and P. Guicheney. 2005. Mutations
1008 in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nature genetics*. 37:1207–1209.
1009 doi:10.1038/ng1657.
- 1010 Bonaldo, P., and M. Sandri. 2013. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease models*
1011 *& mechanisms*. 6:25–39. doi:10.1242/dmm.010389.
- 1012 Bottenberg, W., N. Sanchez-Soriano, J. Alves-Silva, I. Hahn, M. Mende, and A. Prokop. 2009. Context-
1013 specific requirements of functional domains of the Spectraplakins Short stop in vivo. *Mechanisms of*
1014 *development*. 126:489–502. doi:10.1016/j.mod.2009.04.004.
- 1015 Boyer, J.G., M.A. Bernstein, and C. Boudreau Larivière. 2010. Plakins in striated muscle. *Muscle Nerve*.
1016 41:299–308. doi:10.1002/mus.21472.
- 1017 Brooks, N.E., M.D. Schuenke, and R.S. Hikida. 2009. Ageing influences myonuclear domain size
1018 differently in fast and slow skeletal muscle of rats. *Acta Physiol (Oxf)*. 197:55–63.
1019 doi:10.1111/j.1748-1716.2009.01983.x.
- 1020 Bruusgaard, J.C., K. Liestøl, and K. Gundersen. 2006. Distribution of myonuclei and microtubules in live
1021 muscle fibers of young, middle-aged, and old mice. *Journal of Applied Physiology*. 100:2024–2030.
1022 doi:10.1152/jappphysiol.00913.2005.
- 1023 Bulinski, J.C., and G.G. Gundersen. 1991. Stabilization of post-translational modification of microtubules
1024 during cellular morphogenesis. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and*
1025 *developmental biology*. 13:285–293. doi:10.1002/bies.950130605.
- 1026 Cadot, B., V. Gache, and E.R. Gomes. 2014. Fast, multi-dimensional and simultaneous kymograph-like
1027 particle dynamics (SkyPad) analysis. *PLoS ONE*. 9:e89073. doi:10.1371/journal.pone.0089073.
- 1028 Cadot, B., V. Gache, E. Vasyutina, S. Falcone, C. Birchmeier, and E.R. Gomes. 2012. Nuclear movement
1029 during myotube formation is microtubule and dynein dependent and is regulated by Cdc42, Par6 and
1030 Par3. *EMBO Rep*. 13:741–749. doi:10.1038/embor.2012.89.
- 1031 Casey, L.M., H.D. Lyon, and J.B. Olmsted. 2003. Muscle-specific microtubule-associated protein 4 is
1032 expressed early in myogenesis and is not sufficient to induce microtubule reorganization. *Cell Motil.*
1033 *Cytoskeleton*. 54:317–336. doi:10.1002/cm.10105.
- 1034 Chang, W., S. Antoku, C. Östlund, H.J. Worman, and G.G. Gundersen. 2015. Linker of nucleoskeleton
1035 and cytoskeleton (LINC) complex-mediated actin-dependent nuclear positioning orients centrosomes
1036 in migrating myoblasts. *Nucleus*. 6:77–88. doi:10.1080/19491034.2015.1004947.
- 1037 Cho, S., J. Irianto, and D.E. Discher. 2017. Mechanosensing by the nucleus: From pathways to scaling
1038 relationships. *J. Cell Biol*. 216:305–315. doi:10.1083/jcb.201610042.
- 1039 Chojnowski, A., P.F. Ong, and O. Dreesen. 2015. Nuclear lamina remodelling and its implications for
1040 human disease. *Cell Tissue Res*. 360:621–631. doi:10.1007/s00441-014-2069-4.
- 1041 Collins, M.A., T.R. Mandigo, J.M. Camuglia, G.A. Vazquez, A.J. Anderson, C.H. Hudson, J.L. Hanron,
1042 and E.S. Folker. 2017. Emery-Dreifuss muscular dystrophy-linked genes and centronuclear

- 1043 myopathy-linked genes regulate myonuclear movement by distinct mechanisms. *Mol. Biol. Cell.*
1044 28:2303–2317. doi:10.1091/mbc.E16-10-0721.
- 1045 Drabek, K., M. van Ham, T. Stepanova, K. Draegestein, R. van Horsen, C.L. Sayas, A. Akhmanova, T.
1046 Ten Hagen, R. Smits, R. Fodde, F. Grosveld, and N. Galjart. 2006. Role of CLASP2 in microtubule
1047 stabilization and the regulation of persistent motility. *Current biology: CB.* 16:2259–2264.
1048 doi:10.1016/j.cub.2006.09.065.
- 1049 Edström, E., M. Altun, E. Bergman, H. Johnson, S. Kullberg, V. Ramirez-León, and B. Ulfhake. 2007.
1050 Factors contributing to neuromuscular impairment and sarcopenia during aging. *Physiol. Behav.*
1051 92:129–135. doi:10.1016/j.physbeh.2007.05.040.
- 1052 Escobar-Aguirre, M., H. Zhang, A. Jamieson-Lucy, and M.C. Mullins. 2017. Microtubule-actin
1053 crosslinking factor 1 (Macf1) domain function in Balbiani body dissociation and nuclear positioning.
1054 *PLoS genetics.* 13:e1006983. doi:10.1371/journal.pgen.1006983.
- 1055 Falcone, S., W. Roman, K. Hnia, V. Gache, N. Didier, J. Laine, F. Aurade, I. Marty, I. Nishino, N.
1056 Charlet-Berguerand, N.B. Romero, G. Marazzi, D. Sassoon, J. Laporte, and E.R. Gomes. 2014. N-
1057 WASP is required for Amphiphysin-2/BIN1-dependent nuclear positioning and triad organization in
1058 skeletal muscle and is involved in the pathophysiology of centronuclear myopathy. *EMBO Mol Med.*
1059 6:1455–1475. doi:10.15252/emmm.201404436.
- 1060 Gache, V., E.R. Gomes, and B. Cadot. 2017. Microtubule motors involved in nuclear movement during
1061 skeletal muscle differentiation. *Mol. Biol. Cell.* mbc.E16–06–0405. doi:10.1091/mbc.E16-06-0405.
- 1062 Gache, V., M. Louwagie, J. Garin, N. Caudron, L. Lafanechere, and O. Valiron. 2005. Identification of
1063 proteins binding the native tubulin dimer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327:35–42.
1064 doi:10.1016/j.bbrc.2004.11.138.
- 1065 Gache, V., P. Waridel, C. Winter, A. Juhem, M. Schroeder, A. Shevchenko, and A.V. Popov. 2010.
1066 Xenopus meiotic microtubule-associated interactome. *PLoS ONE.* 5:e9248.
1067 doi:10.1371/journal.pone.0009248.
- 1068 Geevasinga, N., P. Menon, P.H. Özdinler, M.C. Kiernan, and S. Vucic. 2016. Pathophysiological and
1069 diagnostic implications of cortical dysfunction in ALS. *Nat Rev Neurol.*
1070 doi:10.1038/nrneurol.2016.140.
- 1071 Gimpel, P., Y.L. Lee, R.M. Sobota, A. Calvi, V. Koullourou, R. Patel, K. Mamchaoui, F. Nedelec, S.
1072 Shackleton, J. Schmoranz, B. Burke, B. Cadot, and E.R. Gomes. 2017. Nesprin-1 α -Dependent
1073 Microtubule Nucleation from the Nuclear Envelope via Akap450 Is Necessary for Nuclear
1074 Positioning in Muscle Cells. *Current biology: CB.* doi:10.1016/j.cub.2017.08.031.
- 1075 Gong, T.W., C.G. Besirli, and M.I. Lomax. 2001. MACF1 gene structure: a hybrid of plectin and
1076 dystrophin. *Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society.*
1077 12:852–861.
- 1078 Goryunov, D., and R.K.H. Liem. 2016. Microtubule-Actin Cross-Linking Factor 1. *In* Intermediate
1079 Filament Associated Proteins. Elsevier. 331–353.
- 1080 Goryunov, D., C.-Z. He, C.-S. Lin, C.L. Leung, and R.K.H. Liem. 2010. Nervous-tissue-specific
1081 elimination of microtubule-actin crosslinking factor 1a results in multiple developmental defects in
1082 the mouse brain. *Molecular and Cellular Neuroscience.* 44:1–14. doi:10.1016/j.mcn.2010.01.010.
- 1083 Guerrero, K., C. Monge, A. Brückner, Ü. Puurand, L. Kadaja, T. Kaambre, E. Seppet, and V. Saks. 2009.
1084 Study of possible interactions of tubulin, microtubular network, and STOP protein with
1085 mitochondria in muscle cells. *Mol Cell Biochem.* 337:239–249. doi:10.1007/s11010-009-0304-1.
- 1086 Guzun, R., M. Karu-Varikmaa, M. Gonzalez-Granillo, A.V. Kuznetsov, L. Michel, C. Cottet-Rousselle,
1087 M. Saaremäe, T. Kaambre, M. Metsis, M. Grimm, C. Auffray, and V. Saks. 2011. Mitochondria-
1088 cytoskeleton interaction: distribution of β -tubulins in cardiomyocytes and HL-1 cells. *Biochimica et*

