UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC)

THÈSE présentée par :

Johan GILET

soutenue le : **20 Décembre 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Neurosciences et aspect cellulaire et moléculaire de la biologie

Dérégulations neuro-développementales impliquées dans les malformations du développement cortical associées aux mutations du gène KIF2A : apport d'un modèle murin knock-in conditionnel.

THÈSE dirigée par :
Pr. CHELLY Jamel PR PUPH IGBMC, Illkirch

RAPPORTEURS :
Dr. BAULAC Stéphanie DR, ICM, Paris
Dr. LESCA Gaëtan MCUPH, CHU HCL, Lyon

AUTRES MEMBRES DU JURY :
Dr. DUPUIS Luc DR, INSERM, U118, Strasbourg

INVITÉS :
Dr. FRIANT Sylvie DR, GMGR, Strasbourg
Dr. GODIN Juliette CR, IGBMC, Illkirch

Table des matières

Liste des abréviations : *1*

Liste des figures: *3*

Introduction *6*

Généralités sur le cortex *7*

Le développement cortical *8*

I. La prolifération des progéniteurs neuronaux **8**

1. Les divisions symétriques/asymétriques 9
2. Les différents types de cellules progénitrices 10
   - A. Les cellules neuroépithéliales 10
   - B. Les cellules gliales radiaires apicales 10
   - C. Les cellules gliales radiaires basales 11
   - D. Les progéniteurs intermédiaires apicaux 12
   - E. Les progéniteurs intérmédiaires basaux 12
3. Régulations de la neurogènese 13
   - A. Le fuseau mitotique 13
   - B. Les jonctions adhérentes 14
   - C. La régulation du cycle cellulaire 15
   - D. La migration nucléaire intercinétique 16
   - E. L'implication du cil primaire 17
   - F. La mort cellulaire 20

II. La migration neuronale **22**

1. Généralités 22
2. Les cellules de Cajal-Retzius 23
3. Les différents modes de migration neuronale 23
   - A. La migration radiaire 23
   - B. La migration tangentielle 25
4. L'organisation du cortex en 6 couches et l'influence de la voie de signalisation Reelin 27
5. La migration neuronale dans l'hippocampe 29

III. La différenciation neuronale **31**

1. La spécification neuronale 31
2. Le développement de la polarisation neuronale. 34
3. La régulation du guidage axonal 35

Le cytosquelette de microtubules *37*

I. La dynamique des microtubules **37**

1. La structure des microtubules 37
2. La nucléation des microtubules 38
3. La dynamique de polymérisation-dépolymérisation des microtubules 39
4. La régulation de la dynamique des microtubules par ses protéines associées 40
   - A. Les protéines « classiques » associées aux treillis de microtubules 40
   - B. Les protéines associées à l'extrémité (+) des microtubules 41
   - C. Les protéines associées à l'extrémité (-) des microtubules 42
5. Les modifications post-traductionnelles des microtubules 43

II. Les protéines motrices associées aux microtubules **45**

1. La dynéine 45
2. Les kinésines 47
   - A. Les kinésines responsables du transport intracellulaire 47

B. Les kinésines responsables de la dépolymérisation des microtubules 49
C. Le mécanisme de dépolymérisation des microtubules par KIF2A..... 50
D. Les mécanismes de régulation de la dépolymérisation des microtubules par KIF2A. 52

III. L'implication des microtubules et ses protéines associées dont KIF2A lors du développement cortical..... 53
1. L'implication dans la neurogenèse..... 54
2. L'implication dans la migration neuronale radiaire. 56
3. L'implication lors de la différenciation..... 58

Les malformations du développement cortical 61

I. Les malformations du développement cortical liées à un défaut de prolifération ou de l'apoptose. 62
1. La microcéphalie 62
2. La mégalencéphalie..... 64
3. Les dysplasies corticales focales 64

II. Les malformations du développement cortical liées à un défaut de migration neuronale . 65
1. Les lissencéphalies 65
2. Les tubulinopathies..... 66
3. Les hétérotopies nodulaires périventriculaires et hétérotopies « en ruban » 68
4. Les polymicrogyries..... 69

III. Les malformations associées aux mutations dans le gène KIF2A..... 70

IV. Les modèles animaux utilisés pour l'étude des malformations du développement cortical 72
1. L'électroporation *in-utero* 72
2. Les modèles souris « knock-out » 73
3. Les modèles souris « Knock-in » 75
4. La technologie Cre-Lox..... 75
5. La technologie FLEx..... 77

Objectifs de ma thèse :..... 79

Résultats 81

Ciliogenesis and cell cycle alterations contribute to KIF2A-related malformations of cortical development..... 82

Conditional switching of KIF2A mutation provides new insights into cortical malformations pathogeny..... 83

Résultats non publiés de travaux en cours de finalisation 84

Conséquences de l'expression tardive de mutations dans le gène KIF2A et contribution au phénotype d'épilepsie dans un modèle de souris transgénique 84

Discussion..... 93

I. La technologie FLEx II, une stratégie universelle pour la génération de KI conditionnel et l'étude des pathologies d'origine génétique..... 94

II. L'étude des mécanismes physiopathologiques des MDC lié aux mutations de KIF2A par l'utilisation du modèle murin Knock-in conditionnel..... 98
1. L'impact des mutations de KIF2A à travers un effet perte de fonction ou dominant négatif ?..... 99
2. L'impact des mutations de KIF2A sur le neuro-développement par son action sur les microtubules 102
3. Les tubulinopathies et MDC liées aux protéines associées aux microtubules : Une convergence des mécanismes physiopathologiques ?..... 104
4. Impact des mutations de KIF2A sur la prolifération ou sur les processus post-mitotiques ?..... 105
5. Lien entre KIF2A et l'apoptose..... 106

6. Épilepsie dans les MDC : perturbation durant la période anténatale ou post-natale ?..... 109

III. Conclusion générale 111

Bibliographie 112

Résultats annexes 138

TUBG1 missense variants underlying cortical malformations disrupt neuronal locomotion and microtubule dynamics but not neurogenesis 139

DYNC1H1-causing MCD and SMA-LED mutations lead to alterations of dynein dependent processes in patients derived fibroblasts..... 140

Liste des abréviations :

ADN: acide désoxyribonucléique

ADP: Adénosine diphosphate

Akt: protéine kinase B

AMP-PNP: adénylyl-imidodiphosphate

APAF-1: Apoptotic peptidase activating factor 1

ApoER2: Reelin Receptors Apolipoprotein E receptor 2

ARL13B: ADP-ribosylation factor-like protein 13B

ARN: acide ribonucléique

ARX: Aristaless Related Homeobox

ATP: adénosine triphosphate

Bax: Apoptosis regulator BAX

BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor

BLBP: Brain lipid-binding protein

CA: Corne d'Ammon

CAMSAP: Calmodulin-regulated spectrin-associated protein

cCR : Cellules de Cajal-Retzius

Cdc42: Cell division control protein 42 homolog

Cdk2: Cyclin-dependent kinase 2

CDK5: Cell division protein kinase 5

CLIP170: CAP-GLY domain containing linker protein 1

cNE : Cellule neuroépithéliale

CPAP: centrosomal P4.1-associated protein

CRE: Cre recombinase

CTIP2: COUP-TF-interacting protein 2

Cul5: Cullin-5

DAB1: DAB Adaptor Protein 1

DCF: Dysplasie corticale focale

DCHS1: Dachsous Cadherin-Related 1

DCX: Doublecortine

DEPDC5: DEP domain containing 5

DI: Déficience intellectuelle

DYNC1H1: Dynein cytoplasmic 1 heavy chain 1

EB: End-binding

EEG: électroencéphalogramme

EIU: Electroporation *in-utero*

EML1: EMAP Like 1

FAT4: FAT Atypical Cadherin 4

FEZF2: Fez family zinc finger protein 2

FLNA: Filamine A

GABA: gamma-aminobutyric acid

GATOR: GATOR complex

GCP: gamma tubulin complex

GDP: guanosine diphosphate

GFAP: Glial fibrillary acidic protein

GLAST: GLutamate ASpartate Transporter

GM130: cis-Golgi matrix protein 130

GRa: Glie radiaire apicale

GRb: Glie radiaire basale

GSK3β: Glycogen synthase kinase 3 beta

GTP: guanosine triphosphate

HNP: Hétérotopie nodulaire périventriculaire

HSP90: Heat Shock Protein 90

KI: Knock-in

KIF2A: Kinesin Family Member 2A

KIF5C: Kinesin Family Member 5C

Kip2: Kinesin-like protein 2

KO: Knock-out

LAMB: Laminin Subunit Beta

LAMC: Laminin Subunit Gamma 1

LEG : Partie latérale des éminences ganglionnaires

LIS: Lissencéphalie

LIS1: Lissencephaly 1

LPA: Lysophosphatidic acid

MAP: Microtubule associated protein

MCAK: Mitotic Centromere-Associated Kinesin

MCAP: Syndrome mégalencéphalie-malformation capillaire-polymicrogyrie

MCPH1: Microcephalin

MDC/MCD: Malformation du développement cortical

MDM2: Mouse double minute 2 homolog

MEC17: Alpha-tubulin N-acetyltransferase 1

MEG : Partie médiane des éminences ganglionnaires

MNI : Migration nucléaire intercinétique

MPPH: Megalencephaly-Polymicrogyria-Polydactyly-Hydrocephalus Syndrome

MPT: Modification post-traductionnelle

MT: Microtubule

MTOC: microtubules-organizing-center

mTOR: mechanistic target of rapamycin

NBN: Nibrin

NDE1: NudE Neurodevelopment Protein 1

NDEL1: NudE Neurodevelopment Protein 1 Like 1

NEDD4L: NEDD4 Like E3 Ubiquitin Protein Ligase

NPRL: Nitrogen Permease Regulator Like homolog

p53: p53 tumor supressor

PAK1: Serine/threonine-protein kinase

PAX6: protéine paired box 6

PI3K: phosphoinositide 3-kinase

PIa: Progéniteur intermédiaire apical

PIb: Progéniteur intermédiaire basal

PIPKα: Phosphatidylinositol 4-phosphate5-kinase alpha

PLK1: Serine/threonine-protein kinase PLK1

PTZ: pentylènetétrazole

QI: Quotient intellectuel

RAD50: DNA repair protein RAD50

Rap1: Ras-proximate-1

Rb: retinoblastoma protein

Rbx2: RING-Box Protein 2

RELN: Reelin

SATB2: Special AT-rich sequence-binding protein-2

SVZ : Zone sous-ventriculaire

Syne-1/2: Spectrin Repeat Containing Nuclear Envelope Protein ½

Tau : Tubulin-associated unit

TBR1: T-box, brain, 1

TBR2: T-box brain protein 2

Tpx2: Targeting protein for Xklp2

TrkB: Tropomyosin receptor kinase B

TTBK2: Tau tubulin kinase 2

TTL: Tubulin tyrosine ligase

TTLL: Tubulin tyrosine ligase like

TUBA: Tubulin Alpha 1

TUBB: Tubulin Beta Class I

TUBG1: Tubulin Gamma 1

VLDR: Very-low-density-lipoprotein receptor

VZ: Zone ventriculaire

WDR62: WD Repeat Domain 62

ZI: Zone intermédiaire

γTuRC: gamma-tubulin ring complex

γTuSC: gamma-tubulin small comple

Liste des figures:

Figure 1: Schéma de comparaison entre la structure globale du cerveau de l'homme et de la souris.

Figure 2: Les différents types de divisions des progéniteurs neuronaux.

Figure 3: Organisation et modes de division des cellules gliales radiaires apicales (GRa).

Figure 4: Les différents modes de division des progéniteurs intermédiaires basaux (PIb) chez les espèces lissencéphaliques et gyrencéphaliques.

Figure 5: Le plan de clivage du fuseau mitotique décide du mode de division entrepris par les cellules en prolifération.

Figure 6: Schéma de déroulement du cycle cellulaire mettant en évidence l'importance de la transition G1/S.

Figure 7: La migration nucléaire intercinétique (MNI) des progéniteurs neuronaux.

Figure 8: Structure du cil primaire.

Figure 9: Le cil primaire influence le type de division réalisé par les cellules en prolifération.

Figure 10: Les différentes voies de signalisation de l'apoptose lors de la réception d'un stimulus externe ou interne à la cellule.

Figure 11: L'activation de la protéine p53 participe à l'induction de l'apoptose dans les neurones.

Figure 12: Le développement du cortex cérébral en fonction des différentes vagues de migration neuronale.

Figure 13: Les différentes étapes séquentielles de la locomotion neuronale.

Figure 14: La migration tangentielle des interneurones au cours du neurodévelopement.

Figure 15: La coordination entre migration radiaire et tangentielle permet un positionnement correct dans la plaque corticale.

Figure 16: Organisation séquentielle du cortex en 6 couches.

Figure 17: Les souris Reeler présentent une organisation des couches corticales inversées.

Figure 18: Les nombreuses voies de signalisation régulées par la protéine Reelin.

Figure 19: Les différentes structures de l'hippocampe.

Figure 20: La migration en « escalade » des neurones pyramidaux hippocampiques.

Figure 21: Les différents types de projections axonales provenant du cortex.

Figure 22: Le modèle d'organisation des sous types neuronaux par répression/dérépression de facteurs de transcription.

Figure 23: La polarisation axono-dendritique lors du développement cortical.

Figure 24: Les différents types de guidage axonaux par attraction/répulsion.

Figure 25: La structure des microtubules en protofilaments.

Figure 26: Les complexes de γ-tubuline, un socle et un modèle pour la nucléation des microtubules.

Figure 27: La dynamique de polymérisation/dépolymérisation des microtubules liée à l'hydrolyse du GTP.

Figure 28: Le rôle des protéines associées aux microtubules dans la stabilisation/déstabilisation de cette structure.

Figure 29: L'organisation des modifications post-traductionnelles le long des microtubules très peu élucidée.

Figure 30: Les modèles de recrutement de la dynéine à l'extrémité (+) des microtubules dans la levure.

Figure 31: Les différents rôles de LIS1 dans l'interaction dynéine-cargo.

Figure 32: La fixation de la kinésine-1 à deux microtubules permet le déplacement de l'un par rapport à l'autre.

Figure 33: L'architecture des kinésines-13.

Figure 34: Les différentes étapes de la dépolymérisation des microtubules par KIF2A.

Figure 35: La régulation de l'activité de KIF2A en fonction de la croissance neuritique.

Figure 36: L'implication des microtubules dans les différents processus du développement cortical.

Figure 37: L'organisation des microtubules dans le fuseau mitotique et le rôle des MAP dans la maintenance de cette structure.

Figure 38: L'implication des microtubules et de ses protéines associées dans le processus de nucléokinèse.

Figure 39: La dynamique des microtubules permet la régulation de la polarisation axonale.

Figure 40: L'activité de KIF2A permet de réguler le nombre et la longueur des prolongements neuronaux.

Figure 41: Schéma et tableau illustrant les différentes malformations du développement cortical et leur impact sur la morphologie du cortex.

Figure 42: IRM d'un patient présentant une microcéphalie.

Figure 43: Les lissencéphalies de type Cobblestone peuvent prendre la forme d'une polymicrogyrie ou d'une lissencéphalie de type I.