- 1089 *biophysica acta*. 1807:458–469. doi:10.1016/j.bbabi.2011.01.010.
- 1090 iqbal, S., and D.A. Hood. 2014. Cytoskeletal Regulation of Mitochondrial Movements in Myoblasts.
1091 *Cytoskeleton*. 1–9. doi:10.1002/cm.21188).
- 1092 Jacquemond, V. 1997. Indo-1 fluorescence signals elicited by membrane depolarization in enzymatically
1093 isolated mouse skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* 73:920–928. doi:10.1016/S0006-3495(97)78124-
1094 4.
- 1095 Janin, A., and V. Gache. 2018. Nesprins and Lamins in Health and Diseases of Cardiac and Skeletal
1096 Muscles. *Front Physiol.* 9:1277. doi:10.3389/fphys.2018.01277.
- 1097 Jungbluth, H., and M. Gautel. 2014. Pathogenic mechanisms in centronuclear myopathies. *Front Aging*
1098 *Neurosci.* 6:339. doi:10.3389/fnagi.2014.00339.
- 1099 Jørgensen, L.H., M.-B. Mosbech, N.J. Færgeman, J. Graakjaer, S.V. Jacobsen, and H.D. Schrøder. 2014.
1100 Duplication in the Microtubule-Actin Cross-linking Factor 1 gene causes a novel neuromuscular
1101 condition. *Scientific Reports.* 4:65–7. doi:10.1038/srep05180.
- 1102 Ka, M., and W.-Y. Kim. 2016. Microtubule-Actin Crosslinking Factor 1 Is Required for Dendritic
1103 Arborization and Axon Outgrowth in the Developing Brain. *Molecular Neurobiology.* 53:6018–
1104 6032. doi:10.1007/s12035-015-9508-4.
- 1105 Ka, M., E.-M. Jung, U. Mueller, and W.-Y. Kim. 2014. MACF1 regulates the migration of pyramidal
1106 neurons via microtubule dynamics and GSK-3 signaling. *Dev. Biol.* 395:4–18.
1107 doi:10.1016/j.ydbio.2014.09.009.
- 1108 Kim, H.-S., R. Murakami, S. Quintin, M. Mori, K. Ohkura, K.K. Tamai, M. Labouesse, H. Sakamoto, and
1109 K. Nishiwaki. 2011. VAB-10 spectraplakins act in cell and nuclear migration in *Caenorhabditis*
1110 *elegans*. *Development.* 138:4013–4023. doi:10.1242/dev.059568.
- 1111 Kirby, T.J., and J. Lammerding. 2018. Emerging views of the nucleus as a cellular mechanosensor. *Nat.*
1112 *Cell Biol.* 1. doi:10.1038/s41556-018-0038-y.
- 1113 Kodama, A., I. Karakasisoglou, E. Wong, A. Vaezi, and E. Fuchs. 2003. ACF7: an essential integrator of
1114 microtubule dynamics. *Cell.* 115:343–354.
- 1115 Kraus, F., and M.T. Ryan. 2017. The constriction and scission machineries involved in mitochondrial
1116 fission. *J. Cell. Sci.* 130:2953–2960. doi:10.1242/jcs.199562.
- 1117 Kumazawa, A., H. Katoh, D. Nonaka, T. Watanabe, M. Saotome, T. Urushida, H. Satoh, and H. Hayashi.
1118 2014. Microtubule Disorganization Affects the Mitochondrial Permeability Transition Pore in
1119 Cardiac Myocytes. *Circ J.* 78:1206–1215. doi:10.1253/circj.CJ-13-1298.
- 1120 Kutchukian, C., P. Szentesi, B. Allard, D. Trochet, M. Beuvin, C. Berthier, Y. Tourneur, P. Guicheney, L.
1121 Csernoch, M. Bitoun, and V. Jacquemond. 2017. Impaired excitation-contraction coupling in muscle
1122 fibres from the dynamin2R465W mouse model of centronuclear myopathy. *The Journal of*
1123 *Physiology.* 595:7369–7382. doi:10.1113/JP274990.
- 1124 Laporte, J., L.J. Hu, C. Kretz, J.L. Mandel, P. Kioschis, J.F. Coy, S.M. Klauk, A. Poustka, and N. Dahl.
1125 1996. A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine
1126 phosphatase family conserved in yeast. *Nature genetics.* 13:175–182. doi:10.1038/ng0696-175.
- 1127 Lee, S., and P.A. Kolodziej. 2002. Short Stop provides an essential link between F-actin and microtubules
1128 during axon extension. *Development.* 129:1195–1204.
- 1129 Lee, Y.L., and B. Burke. 2017. LINC complexes and nuclear positioning. *Seminars in Cell and*
1130 *Developmental Biology.* doi:10.1016/j.semcdb.2017.11.008.
- 1131 Lefebvre, R., S. Pouvreau, C. Collet, B. Allard, and V. Jacquemond. 2014. Whole-cell voltage clamp on

- 1132 skeletal muscle fibers with the silicone-clamp technique. *Methods Mol. Biol.* 1183:159–170.
1133 doi:10.1007/978-1-4939-1096-0_9.
- 1134 Levy, Y., J.A. Ross, M. Niglas, V.A. Snetkov, S. Lynham, C.-Y. Liao, M.J. Puckelwartz, Y.-M. Hsu,
1135 E.M. McNally, M. Alsheimer, S.D. Harridge, S.G. Young, L.G. Fong, Y. Español, C. Lopez-Otin,
1136 B.K. Kennedy, D.A. Lowe, and J. Ochala. 2018. Prelamin A causes aberrant myonuclear
1137 arrangement and results in muscle fiber weakness. *JCI Insight*. 3. doi:10.1172/jci.insight.120920.
- 1138 Lin, W., B. Dominguez, J. Yang, P. Aryal, E.P. Brandon, F.H. Gage, and K.-F. Lee. 2005.
1139 Neurotransmitter acetylcholine negatively regulates neuromuscular synapse formation by a Cdk5-
1140 dependent mechanism. *Neuron*. 46:569–579. doi:10.1016/j.neuron.2005.04.002.
- 1141 Malatesta, M., F. Perdoni, S. Muller, C. Zancanaro, and C. Pellicciari. 2009. Nuclei of aged myofibres
1142 undergo structural and functional changes suggesting impairment in RNA processing. *Eur J*
1143 *Histochem.* 53:97–106.
- 1144 Manhart, A., S. Windner, M. Baylies, and A. Mogilner. 2018. Mechanical positioning of multiple nuclei
1145 in muscle cells. *PLoS Comput. Biol.* 14:e1006208. doi:10.1371/journal.pcbi.1006208.
- 1146 Mattioli, E., M. Columbaro, C. Capanni, N.M. Maraldi, V. Cenni, K. Scotlandi, M.T. Marino, L. Merlini,
1147 S. Squarzone, and G. Lattanzi. 2011. Prelamin A-mediated recruitment of SUN1 to the nuclear
1148 envelope directs nuclear positioning in human muscle. *Cell death and differentiation*. 18:1305–1315.
1149 doi:10.1038/cdd.2010.183.
- 1150 Metzger, T., V. Gache, M. Xu, B. Cadot, E.S. Folker, B.E. Richardson, E.R. Gomes, and M.K. Baylies.
1151 2012. MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal muscle function.
1152 *Nature*. 484:120–124. doi:10.1038/nature10914.
- 1153 Méjat, A., V. Decostre, J. Li, L. Renou, A. Kesari, D. Hantai, C.L. Stewart, X. Xiao, E. Hoffman, G.
1154 Bonne, and T. Misteli. 2009. Lamin A/C-mediated neuromuscular junction defects in Emery-
1155 Dreifuss muscular dystrophy. *J. Cell Biol.* 184:31–44. doi:10.1083/jcb.200811035.
- 1156 Mimiou, P., D. Tiziano, T. Frugier, N. Roblot, M. Le Meur, and J. Melki. 1999. Gene targeting restricted
1157 to mouse striated muscle lineage. *Nucleic Acids Res.* 27:e27.
- 1158 Mogessie, B., D. Roth, Z. Rahil, and A. Straube. 2015. A novel isoform of MAP4 organises the paraxial
1159 microtubule array required for muscle cell differentiation. *Elife*. 4:e05697. doi:10.7554/eLife.05697.
- 1160 Muhammad, E., O. Reish, Y. Ohno, T. Scheetz, A. Deluca, C. Searby, M. Regev, L. Benyamini, Y.
1161 Fellig, A. Kihara, V.C. Sheffield, and R. Parvari. 2013. Congenital myopathy is caused by mutation
1162 of HACD1. *Hum. Mol. Genet.* 22:5229–5236. doi:10.1093/hmg/ddt380.
- 1163 Muller, A.J., J.F. Baker, J.B. DuHadaway, K. Ge, G. Farmer, P.S. Donover, R. Meade, C. Reid, R.
1164 Grzanna, A.H. Roach, N. Shah, A.P. Soler, and G.C. Prendergast. 2003. Targeted disruption of the
1165 murine Bin1/Amphiphysin II gene does not disable endocytosis but results in embryonic
1166 cardiomyopathy with aberrant myofibril formation. *Molecular and cellular biology*. 23:4295–4306.
- 1167 NACHLAS, M.M., K.C. TSOU, E. DE SOUZA, C.S. CHENG, and A.M. SELIGMAN. 1957.
1168 Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl
1169 substituted ditetrazole. *J Histochem Cytochem.* 5:420–436. doi:10.1177/5.4.420.
- 1170 Nieuwenhuis, J., and T.R. Brummelkamp. 2019. The Tubulin Detyrosination Cycle: Function and
1171 Enzymes. *Trends in Cell Biology*. 29:80–92. doi:10.1016/j.tcb.2018.08.003.
- 1172 Noordstra, I., Q. Liu, W. Nijenhuis, S. Hua, K. Jiang, M. Baars, S. Rimmelzwaal, M. Martin, L.C.
1173 Kapitein, and A. Akhmanova. 2016. Control of apico-basal epithelial polarity by the microtubule
1174 minus-end-binding protein CAMSAP3 and spectraplakins ACF7. *J. Cell. Sci.* 129:4278–4288.
1175 doi:10.1242/jcs.194878.
- 1176 Norton, H.K., and J.E. Phillips-Cremins. 2017. Crossed wires: 3D genome misfolding in human disease.

- 1177 *J. Cell Biol.* 216:3441–3452. doi:10.1083/jcb.201611001.
- 1178 Perillo, M., and E.S. Folker. 2018. Specialized Positioning of Myonuclei Near Cell-Cell Junctions. *Front*
1179 *Physiol.* 9:1531. doi:10.3389/fphys.2018.01531.
- 1180 Pimentel, M.R., S. Falcone, B. Cadot, and E.R. Gomes. 2017. In Vitro Differentiation of Mature
1181 Myofibers for Live Imaging. *Journal of visualized experiments: JoVE.* e55141–e55141.
1182 doi:10.3791/55141.
- 1183 Puckelwartz, M.J., E. Kessler, Y. Zhang, D. Hodzic, K.N. Randles, G. Morris, J.U. Earley, M. Hadhazy,
1184 J.M. Holaska, S.K. Mewborn, P. Pytel, and E.M. McNally. 2009. Disruption of nesprin-1 produces
1185 an Emery Dreifuss muscular dystrophy-like phenotype in mice. *Hum. Mol. Genet.* 18:607–620.
1186 doi:10.1093/hmg/ddn386.
- 1187 Ralston, E., T. Ploug, J. Kalhovde, and T. Lomo. 2001. Golgi complex, endoplasmic reticulum exit sites,
1188 and microtubules in skeletal muscle fibers are organized by patterned activity. *J. Neurosci.* 21:875–
1189 883.
- 1190 Ramdas, N.M., and G.V. Shivashankar. 2015. Cytoskeletal control of nuclear morphology and chromatin
1191 organization. *Journal of molecular biology.* 427:695–706. doi:10.1016/j.jmb.2014.09.008.
- 1192 Ravel-Chapuis, A., M. Vandromme, J.-L. Thomas, and L. Schaeffer. 2007. Postsynaptic chromatin is
1193 under neural control at the neuromuscular junction. *EMBO J.* 26:1117–1128.
1194 doi:10.1038/sj.emboj.7601572.
- 1195 Razafsky, D., and D. Hodzic. 2015. Nuclear envelope: positioning nuclei and organizing synapses.
1196 *Current opinion in cell biology.* 34:84–93. doi:10.1016/j.ceb.2015.06.001.
- 1197 Rivero, S., J. Cardenas, M. Bornens, and R.M. Rios. 2009. Microtubule nucleation at the cis-side of the
1198 Golgi apparatus requires AKAP450 and GM130. 1–13. doi:10.1038/emboj.2009.47.
- 1199 Robson, M.I., J.I. de Las Heras, R. Czapiewski, P. Lê Thành, D.G. Booth, D.A. Kelly, S. Webb, A.R.W.
1200 Kerr, and E.C. Schirmer. 2016. Tissue-Specific Gene Repositioning by Muscle Nuclear Membrane
1201 Proteins Enhances Repression of Critical Developmental Genes during Myogenesis. *Mol. Cell.*
1202 62:834–847. doi:10.1016/j.molcel.2016.04.035.
- 1203 Roman, W., and E.R. Gomes. 2017. Nuclear positioning in skeletal muscle. *Seminars in Cell and*
1204 *Developmental Biology.* doi:10.1016/j.semcdb.2017.11.005.
- 1205 Roman, W., J.P. Martins, F.A. Carvalho, R. Voituriez, J.V.G. Abella, N.C. Santos, B. Cadot, M. Way,
1206 and E.R. Gomes. 2017. Myofibril contraction and crosslinking drive nuclear movement to the
1207 periphery of skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* 152:1376–33. doi:10.1038/ncb3605.
- 1208 Ryan, S.D., K. Bhanot, A. Ferrier, Y. De Repentigny, A. Chu, A. Blais, and R. Kothary. 2012.
1209 Microtubule stability, Golgi organization, and transport flux require dystonin-a2-MAP1B
1210 interaction. *J. Cell Biol.* 196:727–742. doi:10.1083/jcb.201107096.
- 1211 Sanchez-Soriano, N., M. Travis, F. Dajas-Bailador, C. Gonçalves-Pimentel, A.J. Whitmarsh, and A.
1212 Prokop. 2009. Mouse ACF7 and drosophila short stop modulate filopodia formation and microtubule
1213 organisation during neuronal growth. *J. Cell. Sci.* 122:2534–2542. doi:10.1242/jcs.046268.
- 1214 Schmidt, N., S. Basu, S. Sladecsek, S. Gatti, J. van Haren, S. Treves, J. Pielage, N. Galjart, and H.R.
1215 Brenner. 2012. Agrin regulates CLASP2-mediated capture of microtubules at the neuromuscular
1216 junction synaptic membrane. *J. Cell Biol.* 198:421–437. doi:10.1083/jcb.201111130.
- 1217 Shi, P., Y. Wang, Y. Huang, C. Zhang, Y. Li, Y. Liu, T. Li, W. Wang, X. Liang, and C. Wu. 2019.
1218 Arp2/3-branched actin regulates microtubule acetylation levels and affects mitochondrial
1219 distribution. *J. Cell. Sci.* 132:jcs226506–10. doi:10.1242/jcs.226506.
- 1220 Starr, D.A. 2017. Muscle Development: Nucleating Microtubules at the Nuclear Envelope. *Current*