Figure 44: Les tubulinopathies : De nombreux mécanismes impliqués menant à un large spectre de malformations du développement cortical.

Figure 45: Tableau récapitulatif des malformations du développement cortical et des mécanismes impliqués.

Figure 46: Schéma illustrant la localisation des différentes mutations de *KIF2A* identifiées chez des patients atteint de malformations du développement cortical.

Figure 47: Tableau clinique de 4 parmi les cinq patients présentant une mutation dans le gène *KIF2A*.

Figure 48: La mutation p.His321Asp provoque une localisation anormale de KIF2A aux microtubules.

Figure 49: La technique d'électroporation *in-utero.*

Figure 50: La technologie Cre-Lox.

Figure 51: La technologie Cre-ERT.

Figure 52: La technologie « FLEx switch ».

Figure 53 : L'amélioration de la technologie FLEx permet la génération d'un modèle murins knock-in conditionnel.

Figure 54 : Exemple de stratégie de sauvetage dans le cadre de la mutation KIF2A par l'utilisation de la technologie FLEx.

Figure 55: Tableau comparatif modèles murins Knock-out, Knock-in KIF2A.

Figure 56: L'impact des mutations de KIF2A sur les microtubules et les processus neuro-développementaux.

Figure 57: Schéma récapitulatif illustrant le lien entre microtubules et malformations du développement cortical.

Figure 58 : Hypothèse de relation entre les anomalies de dynamique des microtubules liées aux mutations de KIF2A et l'apoptose**.**

Introduction

Généralités sur le cortex

Le cortex cérébral est la partie la plus superficielle du cerveau et représente environ 80% de la surface cérébrale. Cette zone est le siège des fonctions nerveuses les plus élaborées telles que les fonctions motrices et sensorielles. Chez les mammifères, il est défini comme néocortex et est organisé histologiquement en 6 couches distinctes. Il se compose de deux hémisphères connectés entre eux par le corps calleux (substance blanche) et présente chez l'homme une apparence plissée appelée circonvolution. Son développement est très conservé entre les espèces, c'est pourquoi les découvertes majeures réalisées grâce à des modèles animaux tels que le rat ou la souris peuvent s'appliquer lors du développement cortical humain (Figure 1). Le cortex cérébral est un tissu composé majoritairement de deux types de cellules, les neurones et les cellules gliales. La population de neurones peuplant le cortex est elle-même composée de deux grands types de cellules, les neurones pyramidaux excitateurs utilisant comme neurotransmetteur principal le glutamate et les interneurones inhibiteurs utilisant le GABA. Ces deux types de neurones fonctionnent en symbiose et maintiennent une balance entre excitation et inhibition permettant au cerveau de fonctionner de manière optimale. Le développement cortical se déroule en trois phases principales hautement régulées : la prolifération des progéniteurs neuronaux permettant la formation de la population finale de neurones, la migration de cette population vers la plaque corticale afin de former les 6 couches du néocortex et la différentiation de ces neurones leurs permettant d'établir leurs connexions. Si l'un de ces processus est perturbé ou interrompu, cela mène à la formation de pathologies neuro-développementales telles que les malformations du développement cortical. Ces malformations peuvent se traduire par une réduction de la taille du cerveau appelée microcéphalie, une anomalie des circonvolutions appelée lissencéphalie ou la présence d'un amas de neurones anormalement localisé appelé hétérotopie. L'ensemble de ces malformations est, dans la majorité des cas, associé à une déficience intellectuelle et à l'épilepsie. Ces malformations du développement cortical sont souvent associées à des mutations génétiques dans des gènes codants pour des protéines intervenants dans l'organisation et la dynamique du cytosquelette de microtubules, ou dans la régulation de processus cellulaire dépendant des microtubules.

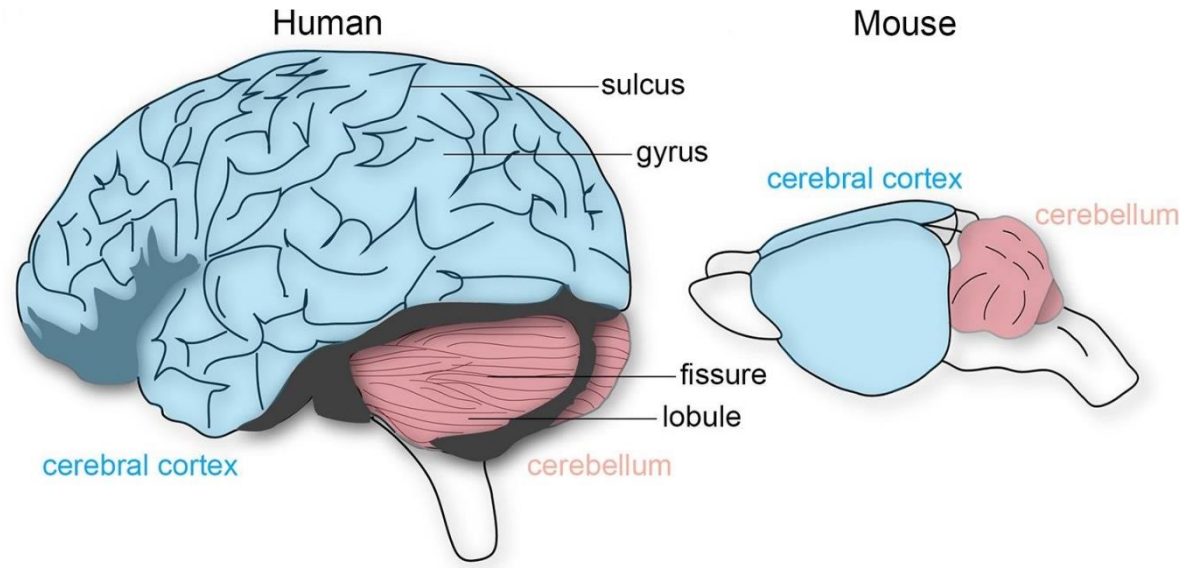


Figure 1: Schéma de comparaison entre la structure globale du cerveau de l'homme et de la souris. La structure du cerveau est conservée entre ces deux espèces, avec la présence d'une large surface de cortex cérébral (bleu) et la présence du cervelet en arrière du cerveau (rose). Cependant, l'homme présente des gyrations alors que la souris possède un cerveau lisse. (D'après Miterko et al., 2018)

Nous focaliserons cette introduction de thèse sur le développement cortical en détaillant les principaux processus impliquant les neurones pyramidaux tels que la prolifération, la migration et la différentiation. Puis nous clarifierons le rôle des microtubules et de la dynamique du cytosquelette dans ces différents processus. Enfin, la dernière partie décrira les différents types de malformations du développement cortical en fonction du processus perturbé et les différents types de modèles animaux utilisés dans la recherche scientifique afin d'étudier et comprendre les mécanismes impliqués dans ces pathologies.

Le développement cortical

I. La prolifération des progéniteurs neuronaux

A l'issue de la spécification du télencéphale et la fermeture du tube neural, une phase de prolifération des progéniteurs neuronaux intervient. Celle-ci débute à partir du jour embryonnaire 10 (E10) chez la souris et à partir de la 5ème semaine de gestation chez l'homme. Appelé aussi neurogenèse, ce processus est localisé dans les zones ventriculaire (VZ) et sous-ventriculaire (SVZ) et fait intervenir de nombreux processus de régulation permettant de générer la population finale de cellules formant le cortex cérébral (Martynoga et al., 2012).

1. Les divisions symétriques/asymétriques

Lors de la neurogenèse les progéniteurs neuronaux entreprennent une série de divisions afin d'augmenter leur propre population ou donner naissance à un nouveau type cellulaire, le but ultime de ces cellules étant de donner naissance aux neurones. Afin de pouvoir réguler cette production de neurones, deux types de divisions interviennent. Le premier type est la division symétrique qui permet à une cellule prolifération de donner naissance à deux cellules filles identiques. Ce type de division est organisé en deux sous types : la division proliférative si elle produit deux cellules filles prolifératives ou la division neurogénique si elle donne naissance à deux neurones (Figure 2). Le deuxième type de division est la division asymétrique, où une cellule mère donne naissance à deux cellules filles différentes. Ce type de division est lui-même subdivisé en quatre sous types : - différenciatif qui donne une cellule fille identique et un nouveau type de progéniteur, - bi-différenciatif qui donne naissance à deux nouveaux types de progéniteurs, - neurogéniques qui donne naissance à une cellule fille identique et à un neurone et - différenciatif/neurogénique qui donne naissance à un nouveau type de progéniteur et à un neurone (Figure 2) (Florio and Huttner, 2014). Ces modes de divisions participent à la production de la diversité cellulaire observée lors du développement cortical et sont hautement régulés car une perturbation lors de l'un de ces processus entraine, dans la majorité des cas, des malformations du développement cortical.

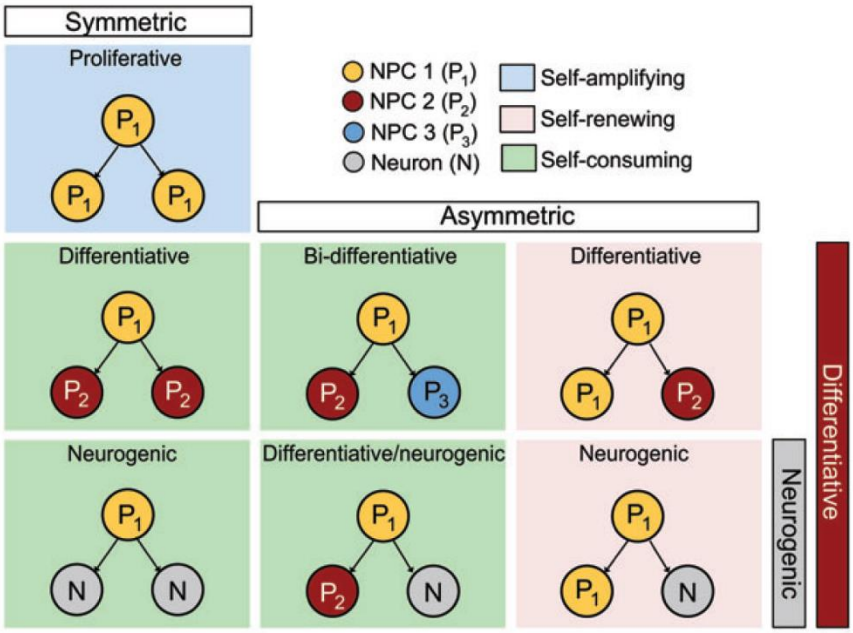


Figure 2: Les différents types de divisions des progéniteurs neuronaux
Le mode de division des progéniteurs neuronaux est défini en fonction de l'identité des deux cellules filles. En effet, une division donnant deux cellules filles identiques va être définie comme symétrique, tandis qu'une division donnant deux cellules filles différentes sera définie comme asymétrique. Par la suite, les propriétés prolifératives, différenciatives ou neurogéniques seront définies en fonction du type cellulaire des cellules filles. (P) : Cellule proliférative, (N) : Neurone, (NPC) : cellule progénitrice neurale. (D'après Florio et al., 2014)

2. Les différents types de cellules progénitrices

La neurogenèse et le développement du néocortex font intervenir une grande variété de cellules en prolifération. Parmi cette population, trois grandes classes émergent : les cellules neuroépithéliales, les cellules de la glie radiaire et les progéniteurs intermédiaires. Ces deux dernières classes sont encore subdivisées en fonction de la position des cellules, apicales lorsqu'elles bordent la surface du ventricule ou basales lorsqu'elles sont localisées dans la SVZ.

A. Les cellules neuroépithéliales

L'ensemble des neurones peuplant le cortex cérébral a pour origine les cellules neuroépithéliales (cNE). Ces cellules constituant la plaque neurale et le tube neural présentent une structure bipolaire selon un axe apico-basal car elles sont fixées au ventricule par leur membrane apicale et présentent leur membrane basale au contact de la surface piale. Elles subissent avant le jour embryonnaire 9 chez la souris (entre la 4ème et 5ème semaine de gestation chez l'homme), une série de divisions symétriques augmentant le nombre de progéniteurs et formant le neuroépithélium dont la VZ (Dwyer et al., 2016; Rakic, 1995). Lors de ces phases de divisions symétriques, les cNE effectuent une migration nucléaire intercinétique (MNI) le long de leur axe apico-basal. En effet, en fonction de la position de ces cellules dans le cycle cellulaire, leur position à travers le neuroépithélium sera différente. Ce déplacement se réalise de manière non concomitante entre les cellules et confère au neuroépithélium une apparence pseudo-stratifiée (Lee and Norden, 2013; Sauer and Walker, 1959; Taverna and Huttner, 2010). A partir du jour E10,5 chez la souris, ces cellules réalisent une série de divisions asymétriques marquant le début de la neurogenèse et la naissance des cellules de la glie radiaire.

B. Les cellules gliales radiaires apicales

Les cellules de la glie radiaire apicale (GRa) présentent de nombreuses similitudes avec les cNE telles que la polarisation selon un axe apico-basal. En effet, elles sont au contact du ventricule par un court processus apical et de la membrane piale au niveau basal à l'aide d'un long processus basal. Ces longs processus basaux tapissent le cortex et servent par la suite de guide aux neurones pour leur permettre d'atteindre la plaque corticale à l'aide de la migration radiaire (Figure 3) (Barry et al., 2014; Fernández et al., 2016; Rakic, 1972). De plus, les GRa réalisent aussi une MNI identique à celle réalisée par les cNE. Les GRa continuent d'exprimer des marqueurs neuroépithéliaux tels que Nestin mais diffèrent par l'expression de facteurs de transcription tels que PAX6 (Estivill-Torrus et al., 2002; Götz and Huttner, 2005a; Götz et al., 1998) mais aussi de marqueurs astrocytaires tels que GLAST, GFAP et BLBP

(Campbell and Götz, 2002; Götz and Huttner, 2005b; Kriegstein and Götz, 2003). Lors de la neurogenèse, les GRa entreprennent des divisions symétriques prolifératives afin d'augmenter le stock de cellules, asymétriques neurogéniques afin de donner naissance à un neurone ou encore prolifératives afin de donner naissance à un nouveau type de cellules prolifératives appelées progéniteurs intermédiaires (Figure 3). Au fil de la progression de la neurogènese, les GRa passent progressivement d'un mode de division symétrique proliférative vers une augmentation de la division asymétrique (Florio and Huttner, 2014; Götz and Huttner, 2005a), marquant la disparition d'une apparence pseudo-stratifiée et l'apparition de la SVZ.