- 1221 *biology: CB*. 27:R1071–R1073. doi:10.1016/j.cub.2017.08.030.
- 1222 Sun, Y., J. Zhang, S.K. Kraeft, D. Auclair, M.S. Chang, Y. Liu, R. Sutherland, R. Salgia, J.D. Griffin,
1223 L.H. Ferland, and L.B. Chen. 1999. Molecular cloning and characterization of human trabeculin-
1224 alpha, a giant protein defining a new family of actin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 274:33522–
1225 33530.
- 1226 Tanabe, K., and K. Takei. 2009. Dynamic instability of microtubules requires dynamin 2 and is impaired
1227 in a Charcot-Marie-Tooth mutant. *J. Cell Biol.* 185:939–948. doi:10.1083/jcb.200803153.
- 1228 Vilmont, V., B. Cadot, E. Vezin, F. Le Grand, and E.R. Gomes. 2016. Dynein disruption perturbs post-
1229 synaptic components and contributes to impaired MuSK clustering at the NMJ: implication in ALS.
1230 *Scientific Reports*. 6:27804. doi:10.1038/srep27804.
- 1231 Wang, S., A. Reuveny, and T. Volk. 2015. Nesprin provides elastic properties to muscle nuclei by
1232 cooperating with spectraplakins and EB1. *J. Cell Biol.* 209:529–538. doi:10.1083/jcb.201408098.
- 1233 Wang, Z., J. Cui, W.M. Wong, X. Li, W. Xue, R. Lin, J. Wang, P. Wang, J.A. Tanner, K.S.E. Cheah, W.
1234 Wu, and J.D. Huang. 2013. Kif5b controls the localization of myofibril components for their
1235 assembly and linkage to the myotendinous junctions. *Development*. 140:617–626.
1236 doi:10.1242/dev.085969.
- 1237 Wilson, M.H., and E.L.F. Holzbaur. 2014. Nesprins anchor kinesin-1 motors to the nucleus to drive
1238 nuclear distribution in muscle cells. *Development*. 142:218–228. doi:10.1242/dev.114769.
- 1239 Wilson, M.H., and E.L.F. Holzbaur. 2015. Nesprins anchor kinesin-1 motors to the nucleus to drive
1240 nuclear distribution in muscle cells. *J. Cell. Sci.* 128:e1–e1. doi:10.1242/jcs.167718.
- 1241 Zaoui, K., K. Benseddik, P. Daou, D. Salaün, and A. Badache. 2010. ErbB2 receptor controls microtubule
1242 capture by recruiting ACF7 to the plasma membrane of migrating cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
1243 107:18517–18522. doi:10.1073/pnas.1000975107.
- 1244