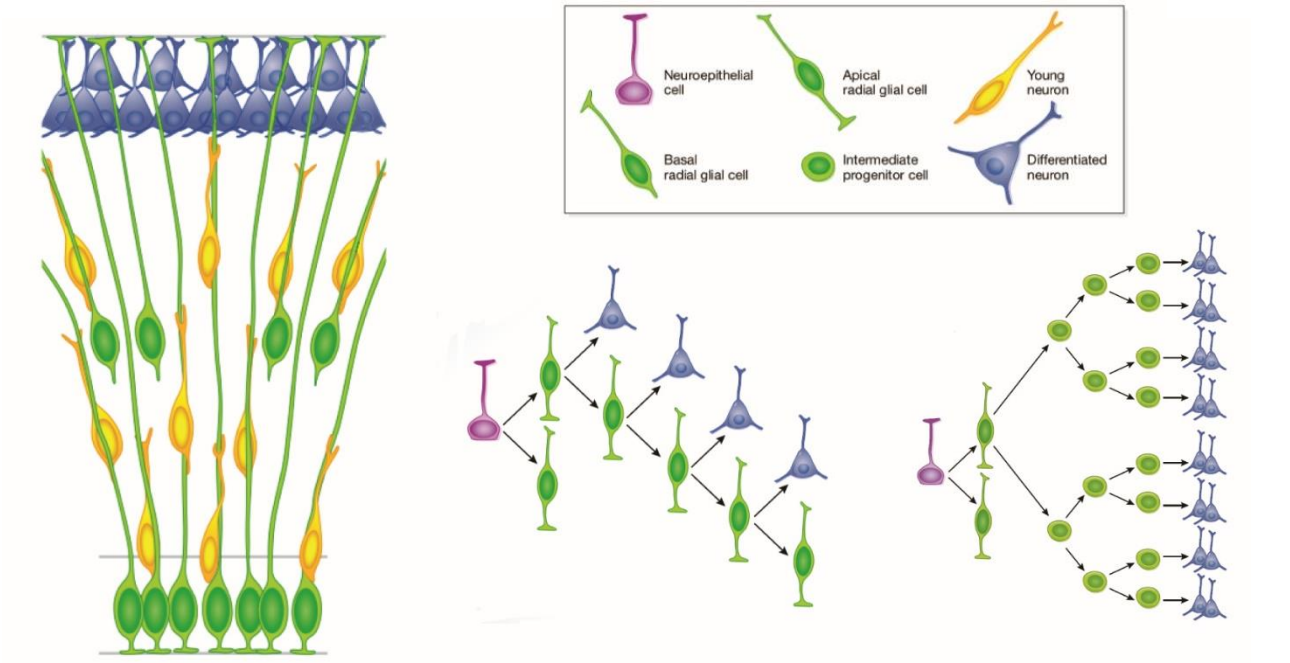


Figure 3: Organisation et modes de division des cellules gliales radiaires apicales (GRa)
Les GRa quadrillent le cortex afin de servir de support à la migration radiaire des neurones nouvellement formés. Les GRa peuvent réaliser des divisions asymétriques neurogéniques (à gauche) ou des divisions symétriques prolifératives afin de donner naissances aux progéniteurs intermédiaires qui se diviseront ensuite en neurones (à droite) (d'après Fernández et al., 2016)

C. Les cellules gliales radiaires basales

Des cellules gliales radiaires sont également situées dans la SVZ et sont appelées cellules gliales radiaires basales (GRb). Ce type de cellule a été identifié et est abondant dans les organismes ayant des cerveaux présentant des circonvolutions tels que l'homme ou le furet, cependant les GRb sont présentes en très faible quantité chez la souris. Classiquement les GRb sont similaires aux GRa car elles expriment les mêmes marqueurs tels que PAX6 et les marqueurs astrocytaires mais elles diffèrent par le fait qu'elles sont localisées dans la SVZ et présentent classiquement une morphologie unipolaire. En effet, elles comportent un processus basal long leur permettant de se fixer à la surface piale mais

ne comportent pas de processus apical vers le ventricule (Fietz et al., 2010; Hansen et al., 2010; Reillo et al., 2011). Deux autres types de GRb ont été découverts : des GRb bipolaires présentant un processus basal fixé à la surface piale et un processus apical et des GRb unipolaires présentant uniquement un processus apical, cependant dans ces deux types de GRb, le processus apical n'atteint jamais le ventricule (Pilz et al., 2013). Les GRb effectuent majoritairement des divisions asymétriques neurogéniques générant des neurones mais aussi progressivement des cellules filles exprimant le marqueur de progéniteur intermédiaire TBR2 (Hansen et al., 2010).

D. Les progéniteurs intermédiaires apicaux

Les progéniteurs intermédiaires apicaux (PIa) sont issus de la division asymétrique des GRa. Comme pour les GRa, les PIa expriment encore le facteur de transcription PAX6, sont en contact avec la surface du ventricule et se divisent après avoir effectué une migration nucléaire intercinétique. Cependant, les PIa perdent plusieurs caractéristiques des glies radiaires telles que la rétraction du processus basal les fixant à la surface piale et l'arrêt de l'expression des marqueurs astrocytaires (Gal et al., 2006; Tyler and Haydar, 2013). Ces cellules perdent leur potentiel de renouvellement en effectuant une unique division symétrique neurogénique augmentant rapidement le nombre de neurones mais épuisant leur propre population (Gal et al., 2006; Stancik et al., 2010; Tyler and Haydar, 2013).

E. Les progéniteurs intérmédiaires basaux

Les progéniteurs intermédiaires basaux (PIb) sont aussi issus de la division des GRa et des cNE. Chez les rongeurs ayant un cerveau lissencéphale tel que la souris, ces cellules présentent une diminution progressive de l'expression du facteur de transcription PAX6 mais expriment le marqueur TBR2 et semblent majoritairement issues de la division des GRa pour ensuite se diviser directement en neurones (Figure 4) (Haubensak et al., 2004; Miyata et al., 2004; Noctor et al., 2004). Cependant chez les espèces présentant un cerveau gyrencéphale comme l'homme, ces cellules co-expriment les facteurs PAX6 et TBR2 et sont générées dans la SVZ à la fois par la division des PIb mais également des GRb (Betizeau et al., 2013; Fietz et al., 2010; Florio and Huttner, 2014; Götz and Huttner, 2005b). Ces cellules, de manière concomitante, rétractent leurs processus basaux et quittent leur position apicale afin de pouvoir entrer en mitose à la partie la plus basale de la VZ (Florio and Huttner, 2014; Götz and Huttner, 2005b; Haubensak et al., 2004; Miyata et al., 2004; Noctor et al., 2004). Dans les stades les plus avancés de la neurogenèse, ce déplacement des PIb contribue à l'apparition de la seconde couche de cellules en prolifération, la SVZ. Chez les primates, à la différence des PIa, les PIb peuvent réaliser une division symétrique proliférative transitoire afin d'augmenter leur propre stock avant de réaliser

une division symétrique neurogénique produisant une majeure partie de la population finale de neurones (Figure 4) (Fietz et al., 2012; Lui et al., 2011).

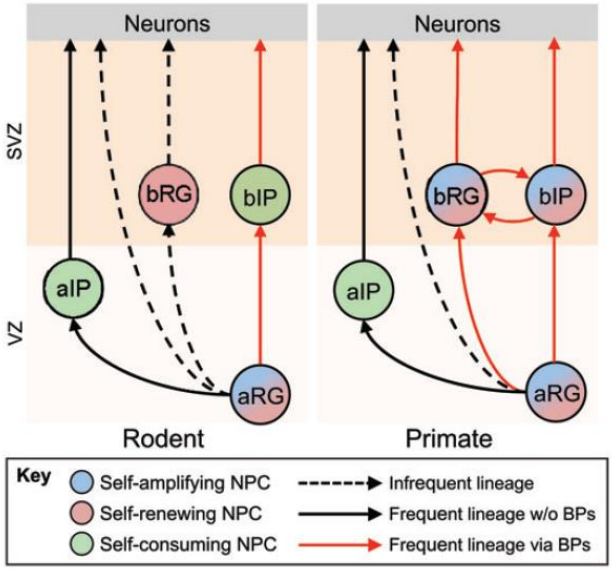


Figure 4: Les différents modes de division des progéniteurs intermédiaires basaux (PIb) chez les espèces lissencéphaliques et gyrencéphaliques.
Chez les espèces lissencéphaliques comme les rongeurs, les PIb sont issues de la division des GRa et se divisent en neurones. Chez les espèces gyrencéphaliques comme les primates, les PIb peuvent transitoirement augmenter leur stock ou se diviser en GRb et donc augmenter très rapidement le stock final de neurones. aRG : cellule de la glie radiaire apicale, bRG : cellule de la glie radiaire basale, aIP : progéniteur intermédiaire apical, bIP : progéniteur intermédiaire basal (D'après Florio et al., 2014)

3. Régulations de la neurogènese

La balance entre division symétrique et asymétrique mais aussi entre prolifération et neurogénique est très importante car elle détermine le nombre de neurones formés lors de la neurogenèse. Une anomalie dans cette balance peut mener à un nombre trop faible ou trop élevé de neurones, c'est pourquoi ces processus sont finement régulés par plusieurs mécanismes intrinsèques ou extrinsèques à la cellule.

A. Le fuseau mitotique

Le premier processus régulant la balance entre division symétrique et asymétrique est l'orientation du fuseau mitotique. Les constituants cellulaires étant positionnés inégalement le long de l'axe antéro-postérieur de la cellule, c'est le plan de clivage du fuseau mitotique qui décide de la distribution égale ou inégale des différents composants des compartiments cellulaires dans les deux cellules filles et donc de leurs propriétés (Huttner and Brand, 1997; Wodarz and Huttner, 2003).

Initialement, une étude chez la drosophile a proposé qu'un plan de clivage orienté verticalement par rapport à la zone ventriculaire mène à une division symétrique proliférative des cNE et des GR. Au contraire, un plan de clivage parallèle à la surface de la zone ventriculaire mène à une division asymétrique car les constituants cellulaires apicaux sont hérités par une cellule fille et les constituants cellulaires basaux par l'autre cellule fille (Figure 5). Cependant, un plan de clivage parfaitement horizontal par rapport au ventricule est très rarement observé chez les mammifères (Kosodo et al., 2004; Landrieu and Goffinet, 1979; Smart, 1973). C'est pourquoi ce modèle a été revu afin d'expliquer comment des plans de clivages verticaux peuvent mener à des divisions asymétriques neurogéniques (Huttner and Brand, 1997). Plus récemment, il a été montré que le plan de clivage peut soit couper la membrane apicale de la cellule qui borde le ventricule et donner une division symétrique, soit la contourner et être oblique pour finalement mener à une division asymétrique (Figure 5) (Konno et al., 2008; Kosodo et al., 2004).

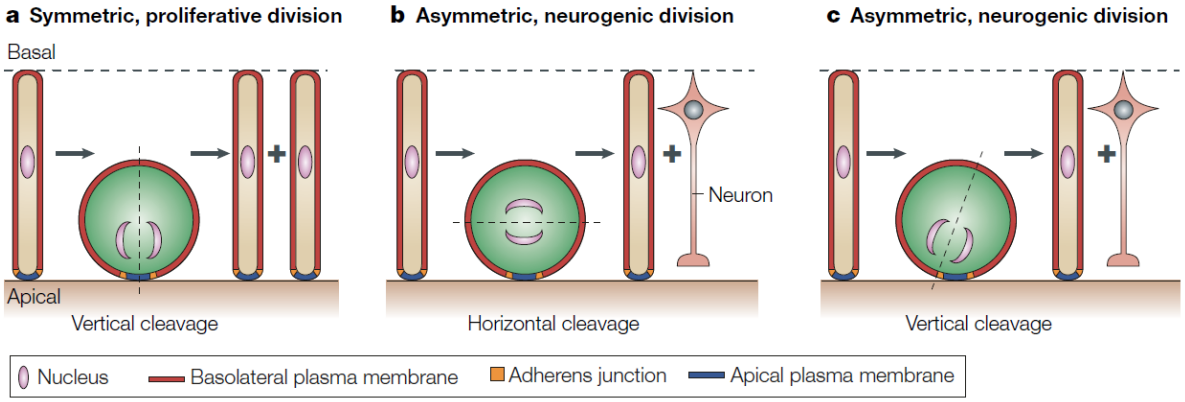


Figure 5: Le plan de clivage du fuseau mitotique décide du mode de division entrepris par les cellules en prolifération
Le type de division réalisé par les cellules en prolifération varie en fonction du plan de clivage lors de la mitose. Un plan de clivage parfaitement vertical par rapport à la surface du ventricule mène à une division symétrique. Un plan de clivage parfaitement horizontal ou oblique mène à une division asymétrique. (D'après Gotz et al., 2005)

B. Les jonctions adhérentes

Les cNE et les GR sont associées à la membrane apicale par des jonctions adhérentes (Aaku-Saraste et al., 1997; Manabe et al., 2002; Zhadanov et al., 1999). Comme pour les constituants cellulaires, les jonctions adhérentes sont réparties de manière inégale le long de l'axe antéro-postérieur de la cellule et sont donc confrontées à une répartition inégale ou égale lors de la division cellulaire qui peut déterminer le mode de division. De plus, la protéine PAR3 localisée dans la partie apicale des cNE a été montrée comme pouvant être héritée différemment dans les cellules filles et déterminer le mode de division utilisé (Kosodo et al., 2004). Des modèles de souris transgéniques ont aussi pu mettre en

évidence l'implication de la protéine β-caténine. En effet, dans le modèle *hydrocephalus with hop gait* (*hyh*) et dans des modèles mutants pour la β-caténine, la diminution de l'expression de β-caténine dans les processus apicaux entraine un passage prématuré de divisions prolifératives vers des divisions neurogéniques. (Chae et al., 2004; Machon et al., 2003; Zechner et al., 2003)

C. La régulation du cycle cellulaire

Le choix entre division prolifératives et neurogénique est hautement corrélé à la longueur du cycle cellulaire. En effet, une augmentation du nombre de divisions neurogéniques est corrélé à une augmentation de la longueur du cycle cellulaire des cNE et des GR. Cette augmentation de la longueur du cycle cellulaire serait plus précisément liée à un rallongement des phases G1 et S alors que les autres phases du cycle cellulaire resteraient constantes (Arai et al., 2011; Calegari et al., 2005; Takahashi et al., 1995). Par exemple, il a pu être démontré que les GRa présentent un cycle cellulaire plus long lors de la deuxième moitié du processus de neurogenèse par rapport au début de celui-ci, ce rallongement se traduisant par des phases G1 et S plus longues. De plus, les PIa et PIb présentent un cycle plus long que les GRa due à un rallongement de la phase G1 (Arai et al., 2011; Gal et al., 2006). Dans la continuité de ces résultats, il a pu être montré que la phase G1 est très importante dans la détermination du type cellulaire. L'utilisation d'une inhibition pharmacologique de la phase G1 par l'inhibition de cdk2/cycline D1 a permis de montrer que l'allongement de la phase G1 déclenche prématurément la neurogenèse au dépend de la prolifération des cNE (Calegari and Huttner, 2003). Dans le même contexte, le raccourcissement de la durée de la phase G1 par surexpression de cdk2/cycline D1 entraine une augmentation de la prolifération des cNE couplée à un retard de la neurogenèse (Lange et al., 2009a; Nonaka-Kinoshita et al., 2013; Pilaz et al., 2009a). Ces modifications de la durée de la phase G1 sont dépendantes de la transition G1/S. Cette transition fait intervenir les gènes cdk2/cyclineD1 qui, par la phosphorylation du facteur de transcription retinoblastoma tumor suppressor protein (Rb), permettent de lever la répression effectuée par ce facteur et la transcription de gènes impliqués dans la transition entre la phase G1 et S tels que E2F (Figure 6) (Christensen et al., 2005; Classon and Harlow, 2002; Maiti et al., 2005; Vanderluit et al., 2006).

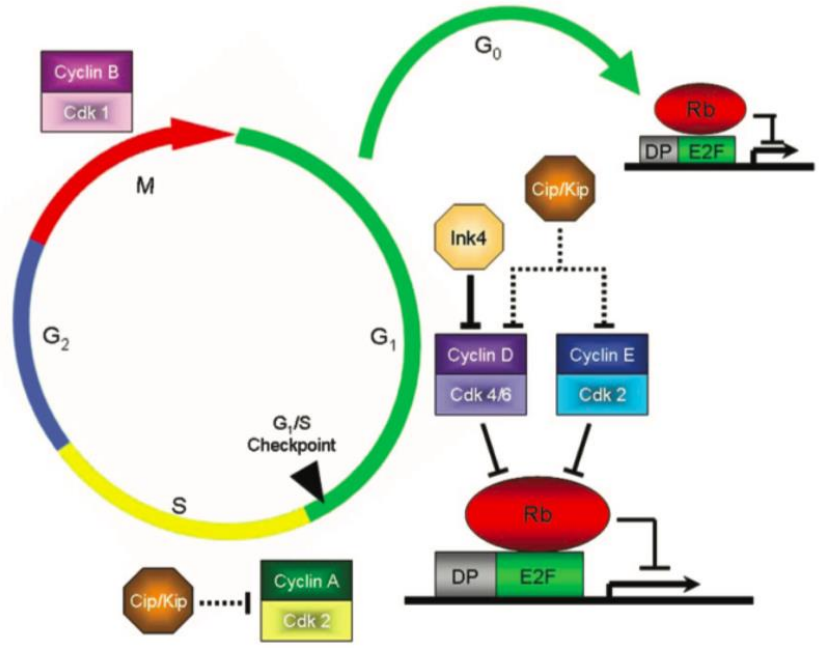


Figure 6: Schéma de déroulement du cycle cellulaire mettant en évidence l'importance de la transition G1/S.
La longueur du cycle cellulaire est fortement corrélée au passage de la phase G1 à la phase S. Cette transition est liée aux protéines Cycline D1 et Cdk2 qui par l'inhibition du facteur de transcription Rb permettent l'expression de gènes permettant le passage de G1 en S. (D'après McClellan et al.,2006)

D. La migration nucléaire intercinétique

La MNI est un mode de migration spécifique des progéniteurs apicaux. Ce processus est caractérisé par le fait que le noyau des cNE ou des GRa est localisé différemment en fonction de la position des cellules dans le cycle cellulaire. En effet, les noyaux se dirigent vers la partie basale du neuroépithélium lors de la phase G1, afin d'être localisés dans la partie la plus basale du neuroépithélium/VZ lors de la phase S du cycle, pour enfin revenir en position apicale lors de la phase G2. Les noyaux doivent être localisés dans la partie la plus apicale au ventricule pour entrer en mitose (Figure 7) (Miyata, 2007). Les mécanismes sous-tendant ce processus sont encore très peu élucidés mais le lien entre cette migration et le cycle cellulaire a été très largement étudié. Une étude a pu démontrer que le blocage de la MNI par un inhibiteur de la myosine-II n'entraine pas d'interruption du cycle cellulaire et permet donc tout de même l'entrée en mitose des progéniteurs apicaux (Schenk et al., 2009). Cependant, l'inverse ne s'applique pas, la MNI est très dépendante du cycle cellulaire. Des études par blocage pharmacologique des phase S ou G2/M du cycle cellulaire ont permis de mettre en évidence un blocage respectif de la MNI dans la région basale ou apicale du neuroépithélium (Baye and Link, 2008; Ueno et al., 2006). De plus, l'accélération ou le ralentissement du cycle cellulaire par surexpression ou inhibition par ARN interférent des cyclines ou de kinases dépendantes des cyclines n'ont pas montré

de perturbation de la position des noyaux des cNE lors de la phase S et de la mitose (Lange et al., 2009b; Pilaz et al., 2009b). Cela a permis de montrer la capacité d'adaptation de la vitesse de la MNI en fonction de la vitesse du cycle cellulaire.

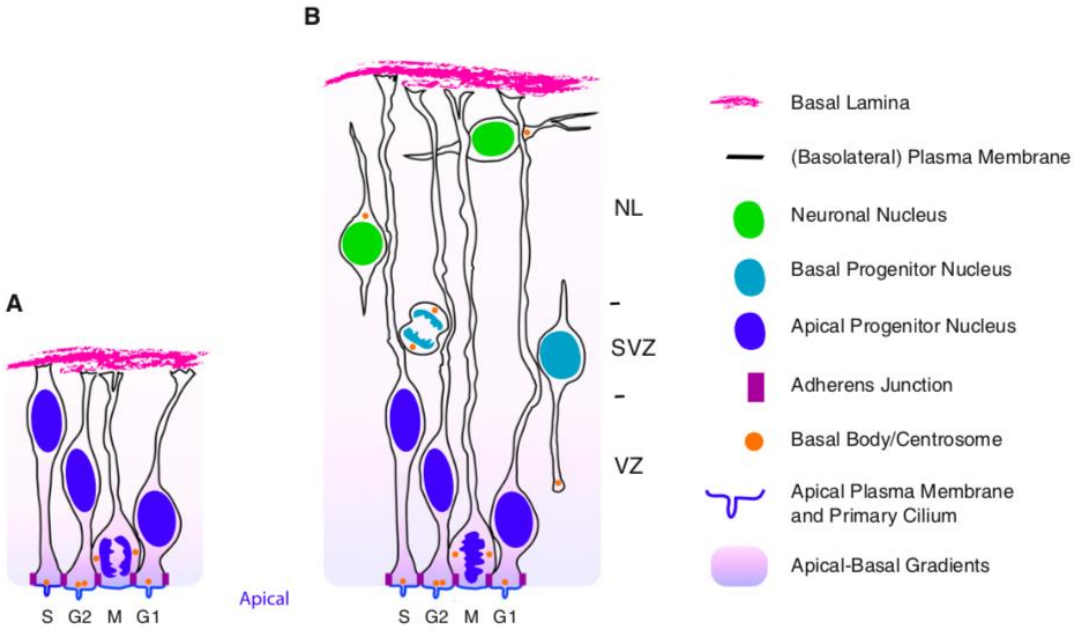


Figure 7: La migration nucléaire intercinétique (MNI) des progéniteurs neuronaux.
La MNI des cNE (à gauche) ou des GRa (à droite) se traduit par le mouvement du noyau des cellules en fonction de leur position dans le cycle cellulaire. Lors de la phase S les noyaux seront dans la position la plus basale du neuroépithélium ou de la VZ, pour se redéplacer lors la phase G2 afin d'être en position la plus apicale lors de l'entrée en mitose. VZ : zone ventriculaire, SVZ : zone sous-ventriculaire, NL : couches neuronales (D'après Taverna et al., 2010).

E. L'implication du cil primaire

Le cil primaire est un flagelle non mobile situé à la surface de la cellule qui est présent dans la majorité des cellules de mammifère. Il se compose d'un axonème de 9 doublets de microtubules placés en forme cylindrique et d'un corps basal composé d'un anneau de 9 triplets de microtubules. Ce corps basal nait de la conversion du centriole mère qui est le plus vieux centriole qui compose le centrosome de la cellule en comparaison avec le centriole fille (Figure 8) (Louvi and Grove, 2011). Ce cil est un organe sensoriel permettant la détection de stimuli mécaniques et chimiques par la cellule telle que les facteurs de croissances ou les neurotransmetteurs (Youn and Han, 2018). La formation du cil primaire est dynamique et l'assemblage/désassemblage de celui-ci est étroitement associé à la progression du cycle cellulaire. En effet, une cellule en prolifération doit désassembler son cil primaire afin de libérer le centriole mère impliqué lors de la division cellulaire dans le but de pouvoir entrer en mitose. On note aussi une résorption transitoire du cil lors de l'entrée en phase S (Rieder et al., 1979; Tucker et al., 1979). Cependant, il semblerait que lors de la mitose, le désassemblage du cil ne soit pas

total et que la membrane ciliaire reste fixée au centriole mère à un des deux pôles du fuseau mitotique et donc que celle-ci est héritée par une des deux cellules filles. Cette cellule fille ayant hérité de la membrane du cil primaire peut donc directement assembler celui-ci au niveau de sa membrane basale tandis que la cellule n'ayant pas hérité de cette membrane forme un nouveau cil primaire au niveau de sa membrane baso-latérale (Figure 8) (Wilsch-Bräuninger et al., 2012). De plus, la membrane du cil serait préférentiellement héritée par la cellule fille gardant la même identité que la cellule mère après la division. L'ensemble de ces observations expliqueraient la différence de types cellulaires entre les deux cellules filles et donc une division asymétrique. Ce système semble incompatible avec une division symétrique, cependant la majorité des cellules prolifératives comportant un cil primaire réalise malgré cela des divisions symétriques. Une étude a pu proposer que la cellule fille n'héritant pas du centriole mère associé à la membrane ciliaire est capable d'associer son centriole à une membrane ciliaire dérivée de l'appareil de Golgi et donc d'acquérir le même type cellulaire que la cellule mère (Paridaen et al., 2013). De plus, les GR perdraient leur faculté à fixer cette membrane du cil primaire à leur centriole au cours de la neurogenèse expliquant la progression de divisions symétriques prolifératives et asymétriques lors des stades précoces de neurogenèse vers des divisions symétriques neurogéniques lors des stades tardifs (Figure 9) (Paridaen et al., 2013).

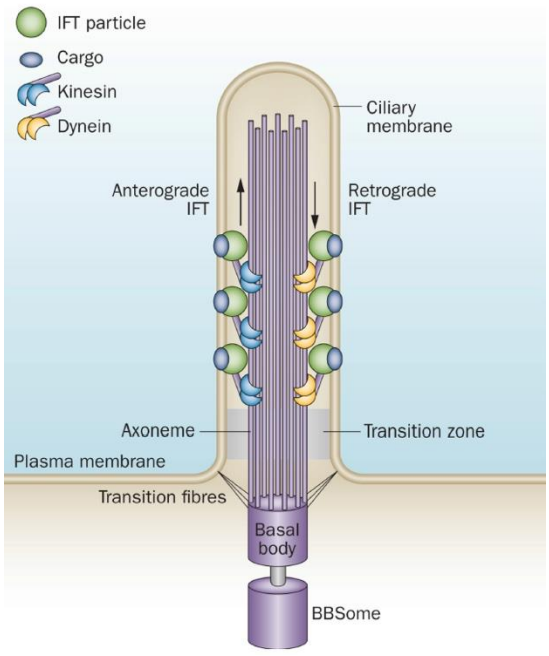


Figure 8: Structure du cil primaire.
Le cil primaire se compose d'un axonème lui-même composé de 9 doublets de microtubules, reposant sur le corps basal composé de 9 triplets de microtubules et du centriole mère de la cellule. IFT : Intraflagellar transport (D'après Valente et al.,2014)

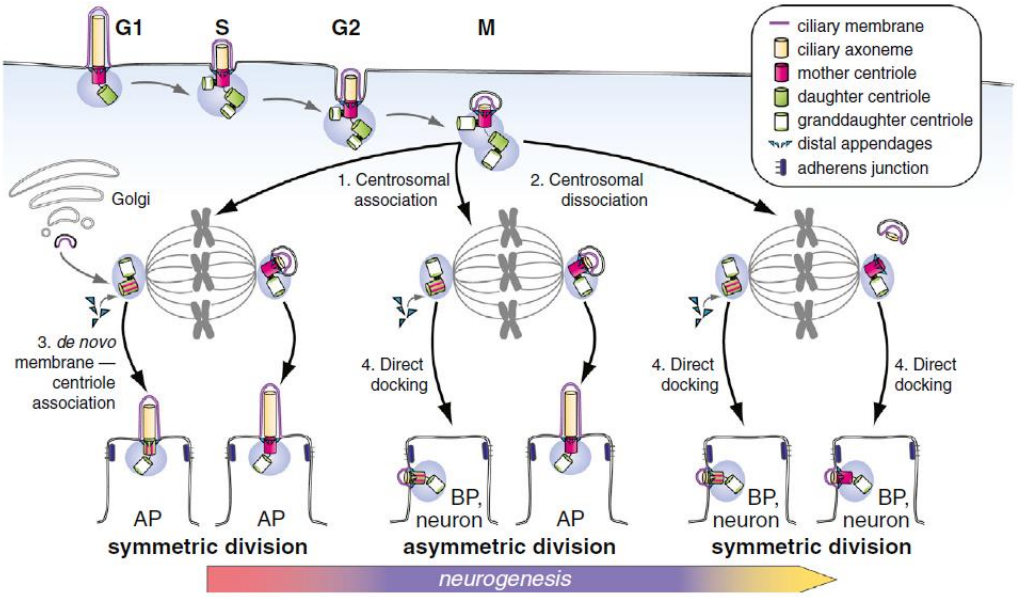


Figure 9: Le cil primaire influence le type de division réalisé par les cellules en prolifération.
Ce schéma représente le modèle selon lequel lors de la division cellulaire, le cil primaire ne désassemble pas entièrement et reste associé au centriole mère qui est hérité préférentiellement par une des deux cellules filles. La cellule fille ayant hérité du cil pourra assembler son cil primaire en position apicale tandis que l'autre cellule devra assembler un nouveau cil primaire en position basale. Cette position différente du cil primaire entraine un destin cellulaire différent pour ces deux cellules et donc une division asymétrique. Cependant, des divisions symétriques sont possible car la cellule n'ayant pas hérité du cil primaire de la cellule mère peut aussi associer à son centriole un cil primaire dérivé de l'appareil de Golgi et l'assembler en position apicale. De plus, il semble qu'au cours de la neurogenèse ce processus de fixation du cil au centriole mère disparaisse et donc marque le passage des divisions asymétriques prolifératives vers la production exclusive de neurones. AP : progéniteur apical, BP : progéniteur basal (D'après Paridaen et al., 2013).

La présence du cil primaire semble être un frein pour l'entrée en phase S. En effet, une étude d'inhibition d'Aurora A qui est impliquée dans le désassemblage du cil entraine un blocage de la résorption de celui-ci. A cette observation s'ajoute un blocage de l'entrée en phase S des cellules présentant un cil primaire tandis que les cellules n'ayant pas de cils ne rencontrent aucun problème de cycle cellulaire (Inoko et al., 2012). Ces problèmes d'entrée dans le cycle cellulaire liés à un défaut de désassemblage du cil peuvent aussi mener par la suite à des défauts de neurogenèse, comme pour le gène *CPAP* où une mutation dans celui-ci entraine un défaut de désassemblage du cil provoquant un défaut d'entrée dans le cycle cellulaire et finalement une différentiation prématurée des progéniteurs en neurones (Gabriel et al., 2016). Le cil primaire est aussi impliqué dans la polarisation apico-basale des progéniteurs comme le montre l'inactivation d'ARL13B, une protéine membranaire du cil. Cette inactivation chez la souris mène à une absence de cil primaire et une perte totale de la polarisation des cellules de la glie radiaire, entrainant une désorganisation de celles-ci et des anomalies du positionnement neuronal (Higginbotham et al., 2013). Un ensemble de pathologies appelées cilliopathies est associé à des mutations génétiques dans les constituants du cil primaire. Ces maladies affectent un grand nombre d'organes tel que le rein mais aussi le cerveau où elles causent de

nombreux phénotypes tels que des microcéphalies, des hétérotopies et des hydrocéphalies (Stoetzel et al., 2016; Youn and Han, 2018).