Figure 1

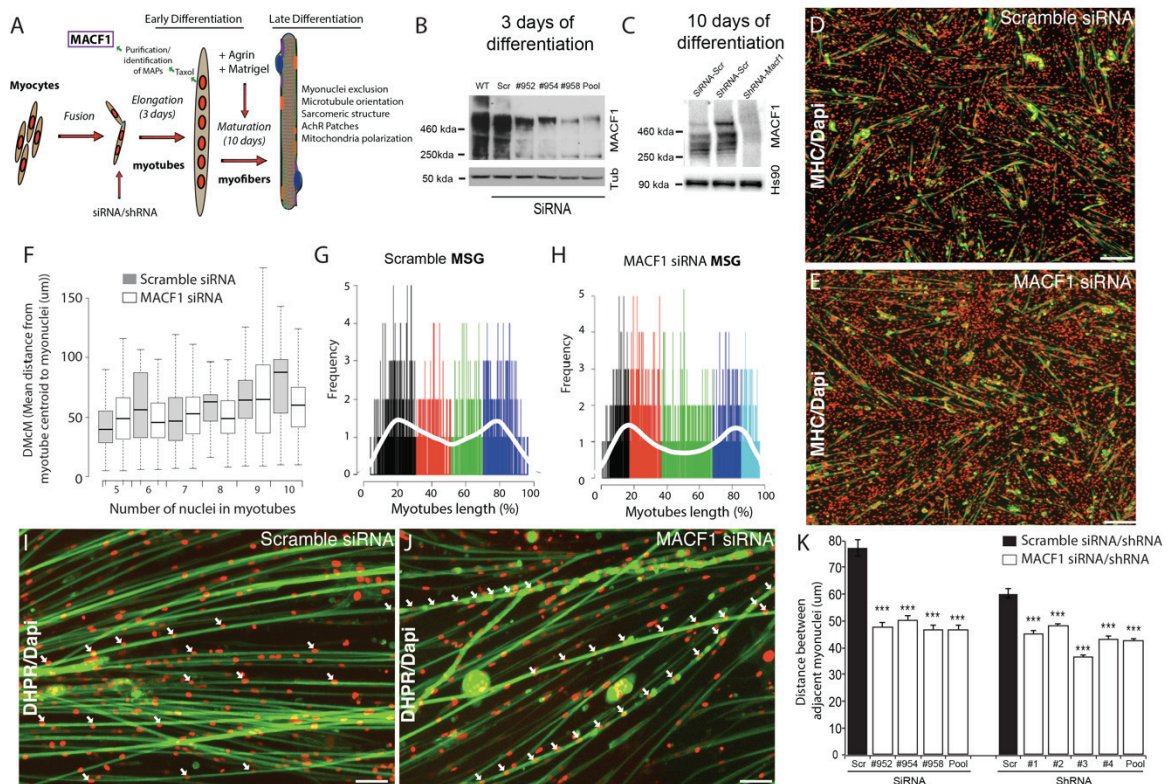


Figure 2

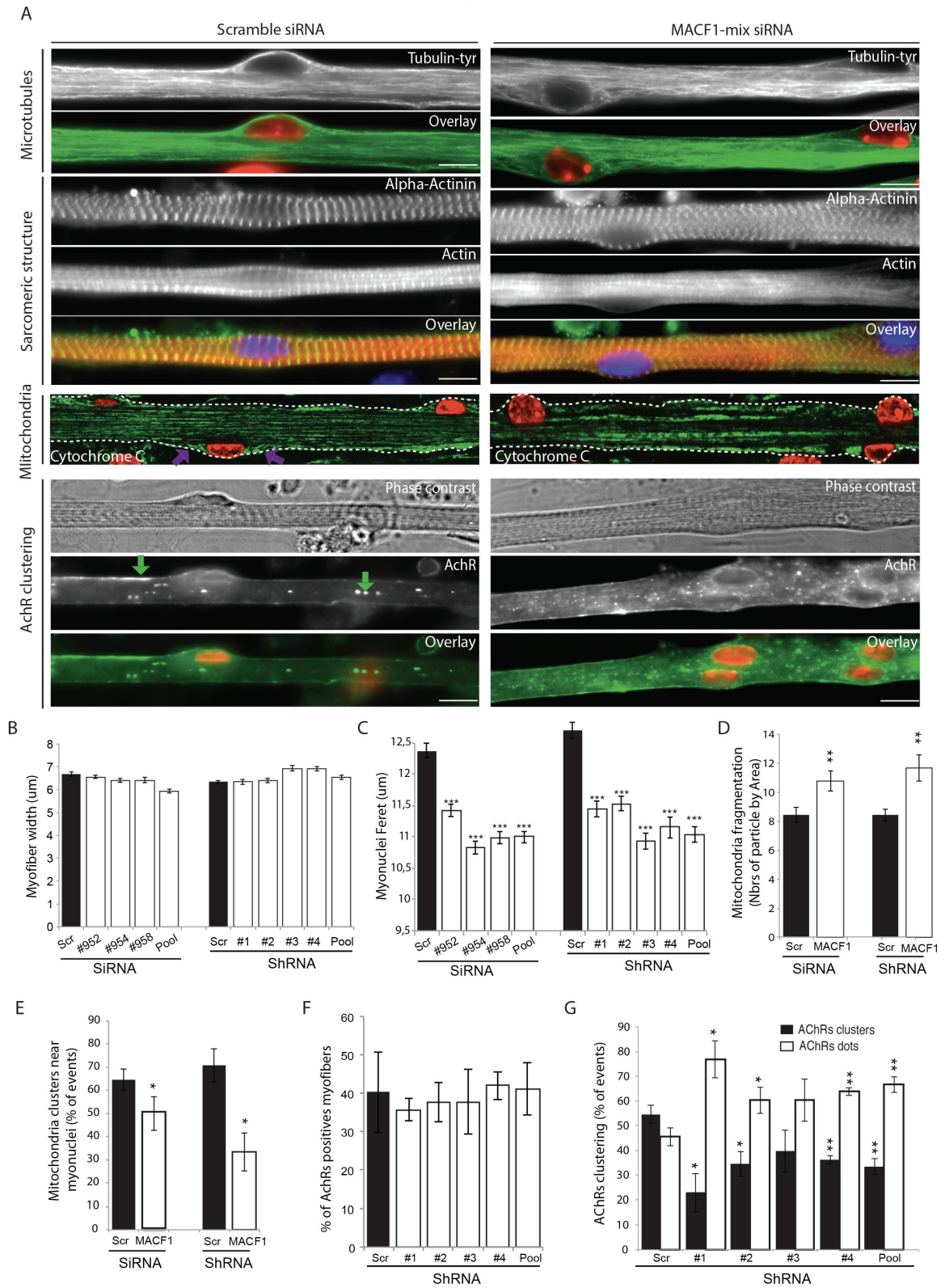


Figure 3