F. La mort cellulaire

La mort cellulaire programmée est un processus ayant de nombreux rôles lors du développement du cerveau tels que la fermeture du tube neural, la suppression d'un surplus de cellules dans la population initiale de neurones ou la suppression de neurones en position ectopiques (Fricker et al., 2018; Kuan et al., 2000). Le mécanisme de mort cellulaire programmée le plus observé est celui de l'apoptose. L'apoptose peut être intrinsèque à la cellule ou extrinsèque lorsqu'elle est liée à un signal pro-apoptotique provenant de l'extérieur de la cellule. L'apoptose intervient lorsqu'un signal interne ou externe pro-apoptotique active la translocation de la protéine Bax dans la mitochondrie et permet la libération de cytochrome c, entrainant l'activation de la protéine APAF-1 puis le clivage de la caspase 3 par la caspase 9 entrainant finalement la mort cellulaire (Figure 10).

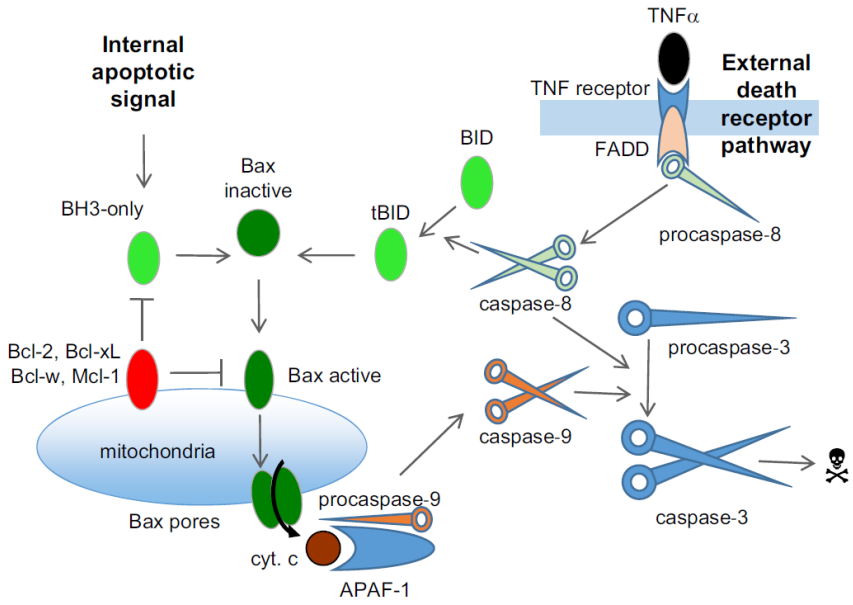


Figure 10: Les différentes voies de signalisation de l'apoptose lors de la réception d'un stimulus externe ou interne à la cellule.
Un message pro-apoptotic interne ou externe à la cellule entraine la translocation de Bax dans la membrane mitochondriale, ce qui permet la libération de cytochrome C. Le cytochrome C se fixe ensuite à la protéine APAF-1 activant le clivage de la caspase 3 par la caspase 9 et finalement la mort cellulaire. (D'après Fricker et al., 2018)

Ce processus est finement régulé et une dérégulation de l'expression de gènes pro- ou anti-apoptotiques peut mener à des anomalies du développement du cerveau. Par exemple, des études de modèles souris n'exprimant plus les gènes Caspase 3 ou Caspase 9 ont mis en évidence une diminution de la mort cellulaire et donc une accumulation d'un nombre anormalement élevé de neurones menant à des masses de cellules autour des ventricules (Hakem et al., 1998; Kuida et al., 1996). Dans le même

contexte, les souris n'exprimant plus le gène APAF-1 présentent une anencéphalie illustrant la présence d'une partie du cerveau en dehors de la boite crânienne, mais aussi des masses de cellules aux abords des ventricules (Yoshida et al., 1998).

Par ailleurs, il a pu être mis en évidence une participation de la protéine p53 tumor supressor dans l'apoptose, celle-ci présentant une augmentation de son expression lors de stress cellulaire ou dommage de l'ADN (Morrison et al., 2003). L'augmentation de l'expression de p53 entraine l'expression de gènes pro-apoptotiques tel que Bax, ou APAF1 et donc potentialise l'apoptose (Figure 11) (Cregan et al., 1999; Johnson et al., 1999; Xiang et al., 1998). L'activation de p53 peut aussi intervenir lors de processus de la neurogenèse tels que la dérégulation du cycle cellulaire ou de la mitose. En effet, l'inactivation du gène TDP43 impliqué dans la régulation du cycle cellulaire entraine une augmentation de l'apoptose lié à une augmentation de l'expression des gènes p53 et Bax. Dans le même registre, la duplication du centrosome ou une augmentation du temps de mitose lors de la prolifération entraine une activation de p53, Bax et un clivage de la caspase-3 menant à une augmentation de la mort cellulaire et une microcéphalie (Marthiens et al., 2013; Pilaz et al., 2016).

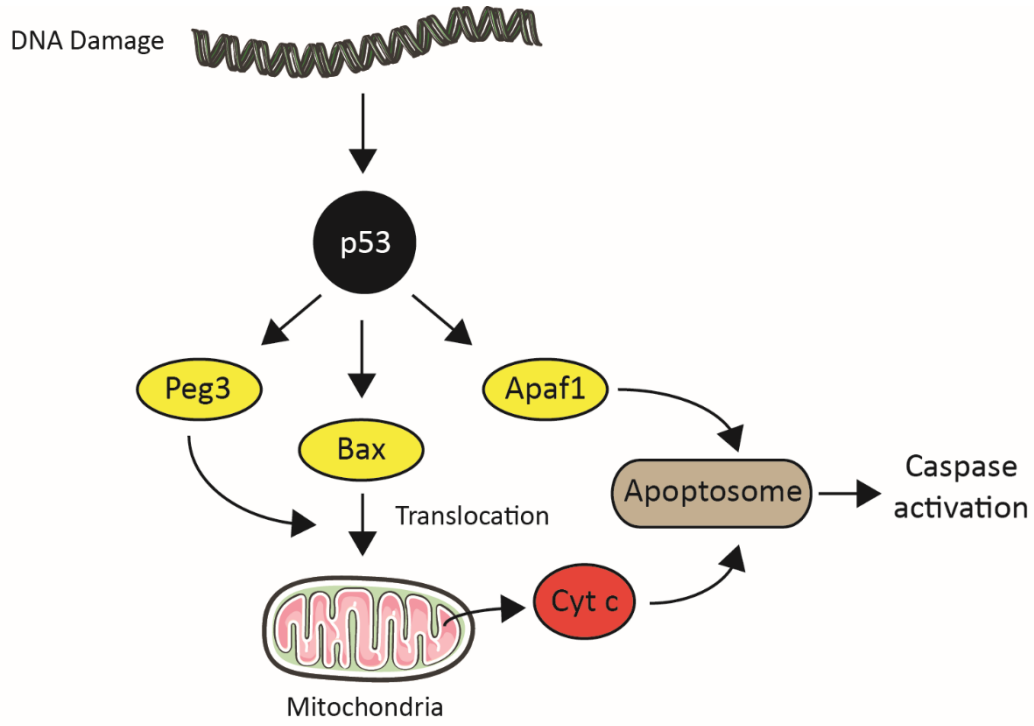


Figure 11: L'activation de la protéine p53 participe à l'induction de l'apoptose dans les neurones.
En réponse à des dommages de l'ADN, la protéine p53 peut être activée et entrainer l'activation de Bax, APAF1 et des caspases entrainant la mort de la cellule par apoptose. (Adapté d'après Morrison et al., 2003)

II. La migration neuronale

1. Généralités

Suite aux divisions neurogéniques, les cellules post-mitotiques doivent migrer vers leur position finale à travers la plaque corticale. Au jour embryonnaire 10, une première vague de migration forme la pré-plaque et sépare la couche composée de cellules en prolifération des cellules post-mitotiques (Figure 12). Aux environs du jour embryonnaire 13 chez la souris, une deuxième vague de migration forme deux couches de cellules dans la pré-plaque, une superficielle appelée zone marginale composée de cellule de Cajal-Retzius (cCR) et une deuxième plus profondément dans la pré-plaque composée de neurones issus des autres types de cellules prolifératives. Ensuite, des vagues de migrations séquentielles forment les 6 couches du cortex dans un ordre « inside-out », c'est-à-dire que les neurones les plus jeunes traversent les couches préalablement formées afin de se placer dans les couches les plus superficielles (Figure 12)(Hatten, 1999). Deux principaux types de migration ont été identifiés dans le développement du néocortex, la migration radiaire des neurones pyramidaux excitateurs de la zone ventriculaire vers la plaque corticale (Rakic, 1972) et la migration tangentielle des interneurones inhibiteurs des éminences ganglionnaires vers la plaque corticale (Ayala et al., 2007; Marín and Rubenstein, 2001).

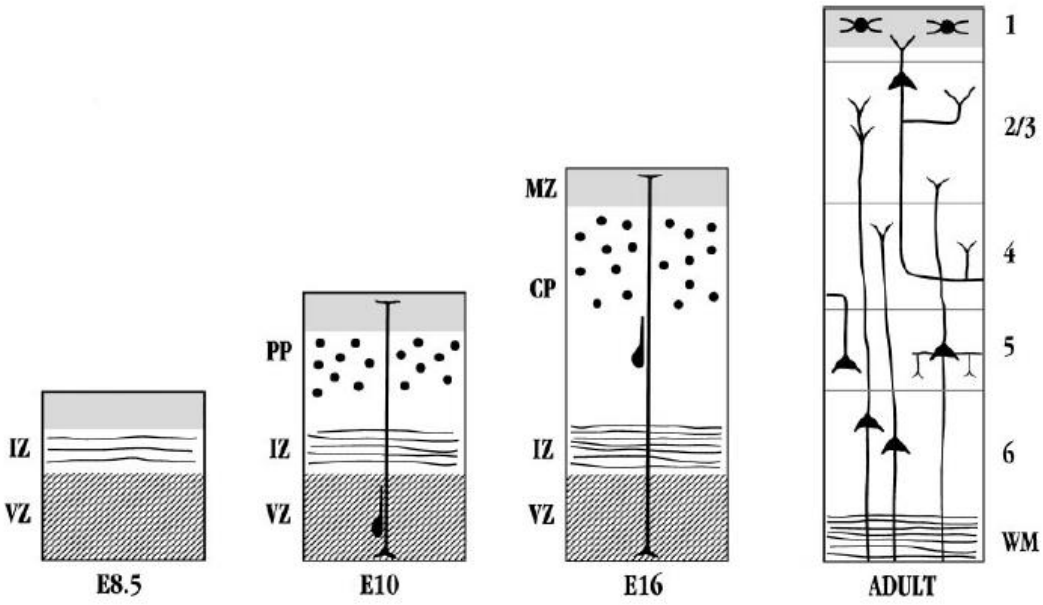


Figure 12: Le développement du cortex cérébral en fonction des différentes vagues de migration neuronale.
A E8,5, avant le début de la neurogenèse le cortex est composé de la VZ et de la zone intermédiaire (IZ). À partir d'E10 la première vague de migration des neurones pyramidaux forme la pré-plaque qui se divise ensuite en plaque cortical (CP) et zone marginale (MZ) à E16. Enfin, les différentes vagues de migration neuronale forment la structure en 6 couches du cortex cérébral observée chez l'adulte. PP : pré-plaque, MZ : zone marginale, WM : matière blanche, 1-6 : Couches 1 à 6 (D'après Hatten et al.,1999).

2. Les cellules de Cajal-Retzius

Les cCR sont les premières cellules neuronales à avoir été identifiées lors du développement cortical par Ramon y Cajal et Gustav Retzius dans les années 1890. Ce type cellulaire a été très peu étudié depuis sa découverte c'est pourquoi son rôle, son origine et même sa morphologie sont très controversés (MarÃ-n-Padilla, 2015). Les cCR sont les premiers neurones glutamatergiques formés lors du développement du cortex, elles sont localisées dans la couche I moléculaire qui est la couche la plus externe du cortex. Les cCR auraient plusieurs origines, certaines cellules seraient originaires du neuroépithélium du néocortex, d'autres migreraient tangentiellement de l'ourlet du cortex médian et d'autres à partir de structures extra-corticales (Bystron et al., 2008). Cependant, il semblerait que ces cellules disparaissent progressivement car elles sont toujours présentes lors de la naissance et quelques mois après mais très peu ont été observées à l'âge adulte (Meyer and González-Gómez, 2018). Les cCR possèdent une morphologie spécifique, avec un corps cellulaire et des dendrites dans la partie la partie supérieure de la couche I, et peuvent être multipolaires, bipolaires ou même avoir une forme en « poire ». De plus, l'axone des cCR traverse horizontalement la couche I mais n'en sort jamais. Ces cellules secrètent en grande quantité de la Reelin (RELN) pendant le développement cortical et c'est la libération de cette protéine qui confèrerait aux cCR une participation à l'organisation de la migration et à la régulation de l'organisation en 6 couches du cortex (MarÃ-n-Padilla, 2015).

3. Les différents modes de migration neuronale

A. La migration radiaire

Environ 80 à 90% des neurones corticaux provenant des zones de prolifération du télencéphale dorsal migrent grâce à la migration radiaire (Ayala et al., 2007). La migration radiaire est divisée en deux types, le premier est la translocation somale. Ce type de migration est indépendant des GR et a lieu dans les étapes les plus précoces du développement cortical entre les jours embryonnaire 12 et 13 chez la souris, lorsque la distance entre le ventricule et la surface piale est faible. Les neurones étendent leurs processus basaux puis par guidage à l'aide de leur cône de croissance ancrent leurs processus à la surface piale. Ce processus se raccourcie ensuite et tire le corps cellulaire permettant à la cellule de se déplacer vers la plaque corticale. (Morest, 1970; Nadarajah et al., 2001).

Le second type de migration radiaire est la locomotion. Ce processus est dépendant des GR et est divisé en 7 phases séquentielles. La première étape consiste en une migration radiaire rapide le long de la GR de la surface du ventricule vers la SVZ appelée phase initiatrice. Dans la SVZ, ces neurones s'arrêtent

environ 24 heures et acquièrent une morphologie multipolaire en étendant et rétractant leurs processus dans toutes les directions. Ensuite, un nombre important de ces neurones entreprend un mouvement rétrograde en direction de la VZ afin d'obtenir leur morphologie bipolaire finale en formant un processus dirigé vers la surface piale appelé « leading process » et un court processus dirigé vers le ventricule appelé « trailing process ». Ces neurones bipolaires réalisent ensuite une phase de locomotion le long des fibres de GR leurs permettant d'atteindre la zone intermédiaire. Lors de cette phase, le « leading process » permet à la cellule d'avancer le long de la fibre de GR tandis que le « trailing process » permet à la cellule de rester fixée à celle-ci. Une fois la zone intermédiaire atteinte, ces cellules entrent dans la plaque corticale en traversant la couche la plus profonde, fixent leur « leading process » à la surface piale afin d'atteindre leur destination. A ce moment, le « trailing process » de ces cellules se rétracte leurs permettant de se détacher des GR tandis que le « leading process » reste attaché à la surface piale afin de pouvoir réaliser une étape de translocation terminale et atteindre leur position finale dans le cortex (Figure 13) (Hippenmeyer, 2014; Nadarajah et al., 2001; Noctor et al., 2004).

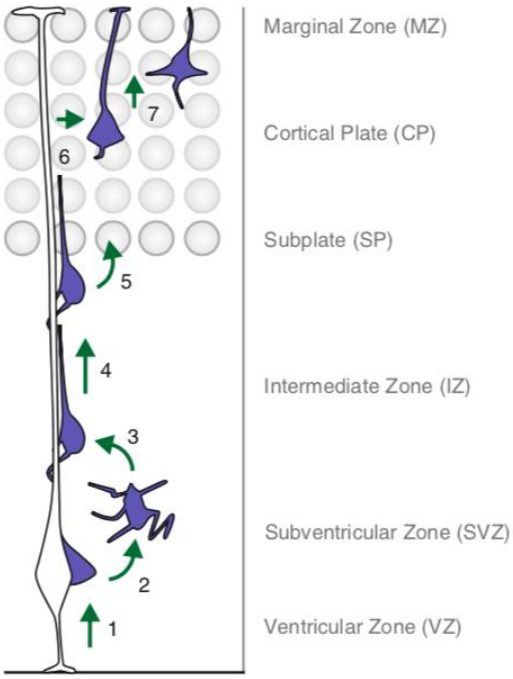


Figure 13: Les différentes étapes séquentielles de la locomotion neuronale.
Schéma illustrant la migration neuronale radiaire en 7 étapes. Le neurone est représenté en bleu et la glie radiaire en blanc. 1 : Migration radiaire rapide ; 2 : Morphologie multipolaire ; 3 : Transition multipolaire-bipolaire ; 4 : Locomotion dans la ZI ; 5 : Entrée dans la plaque corticale ; 6 : Décrochage des GR ; 7 : Translocation terminale. (D'après Hippenmeyer et al.,2014)

B. La migration tangentielle

Pendant de nombreuses années, les études neuro-anatomiques se sont focalisées uniquement sur la migration radiaire des neurones pyramidaux excitateurs, cependant des études ont mis en évidence que certains neurones ne suivent pas un schéma de migration radiaire mais plutôt tangentielle (Nadarajah and Parnavelas, 2002; O'Rourke et al., 1992). D'autres études ont pu ensuite mettre en évidence que les cellules qui suivent ce mode de migration tangentielle, sont des neurones inhibiteurs gabaergiques (Tan et al., 1998, 1995). La majorité des interneurones naissent dans les éminences ganglionnaires situées dans le télencéphale ventral et doivent parcourir une distance bien plus importante que les neurones pyramidaux afin d'atteindre la plaque corticale. Ces interneurones prolifèrent dans deux zones différentes des éminences ganglionnaires, la partie médiane (MEG) et la partie latérale (LEG). Ces cellules suivent le même chemin de migration appelé flux de migration rostral, mais n'ont pas la même destination en fonction de leur lieu de naissance (Kriegstein and Noctor, 2004; Marín and Rubenstein, 2003; Nadarajah and Parnavelas, 2002).

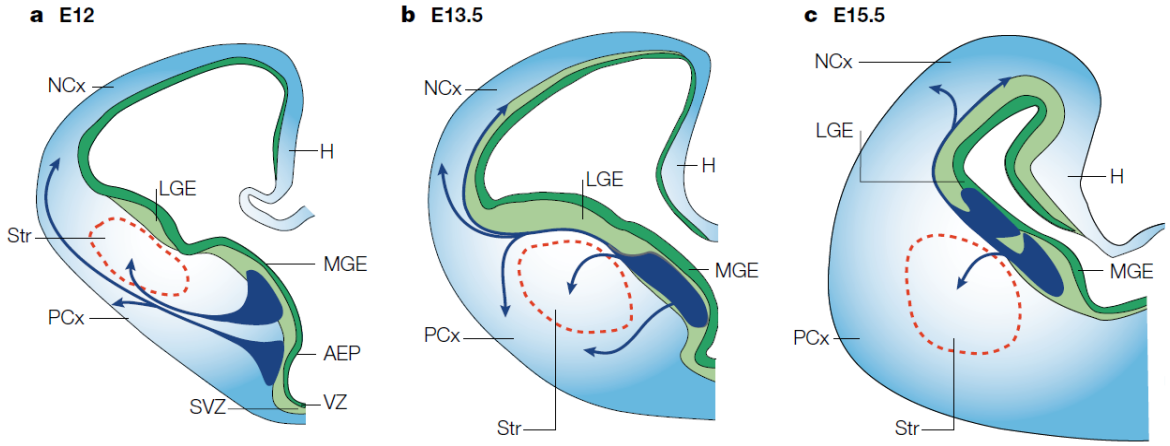


Figure 14: La migration tangentielle des interneurones au cours du neurodévelopement.
A E12, les interneurones provenant des MEG migrent (flèches bleues) vers le cortex (NCx). A E13.5, une certaine partie des interneurones provenant des MGE migrent vers le striatum (Str) permettant son développement. A E15.5, l'ensemble des interneurones provenant des MGE et LGE migrent vers le cortex. VZ : zone ventriculaire, zone sous ventriculaire,H : hippocampe, PCx : paléocortex (Marín et al., 2001)

Au jour embryonnaire 11.5, une première vague de migration tangentielle a lieu permettant aux interneurones des MEG de peupler la zone marginale et la pré-plaque. Une seconde phase, entre les jours 12.5 et 14.5, permet aux interneurones des MEG de se positionner dans la SVZ et dans la partie basse de la zone intermédiaire (ZI), tandis que ceux provenant des LEG migrent plus profondément vers les bulbes olfactifs. De plus, une partie des interneurones migre directement dans le striatum, permettant à celui-ci de se développer. Lors de la troisième et dernière phase de migration entre les

jours embryonnaires 14.5 et 16.5, les interneurones provenant de la MEG et de la LEG migrent ensemble vers la plaque corticale (Figure 14) (Anderson et al., 2001; Marín and Rubenstein, 2001; Tan et al., 1998, 1995). Les interneurones réalisent une migration indépendante des fibres de glie radiaire et utilisent la nucléokinèse. C'est-à-dire qu'ils réalisent une série de translocation somale à l'image des neurones pyramidaux lors des premières phases de migration (Valiente and Marín, 2010).

Lors de l'ensemble de ces phases de migration tangentielle, les interneurones migrent toujours le long des ventricules, dans la SVZ ou dans la ZI. Il semblerait que ce plan de migration permette aux interneurones de pouvoir se coordonner avec la migration radiaire des neurones pyramidaux afin de se placer dans la bonne couche du cortex. Cette coordination se fait lors de la longue phase de transition multipolaire-bipolaire durant 24h chez les neurones pyramidaux (Figure 15) (Kriegstein and Noctor, 2004; Nadarajah et al., 2002). De plus, la migration tangentielle semble aussi avoir un effet sur la prolifération des neurones pyramidaux dans la VZ comme l'a montré l'étude chez la souris ayant une inactivation du gène *CCP1* qui dérégule le flux de migration des interneurones dans la plaque corticale dérégulant indirectement la prolifération des neurones pyramidaux (Silva et al., 2018).

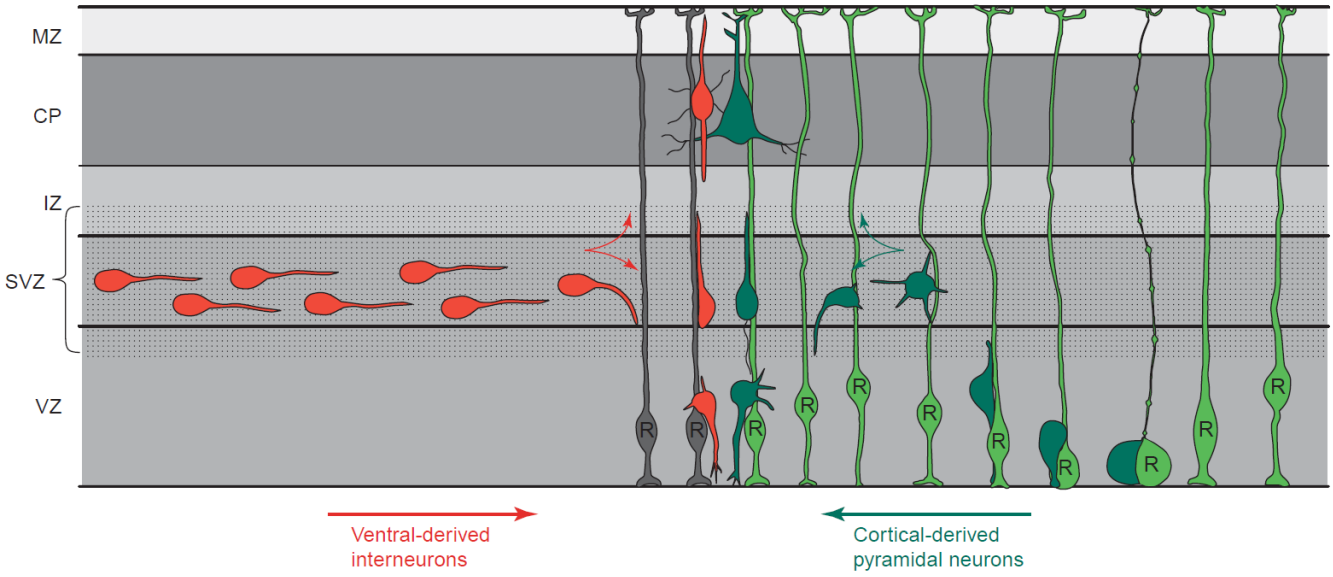


Figure 15: La coordination entre migration radiaire et tangentielle permet un positionnement correct dans la plaque corticale.
Lors des phases de migration radiaire et tangentielle, les interneurones se synchronisent avec les neurones pyramidaux dans la VZ permettant ensuite une migration radiaire des deux types cellulaire et un positionnement correct des interneurones dans les couches du cortex. MZ : zone marginale, CP : plaque corticale, IZ : zone intermédiaire, SVZ : zone sous ventriculaire, VZ : zone ventriculaire (D'après Kriegstein and Noctor, 2004).

4. L'organisation du cortex en 6 couches et l'influence de la voie de signalisation Reelin

Lors de la migration radiaire les neurones viennent se placer afin de former les couches II à VI du néocortex. Cette organisation se réalise selon un ordre « inside-out », c'est-à-dire que les neurones nouvellement formés doivent traverser les couches déjà établies pour aller se placer dans la couche la plus superficielle (ANGEVINE and SIDMAN, 1961; Rakic, 1974). Les neurones de chaque couche prolifèrent et migrent en même temps, cependant il semblerait que la couche de destination soit déterminée pour les neurones très tôt lors des étapes de prolifération des neurones et le moment de naissance des neurones (Figure 16) (Molyneaux et al., 2007).

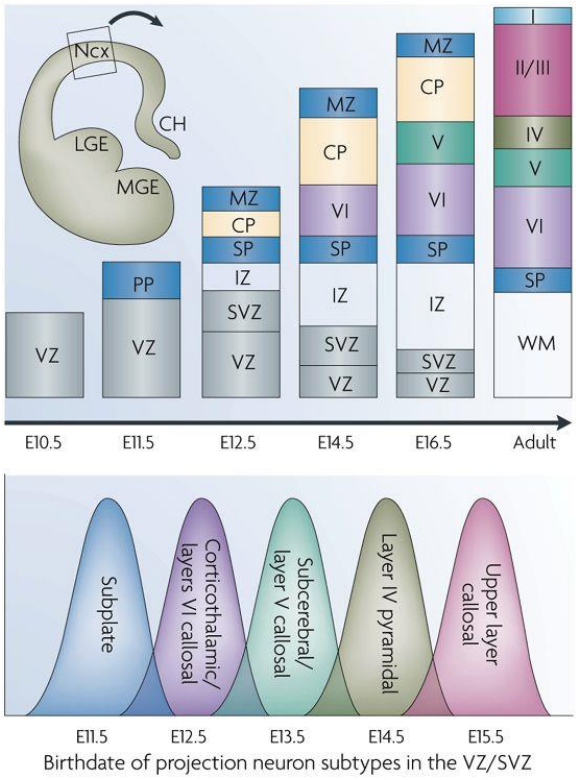


Figure 16: Organisation séquentielle du cortex en 6 couches.
En fonction de leur moment de naissance, les neurones ne seront pas situés dans la même couche du cortex et n'auront pas la même destinée cellulaire. Les neurones nés à E12,5 seront des neurones callosaux ou cortico-thalamiques situés dans les couches profondes (V et VI), ceux nés à E14,5 seront pyramidaux situé dans la couche IV tandis que ceux nés à partir de E15,5 seront destinés aux couches superficielles (II et III) et seront uniquement callosaux. VZ : zone ventriculaire, PP : pré-plaque, SVZ : zone sous ventriculaire, IZ : zone intermédiaire, SP : sous-plaque, CP : plaque corticale, MZ : zone marginale, WM : matière blanche, I-VI : couches I à VI, Ncx : néocortex, LGE : éminence ganglionnaire latérale, MGE : éminence ganglionnaire médiane, Ch : ourlet cortical (D'après Molyneaux et al., 2007).

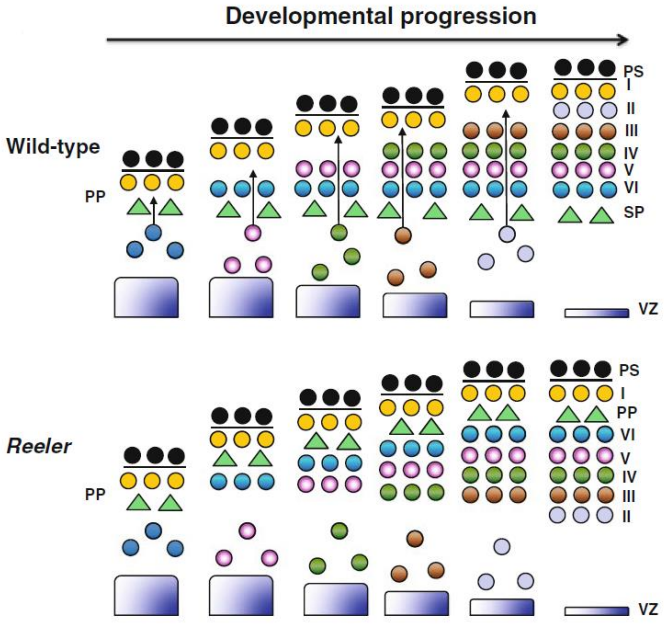


Figure 17: Les souris Reeler présentent une organisation des couches corticales inversée.
Lors de la progression du développement cortical, les neurones en migration se placent selon un ordre « inside-out » ce qui permet une organisation correcte du cortex avec les couches I à VI positionnées des couches les plus superficielles aux plus profondes. Chez la souris Reeler, présentant une mutation dans le gène codant pour la RELN, l'organisation des couches est inversée permettant de démontrer l'influence de la protéine dans l'organisation corticale. VZ : zone ventriculaire, SP : sous plaque, I-VI : couches I à VI, PS : surface piale (D'après Gao et al., 2013).