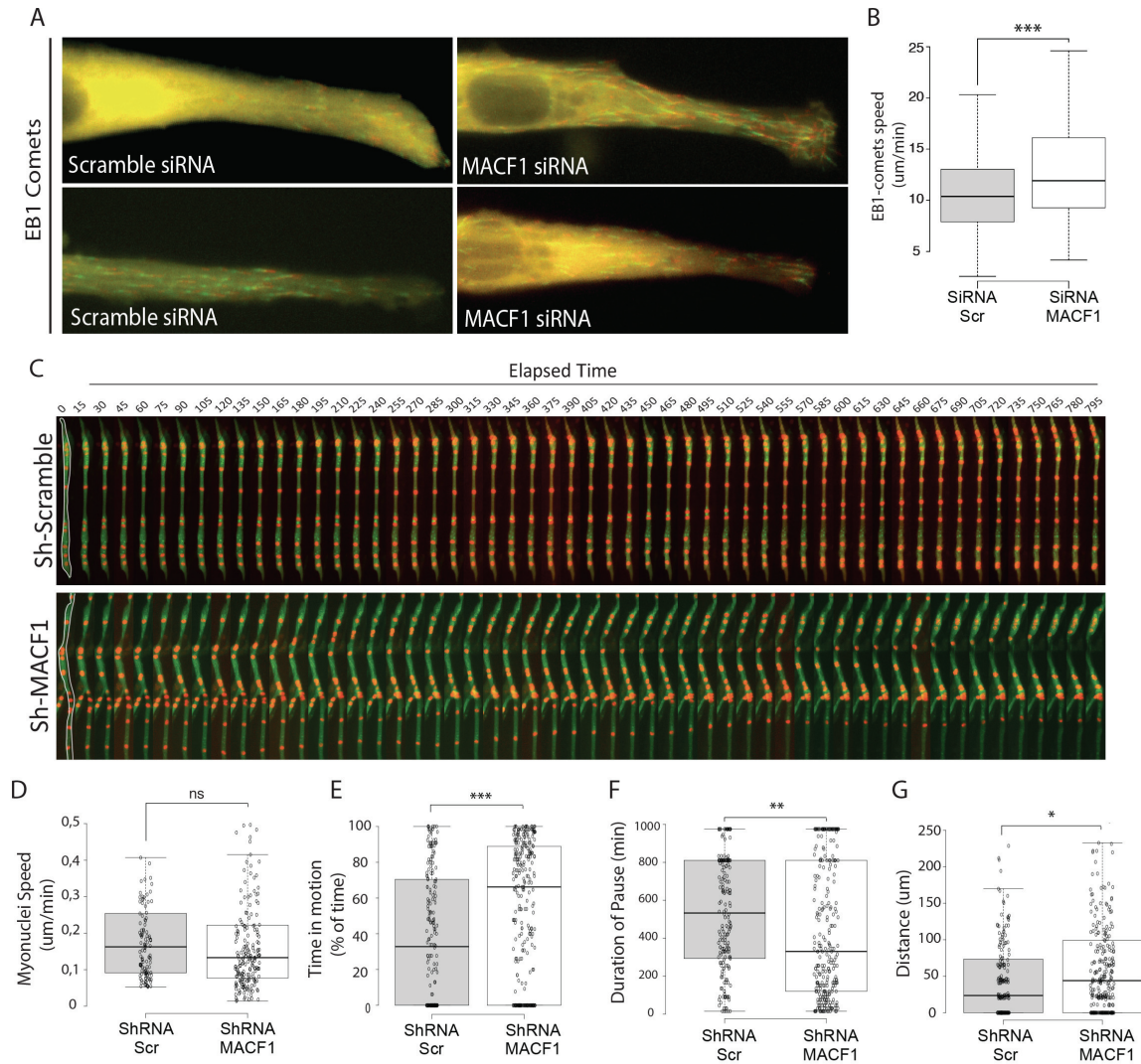


Figure 4

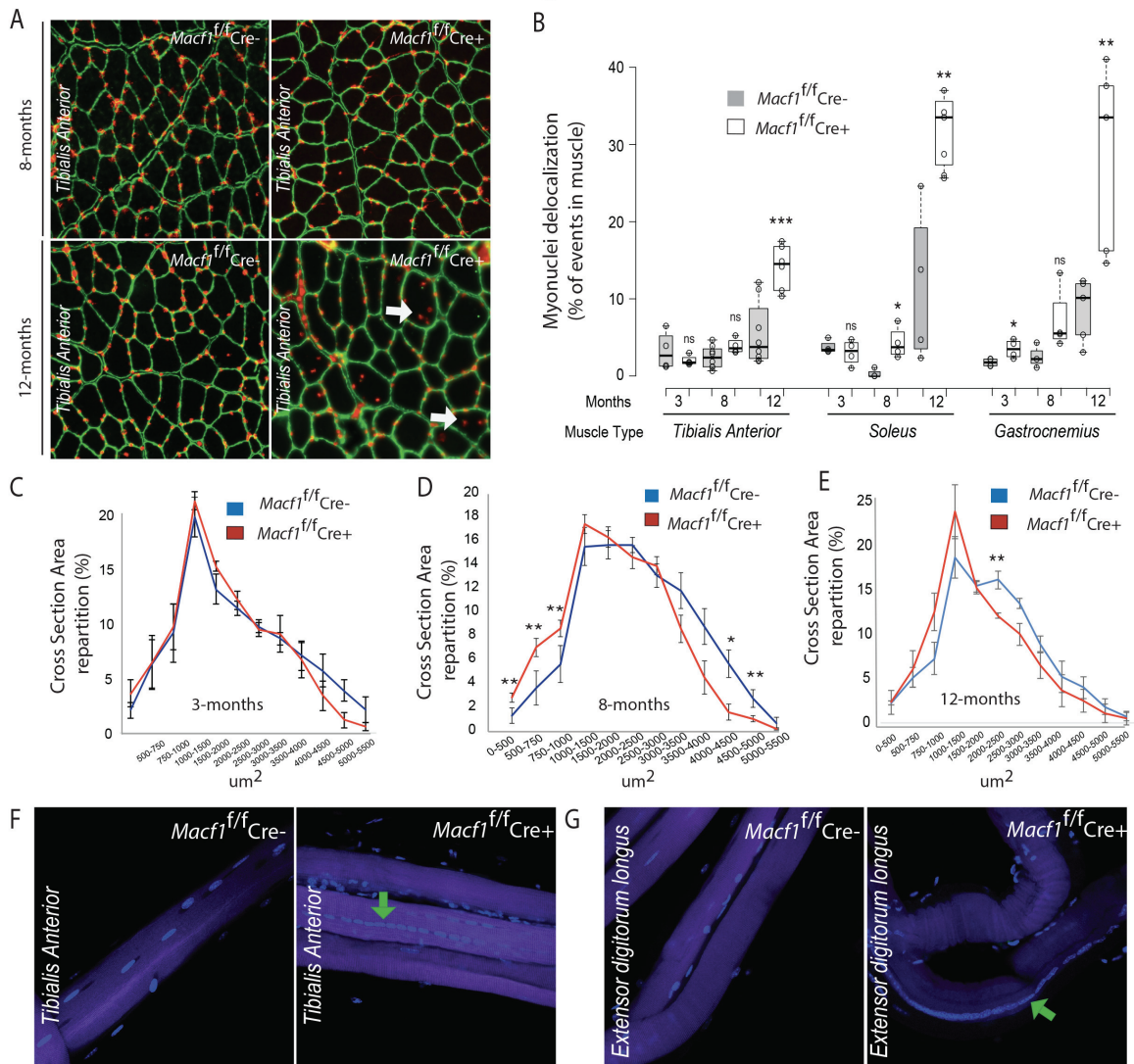


Figure 5

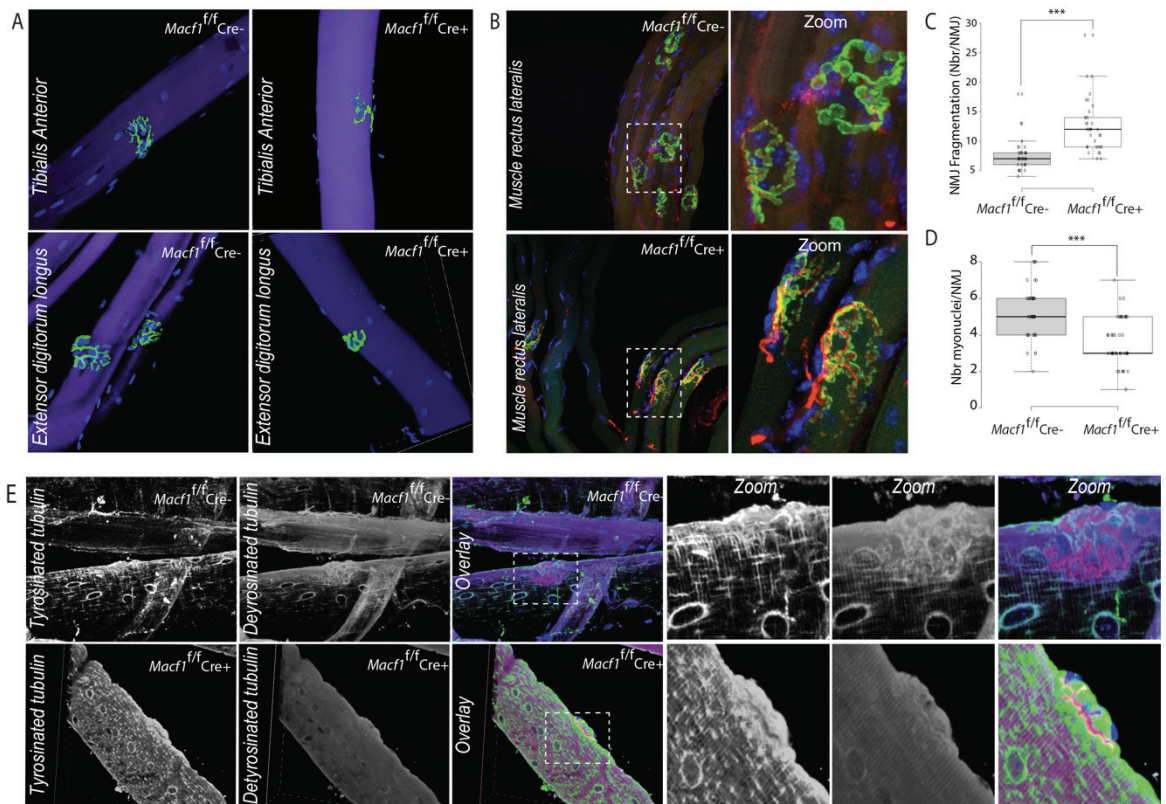


Figure 6

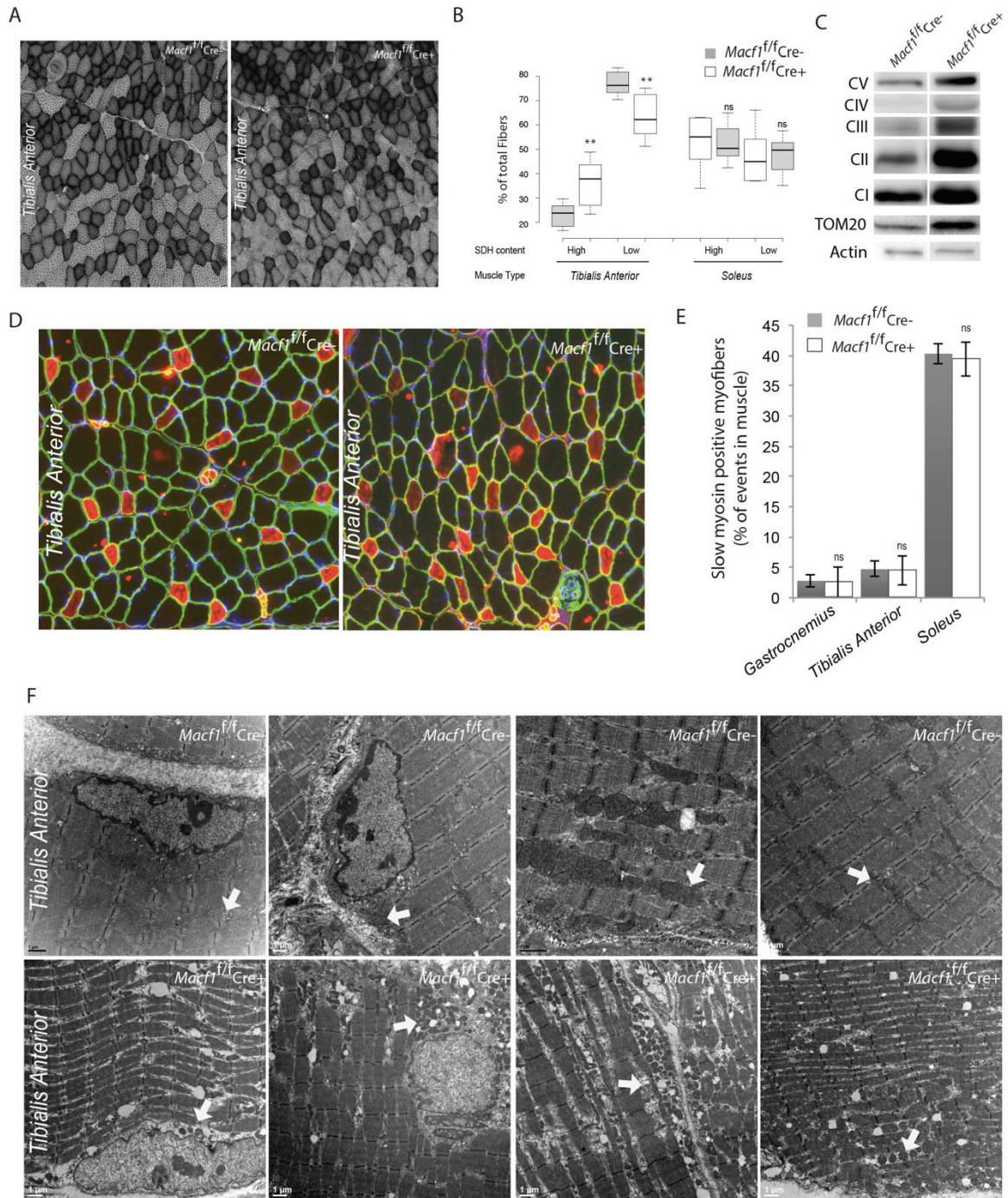
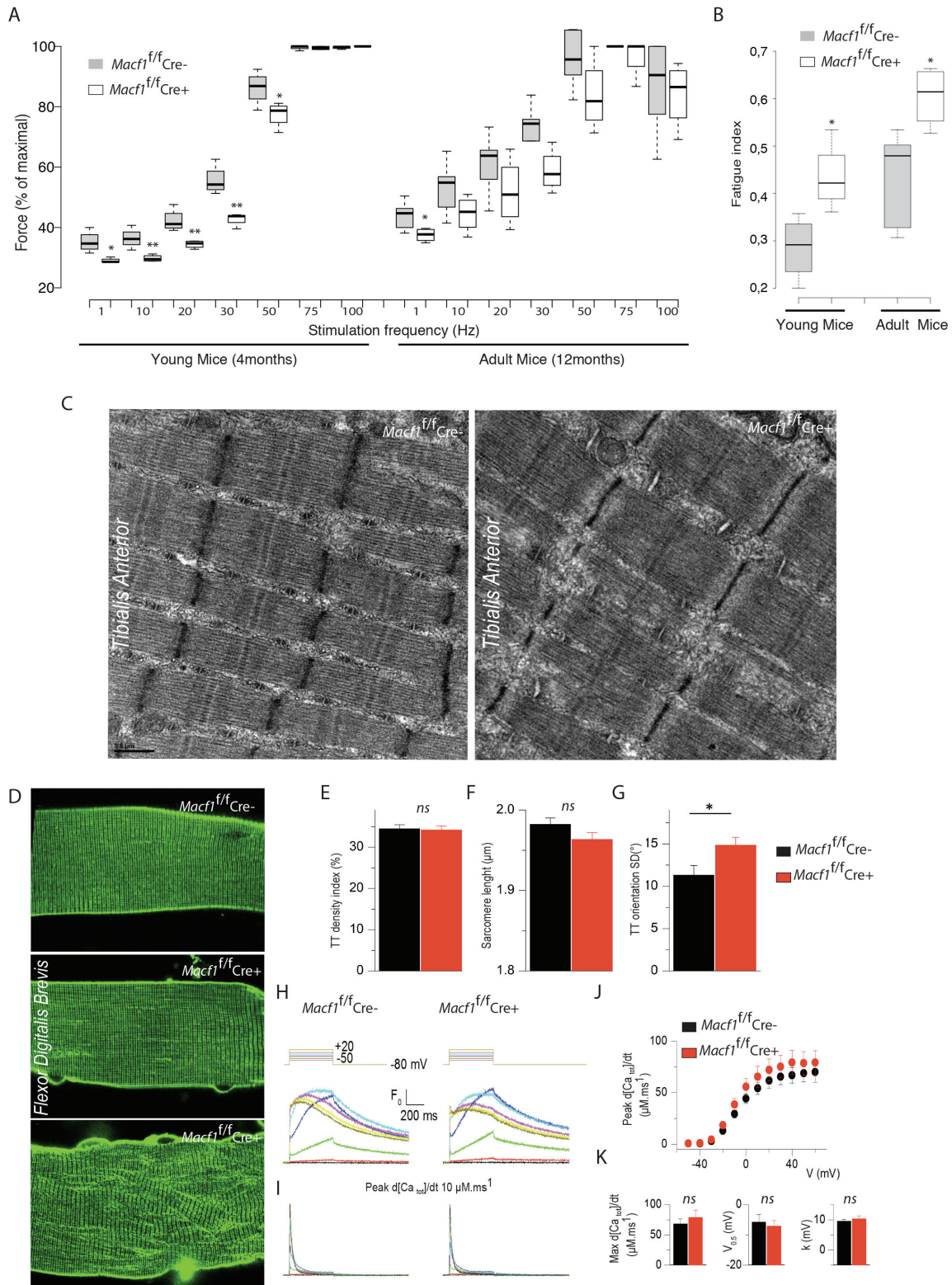
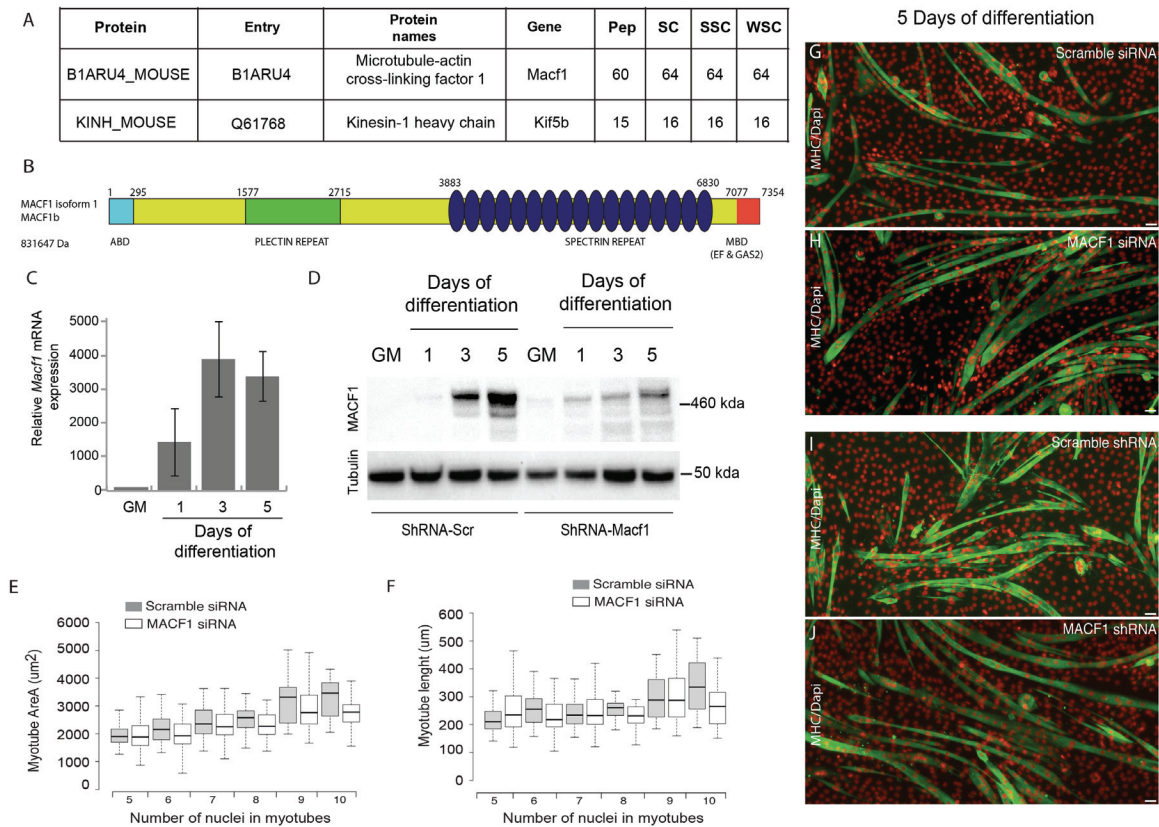