Cependant, l'implication de la voie de signalisation RELN dans l'organisation du cortex a pu être démontrée grâce aux souris *Reeler.* En effet, ces souris ayant de manière spontanée une mutation faux-sens dans le gène codant pour la RELN, présentent de nombreux phénotypes de désorganisation des couches du cortex. Des études de marquage cellulaire en fonction du moment de naissance de celles-ci ont pu mettre en évidence que l'organisation du cortex de ces souris est totalement inversée. (Figure 17) (Boyle et al., 2011; Caviness and Sidman, 1973; D'Arcangelo et al., 1995; Ogawa et al., 1995).

La RELN est une protéine produite par les cCR au niveau de la couche I du cortex tout au long du développement cortical. Cette protéine effectue son action à travers sa fixation aux récepteurs VLDLR et ApoER2. Cette fixation entraine l'activation de DAB1 phosphorylant et activant de nombreuses cibles et cascades de signalisation telles que la voie PI3K/Akt, la protéine LIS1 ayant un effet sur la dynamique des microtubules, GM130 ayant un effet sur l'appareil de Golgi, cdc42/Rap1/cofilin pour le cytosquelette d'actine et les N-cadherin et le complexe rbx2/Cul5 pour le protéasome (Gao and Godbout, 2013). A travers son impact sur ces nombreux processus cellulaires, la RELN participe à de nombreuses étapes du neuro-développement. Son impact sur les microtubules, le cytosquelette d'actine et les N-cadherin permet à la RELN d'avoir un rôle dans la transition multipolaire/bipolaire (Jossin and Cooper, 2011), la migration radiaire dans la ZI (Chai et al., 2016) et la translocation terminale des neurones dans la plaque corticale (Franco et al., 2011). A travers son effet sur le protéasome, elle permet la dégradation de DAB1 lorsque les neurones sont correctement positionnés dans la plaque corticale afin d'empêcher les neurones de continuer à migrer (Feng et al., 2007; Simó and Cooper, 2013; Simó et al., 2010). Enfin, son effet sur l'appareil de Golgi à travers la protéine GM130, permet à la RELN de réguler la polarisation neuronale (Figure 18) (Matsuki et al., 2010)

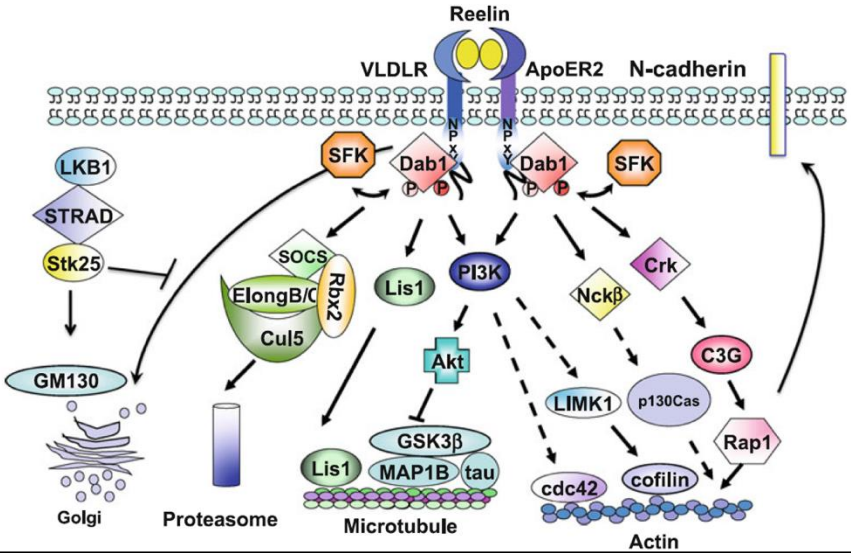


Figure 18: Les nombreuses voies de signalisation régulées par la protéine Reelin.
Après fixation sur les récepteurs VLDLR et ApoER2, la RELN active la phosphorylation et l'activation par DAB1 de nombreuses voies de signalisation cellulaire : la voie PI3K/Akt et LIS1 agissant sur les microtubules, cdc42/Rap1/cofilin sur le cytosquelette d'actine et les N-cadherines, GM130 sur l'appareil de Golgi et Rbx2/Cul5 sur le protéasome. (D'après Gao et Godbout, 2013)

5. La migration neuronale dans l'hippocampe

L'hippocampe est localisé dans la partie médio-temporale du néocortex. Cette structure est essentielle pour les fonctions cognitives d'apprentissage et de mémoire. L'hippocampe présente une région en forme de V, appelée gyrus denté et est composé d'une large région de neurones pyramidaux appelée corne d'Ammon (CA) divisée en trois sous-régions : CA1, CA2 et CA3 elles-mêmes divisées en 3 couches : Stratum pyramidale, stratum radiatum et stratum lacunosum-moleculare (Figure 19) (Li and Pleasure, 2014).

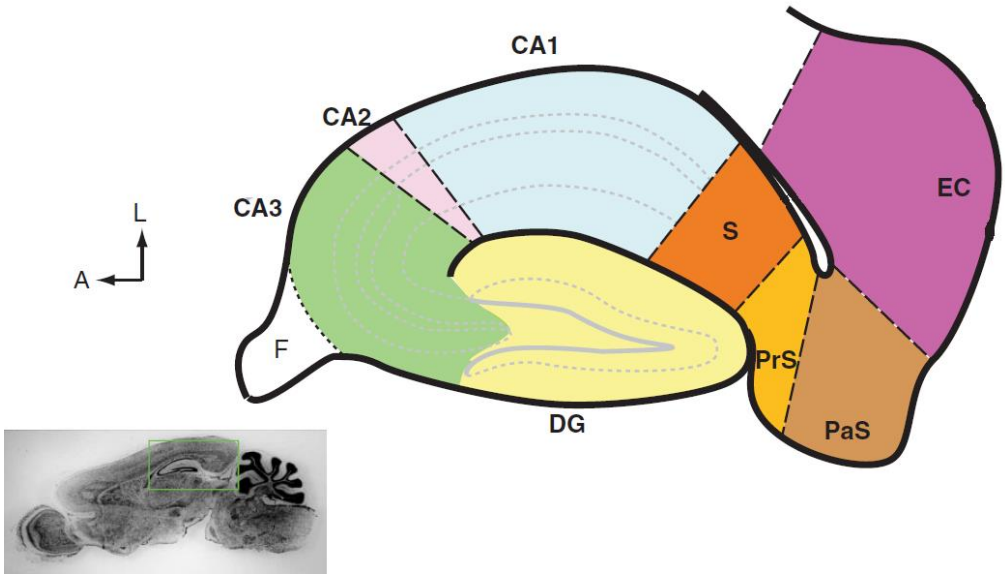


Figure 19: Les différentes structures de l'hippocampe.
L'hippocampe présente une forme repliée composée du gyrus denté (DG) et d'une structure en plusieurs couches de neurones pyramidaux appelée corne d'Ammon et divisée en 3 sous-parties (CA1, CA2 et CA3) (S) : subiculum, (PrS) : presubiculum, (PaS) : parasubiculum, (EC) : cortex entorhinal, (F) : fimbria (adapté d'après Li and Pleasure, 2014).

Le développement de l'hippocampe a été très largement étudié et présente des similarités avec le néocortex. La prolifération des neurones pyramidaux de l'hippocampe a lieu dans le neuroépithélium ammonique au-dessus des couches CA1, CA2, CA3 entre les jours embryonnaires 12 et 18 chez la souris. Cependant, leur développement diffère en fonction de leur couche de destination, CA1 ou CA3. En effet, pour le CA1, ces neurones présentent une morphologie multipolaire dans la VZ plus ou moins longue en fonction de leur moment de naissance. Les neurones nés entre E12 et E13 restent multipolaires une journée avant de migrer tandis que ceux entre E14 et E16 restent multipolaires entre 3 et 4 jours dans la SVZ (Hayashi et al., 2015; Kitazawa et al., 2014). Ensuite, comme pour le néocortex, ces neurones initient une migration radiaire le long de la fibre de GR. Cependant, les neurones hippocampiques réalisent une migration particulière appelée « escalade » (climbing). Lors de cette

migration les neurones présentent une morphologie multipolaire composée de multiples prolongements. Grâce à ces prolongements, le neurone peut entrer en contact avec plusieurs fibres de glie radiaire et par raccourcissement ou élongation de ses prolongements, peut se hisser de fibre en fibre, vers les couches de neurones pyramidaux dans un ordre « inside-out ». Lors de ce mode de migration, le corps cellulaire effectue des mouvements de translocation entre chaque fibre de GR à l'image de l'unique translocation terminale utilisée par les neurones pyramidaux dans le néocortex (Figure 20) (Kitazawa et al., 2014).

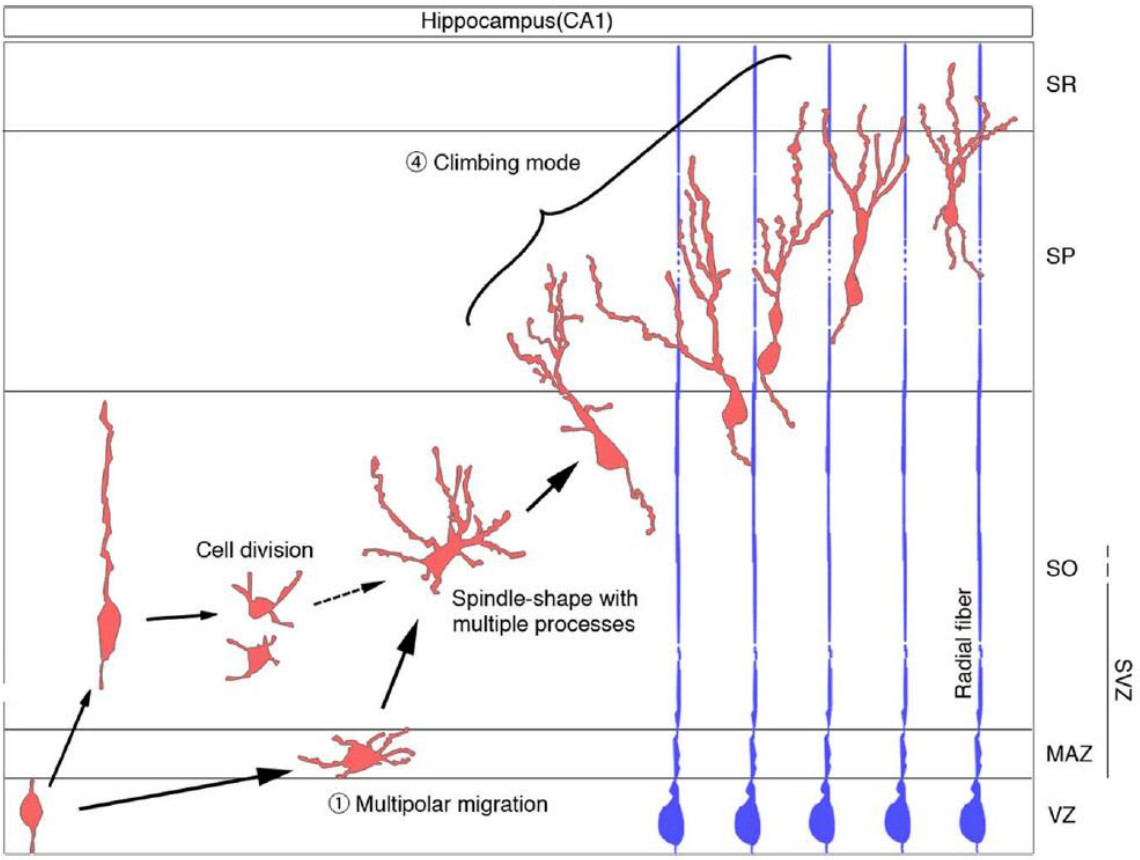


Figure 20: La migration en « escalade » des neurones pyramidaux hippocampiques.
Les neurones pyramidaux hippocampiques effectuent une migration radiaire multipolaire en « escalade » entre les fibres de GR. En effet, ils étendent et raccourcissent leurs prolongements afin d'effectuer une translocation entre chaque fibre de GR et atteindre finalement les couches de neurones pyramidaux. VZ : zone ventriculaire, SVZ : zone sous-ventriculaire, MAZ : multipolar cella cumulation zone, SO : stratum oriens, SP : stratum pyramidal, SR : stratum radiatum (D'après Kitazawa et al., 2014).

Le développement de CA3 est différent de celui de CA1 qui présente un développement plus précoce. Comme pour le CA1, les neurones formés présentent une morphologie multipolaire dans la SVZ mais restent sous cette forme un jour de plus que les neurones de CA1. De plus, les neurones de CA3 présentent le même mode de migration multipolaire en « escalade » mais les neurones ne se placent pas selon un ordre inside-out mais selon un gradient neurogénique, c'est-à-dire que les neurones les

plus vieux se placent vers le gyrus denté tandis que les plus jeunes se placent vers le CA2 (Bartlett et al., 2015; Bayer, 1980). En ce qui concerne les interneurones, la migration est aussi tangentielle et les cellules peuplant l'hippocampe sont issues des mêmes structures et suivent les mêmes voies de migration que pour le néocortex (Li and Pleasure, 2014).

III. La différenciation neuronale

A l'issue de la migration, les neurones pyramidaux et les interneurones localisés dans leur couche finale acquièrent leurs propriétés telles que leur morphologie fonctionnelle ou l'expression de facteurs de transcription spécifiques pour réaliser leurs fonctions. Les neurones pyramidaux aussi appelé neurones de projection envoient leur axone à travers la matière blanche afin de contacter des cibles plus ou moins lointaines telles que des zones dans leur propre hémisphère, dans l'autre hémisphère du cerveau ou même afin de contacter les muscles. Lors de ces processus de croissance axonale, de nombreux processus de guidage axonal sont nécessaire afin d'assurer un contact avec la bonne cible.

1. La spécification neuronale

Les neurones de projection, en fonction de leur position à travers les couches du cortex et leur spécification, projettent leur axone vers des cibles différentes et sont divisés en plusieurs sous types :

- Les neurones commissuraux projetant leur axone vers l'autre hémisphère à travers le corps calleux ou la commissure antérieur (Figure 21 a).
- Les neurones associatifs réalisant des connexions intra-hémisphériques à courte ou longue distance (Figure 21 b).
- Les neurones corticofuges qui projettent leur axone en dehors du cortex vers des structures subcorticales telles que le thalamus (cortico-thalamiques) ou la moelle épinière (cortico-spinaux) (Figure 21 c) (Greig et al., 2013).

De plus, ces neurones participent à des processus différents en fonction de leur localisation dans les différents lobes et aires du cortex. Par exemple, les neurones localisés dans l'aire visuelle primaire dans le lobe occipital participent à la perception visuelle tandis que les neurones localisés dans le cortex moteur primaire participent à l'exécution de mouvements volontaires (Adnani et al., 2018).