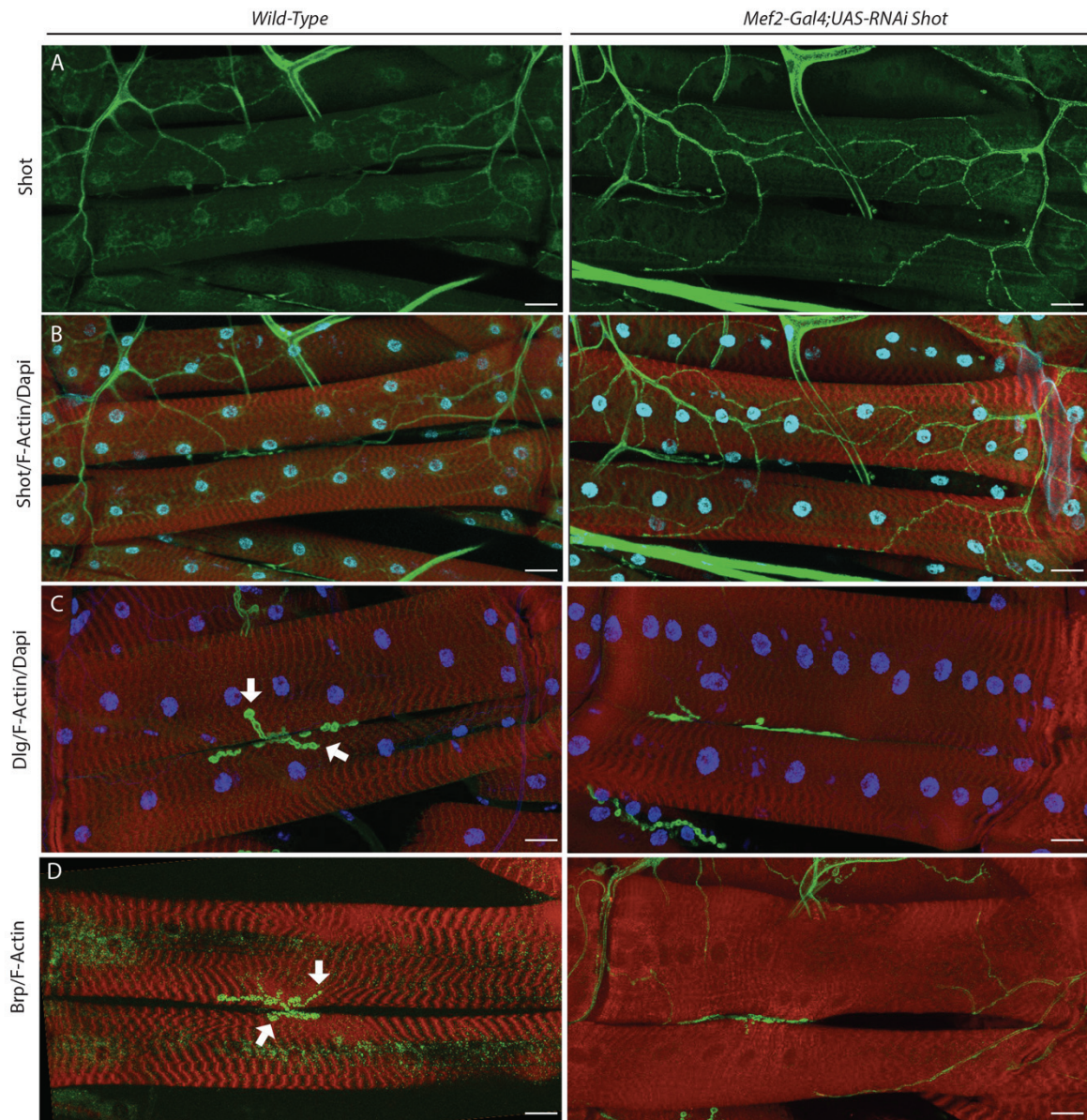
Figure 7



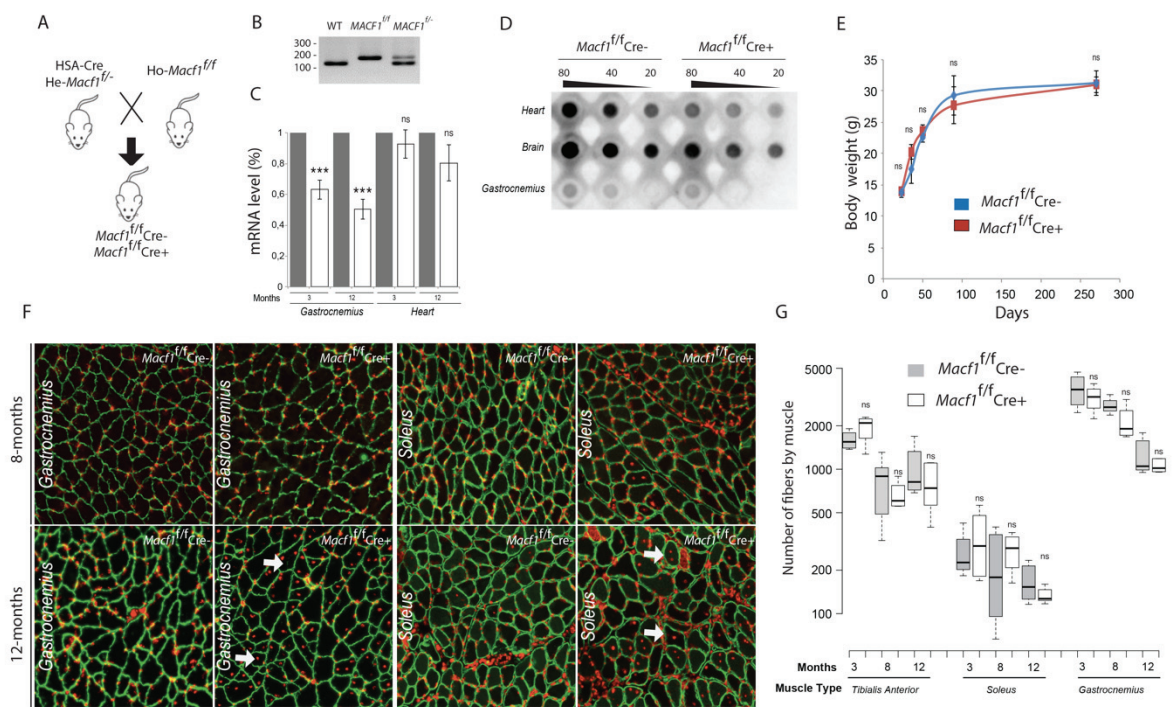
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Mécanisme moléculaire du contrôle de l'arborisation axonale par une régulation post-traductionnelle de la kinase LKB1

Résumé

La connectivité neuronale est à la base des fonctions cognitives et est une conséquence de la morphologie neuronale. Des défauts de développement neuronal sont associés à des troubles neuro-développementaux tels que la schizophrénie ou des troubles du spectre autistique. Ainsi dans ce cadre, la question fondamentale de ma thèse a été de comprendre comment la morphologie des neurones est acquise durant le développement, en étudiant les mécanismes moléculaires aboutissant cette morphologie. L'acquisition de la morphologie axonale est permise par la coordination de voies de signalisation intracellulaires et des facteurs extracellulaires tels que les molécules de guidages ou les neurotrophines. La kinase LKB1 (Liver Kinase B1) est impliquée dans l'acquisition de la morphologie neuronale par l'activation séquentielle des kinases de la famille de l'AMPK (Amp activated Protein Kinase). Cependant, les facteurs extracellulaires permettant la régulation de cette kinase sont à ce jour peu connus. Un facteur extracellulaire est impliqué dans la polarisation neuronale par l'intermédiaire de LKB1, la neurotrophine BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor). Cette neurotrophine est impliquée dans le branchement axonal, tout comme la kinase LKB1 qui régule le branchement axonal par l'activation de la kinase NUAK1 (NUAK Family Kinase 1). Ainsi, nous avons posé l'hypothèse que le BDNF régule la kinase LKB1 pour le branchement axonal.

L'utilisation d'une approche candidat nous a permis de montrer que le BDNF régule la voie LKB1/NUAK1 pour le branchement axonal par le biais de la régulation des mitochondries. En effet, un traitement des neurones au BDNF induit une augmentation du nombre de branches et du métabolisme des mitochondries et nous avons montré que ces régulations sont dépendantes de LKB1 et de NUAK1. De plus, nous avons montré que le BDNF induit la phosphorylation du site S431 de LKB1 par le BDNF par le biais de la MAP kinase ERK. Une approche de remplacement de gènes nous a permis de montrer que le site S431 de LKB1 est nécessaire à la formation de branches et au trafic des mitochondries *in vitro*. Par la suite, nous avons utilisé la méthode d'électroporation *in utero* associée à l'approche de remplacement de gènes *in vivo*. L'expression du mutant S431A permet de restaurer le branchement axonal de la couche V en ipsilatéral mais pas le branchement contralatéral des couches II/III. Pour finir, nous avons montré que les souris mutantes S431A ont un défaut de branchement terminal mais aussi de comportement.

Ainsi mes travaux ont permis une meilleure compréhension de la signalisation BDNF menant à la formation de branches, mais aussi l'identification d'un site de modification post-traductionnelle de LKB1 impliqué dans l'équilibre du branchement ipsilatéral et contralatéral *in vivo*.

Mots-clés : développement cortical, BDNF, LKB1, NUAK1, branchement axonal, cortex

Abstract

Neuronal connectivity forms the basis of neuronal functions and is a consequence of neuronal morphology. Neuronal development defects result in neurodevelopmental diseases such as schizophrenia or autism. In this context, the fundamental question of my thesis was to understand how neuronal morphology is acquired during development by the identification of molecular mechanism leading to the regulation of axonal morphology. Acquisition of specific pattern of axonal morphology is regulated by coordination of intracellular signaling pathway and extracellular cues such as neurotrophins or guidance molecules. The LKB1 kinase (Liver Kinase B1) is a master kinase involved in the acquisition of neuronal morphology. Yet the extracellular factors ensuring the regulation of LKB1-dependent signaling pathway in the axon remain largely unknown. An extracellular cue is involved in LKB1-dependent neuronal polarity : the neurotrophin BDNF. Moreover, BDNF regulates axon branching as LKB1. Axon branching regulation by LKB1 involved the activation of NUAK1 kinase. Thus, we hypothesized that BDNF regulates axon branching by the regulation of LKB1 and NUAK1.

A candidate-approach technic allowed us to show that BDNF-induced axon branching and mitochondria regulation is dependent on LKB1/NUAK1 signaling. A BDNF neurons treatment leads to an increase in axonal branching and mitochondria metabolism and we show that these regulations are dependent to LKB1 and NUAK1. Moreover, BDNF-induces S431 phosphorylation on LKB1, and this phosphorylation is mediated by the MAP kinase ERK. A gene replacement strategy allowed us to show that S431 site on LKB1 is necessary for axon branching and mitochondria trafficking *in vitro*. Then, we used *in utero* electroporation linked to gene replacement strategy *in vivo*. We observed that expression of S431A mutant rescue axon branching in ipsilateral side in layer V whereas S431A mutant failed to rescue axonal branching of layers II/III in the contralateral side. Finally, we reported that mice mutant S431A have altered terminal axon branching and behavior

Taken together, these results allowed a better understanding in BDNF signalization for axon branching and suggest a local regulation participates in the balance between ipsilateral and contralateral axonal projections.

Key words : cortical development BDNF, LKB1, NUAK1, axon branching, cortex