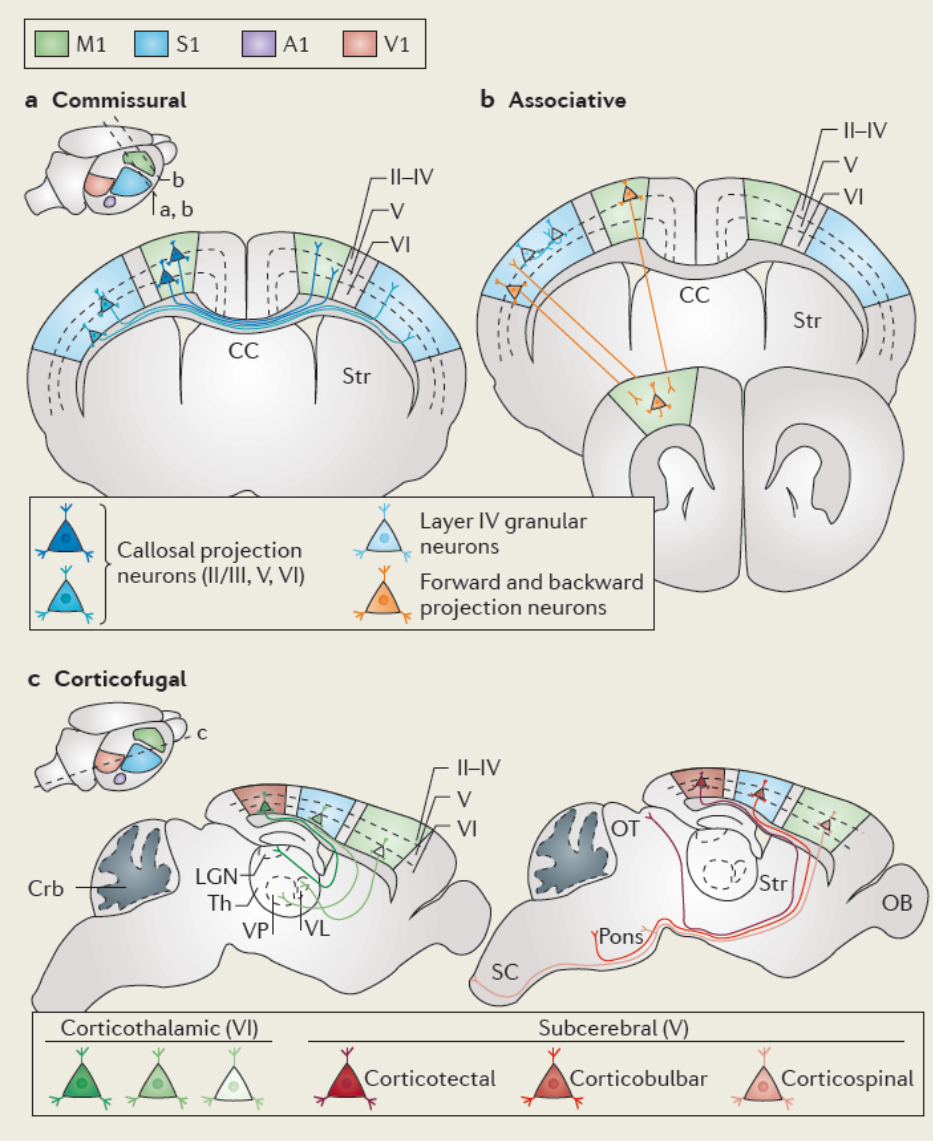


Figure 21: Les différents types de projections axonales provenant du cortex.

(a) Les neurones commissuraux projettent leur axone à travers le corps calleux (CC) vers les différentes couches du cortex controlatéral

(b) Les neurones associatifs réalisent des connexions intracorticales à courte ou longue distance

(c) Les neurones corticofuges projettent leur axone en dehors du cortex vers différentes cibles telles que le thalamus (corticothalamique) ou la moelle épinière (corticospinal)

M1 : cortex moteur primaire, S1 : cortex somatosensorielle primaire, A1 : cortex auditif primaire, V1 : cortex visuel primaire, CC : corps calleux, Str : striatum, Crb : cervelet, OB : bulbe olfactif, SC : moelle épinière, OT : tectum optique, LGN : corps géniculé latéral, Th : thalamus, VP : noyau antérieur postérieur ventral, VL : noyau antérieur ventrolatéral (D'après Greig et al., 2013)

Ces différents types de neurones de projections acquièrent leur spécification à travers plusieurs mécanismes de régulation lors de la neurogenèse et de la différentiation. Le premier mécanisme est dépendant du moment de naissance du neurone lors de la prolifération. En effet, la génération séquentielle des neurones et les différentes séries de divisions entrainent une perte de la capacité de différentiation des neurones lors de la progression de la neurogenèse. Les progéniteurs en division lors de la phase précoce de prolifération sont multipotents et peuvent donner naissance à une grande diversité de sous-types de neurones destinés aux couches les plus profondes tandis que les

progéniteurs en prolifération lors de phases tardives de la prolifération perdent leur capacité multipotente au fil des divisions et donnent ainsi une diversité de cellules moins importante destinée aux couches les plus superficielles (Frantz and McConnell, 1996; McConnell, 1988; McConnell and Kaznowski, 1991; Molyneaux et al., 2007).

Le deuxième mécanisme est l'expression de facteurs de transcription. La majorité des facteurs de transcription spécifiques à chaque couche du cortex est exprimée très largement par les cellules post-mitotiques mais pas par les progéniteurs, ce qui laisse sous-entendre que le processus de détermination lié à ce mécanisme est uniquement post-mitotique. L'étude de modèle souris n'exprimant plus ces différents facteurs de transcription a permis de comprendre ce mécanisme et de mettre en évidence un circuit de dérépression. En effet, l'étude d'une souris n'exprimant plus TBR1, le marqueur de la couche VI, a montré une réduction de la couche VI tandis que des neurones positifs pour les marqueurs CTIP2 et FEZF2 de la couche V se placent de manière ectopique dans la couche VI (Bedogni et al., 2010; Han et al., 2011; Hevner et al., 2001; McKenna et al., 2011). De la même manière, une souris exprimant une mutation dans FEZF2, marqueur de la couche V, voit son expression de CTIP2 dans la couche V diminuer et la présence de neurones ectopiques positifs pour le marqueur des couches superficielles II/III/IV SATB2 projetant anormalement à travers le corps calleux (Chen et al., 2005, 2008; Molyneaux et al., 2005). Enfin, une souris n'exprimant plus SATB2, marqueur des couches superficielles présente des neurones ectopiques de la couche V dans les couches superficielles (Alcamo et al., 2008; Britanova et al., 2008). L'étude de l'ensemble de ces modèles animaux semble tendre vers un modèle de répression/dérépression entre tous les facteurs de transcription de chaque couches permettant au final aux neurones de pouvoir se placer spécifiquement dans les différentes couches du cortex (Figure 22) (Adnani et al., 2018)

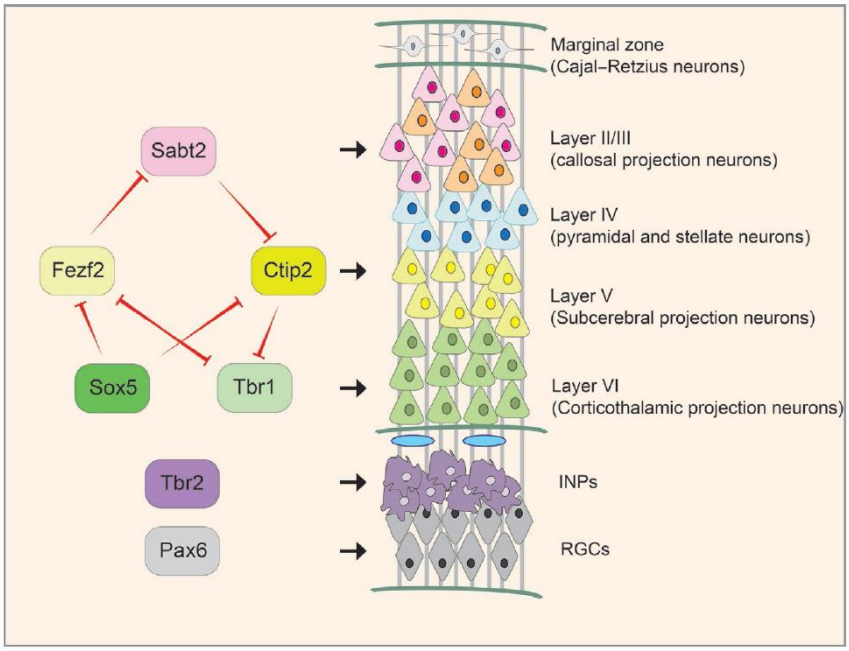


Figure 22: Le modèle d'organisation des sous types neuronaux par répression/dérépression de facteurs de transcription. L'ensemble des facteurs de transcription spécifiques de chaque couche du cortex se réprimant entre eux permet de réguler la spécification des sous-types neuronaux à travers le cortex. INP : progéniteurs neuronaux intermédiaire, RGC : cellules de la glie radiaire. (D'après Adnani et al., 2018)

2. Le développement de la polarisation neuronale.

Comme vu précédemment, lors du développement cortical, les neurones réalisent deux étapes spécifiques de polarisation, lors de la prolifération lorsque les GR présentent une polarisation apico-basale et lors de la migration lorsque les neurones deviennent bipolaires avec un « leading process » vers la membrane basale et un « trailing process » vers la membrane apicale. Lors des étapes de différentiation, les différents compartiments neuronaux dérivent de ces étapes de polarisation, le « leading process » se différencie en dendrite tandis que la « trailing process » devient un axone (Figure 23) (Barnes and Polleux, 2009).

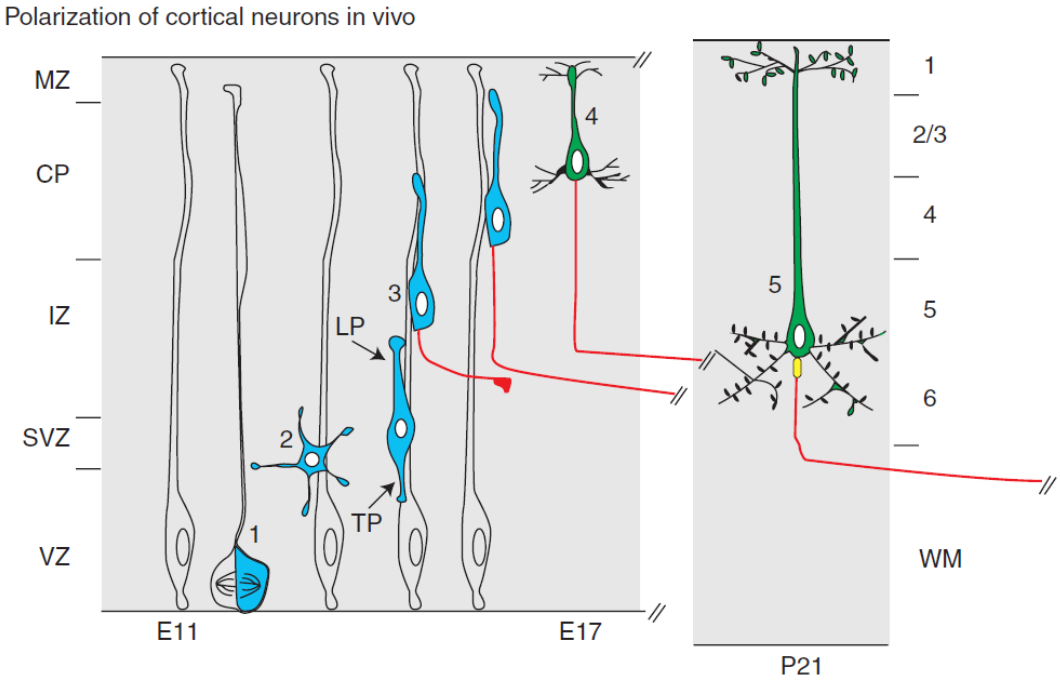


Figure 23: La polarisation axono-dendritique lors du développement cortical.
Lors du développement cortical les neurones deviennent bipolaires lors de la migration avec un « leading process » (LP) et un « trailing process » (TP). Lors de la différentiation, le compartiment dendritique se développe à partir du LP tandis que l'axone dérive du TP. MZ : zone marginale, CP : plaque corticale, IZ : zone intermédiaire, SVZ : zone sous-ventriculaire, VZ : zone ventriculaire, WM : matière blanche. (D'après Polleux et al., 2010)

De plus, différentes voies de signalisation interviennent dans l'induction de cette polarisation. En effet, l'étude par surexpression d'une sous unité catalytique de la protéine PI3-Kinase (PI3K) a mis en évidence la formation de multiples axones suggérant que PI3K participe à la spécification des axones à travers la voie AKT/GSK3β (Yoshimura et al., 2006). PI3K active AKT et il a pu être démontré que la surexpression d'AKT suffit à la formation d'un axone alors que son inactivation par ARN interférent mène à l'absence d'axone mais n'impacte pas le développement des dendrites (Guo et al., 2007). Au contraire GSK3β, cible de AKT, est un régulateur négatif de l'axonogenèse. En effet, l'inhibition de

GSK3β cause la formation de multiples axones et peut mener à la conversion des dendrites en axones. Cette étude a démontré que les dendrites gardent un potentiel de conversion en axone mais que l'activité de GSK3β permet de bloquer ce processus (Jiang et al., 2005; Yoshimura et al., 2006). En conclusion de l'ensemble de ces études, la voie PI3K/AKT s'active dans l'axone en développement inhibant GSK3β afin de permettre son développement normal, tandis que dans les dendrites la voie PI3K/AKT est réprimée permettant l'activation de GSK3β bloquant la conversion des dendrites en axones permettant le maintien de la polarisation neuronale (Barnes and Polleux, 2009).

3. La régulation du guidage axonal

Lors du développement axonal de nombreux processus de guidage entrent en jeu afin que les axones puissent former des connexions synaptiques avec leur cible. Lors de ces processus, des signaux extracellulaires attractifs et répulsifs à distance mais aussi de contact permettent d'influencer la direction du cône de croissance de l'axone et donc de le guider (Russell and Bashaw, 2018; Seeger and Beattie, 1999). Des études *in-vitro* sur des neurones en culture, ont permis de mettre en évidence des molécules chemoattractantes telles que les cadhérines sécrétées par des cibles intermédiaires ou la cible finale des axones permettant de le guider (Gundersen et al., 1979; Heffner et al., 1990). Des molécules chemorépulsives telles que les sémaphorines ont pu aussi être mises en évidence et sont secrétées par des tissus où l'axone ne doit pas pousser (Figure 24) (Colamarino and Tessier-Lavigne, 1995). En réponse à ces molécules répulsives, le cône de croissance peut avoir différentes réactions allant d'un changement simple de direction à un arrêt de la croissance ou même dans certains cas une rétractation. Cette attraction/répulsion n'est pas dépendante uniquement des molécules sécrétées mais aussi des récepteurs sur lesquels elles se fixent. Par exemple, les netrines ont un rôle attracteur et répulsif et ce rôle change en fonction du récepteur se liant avec elles (Seeger and Beattie, 1999).

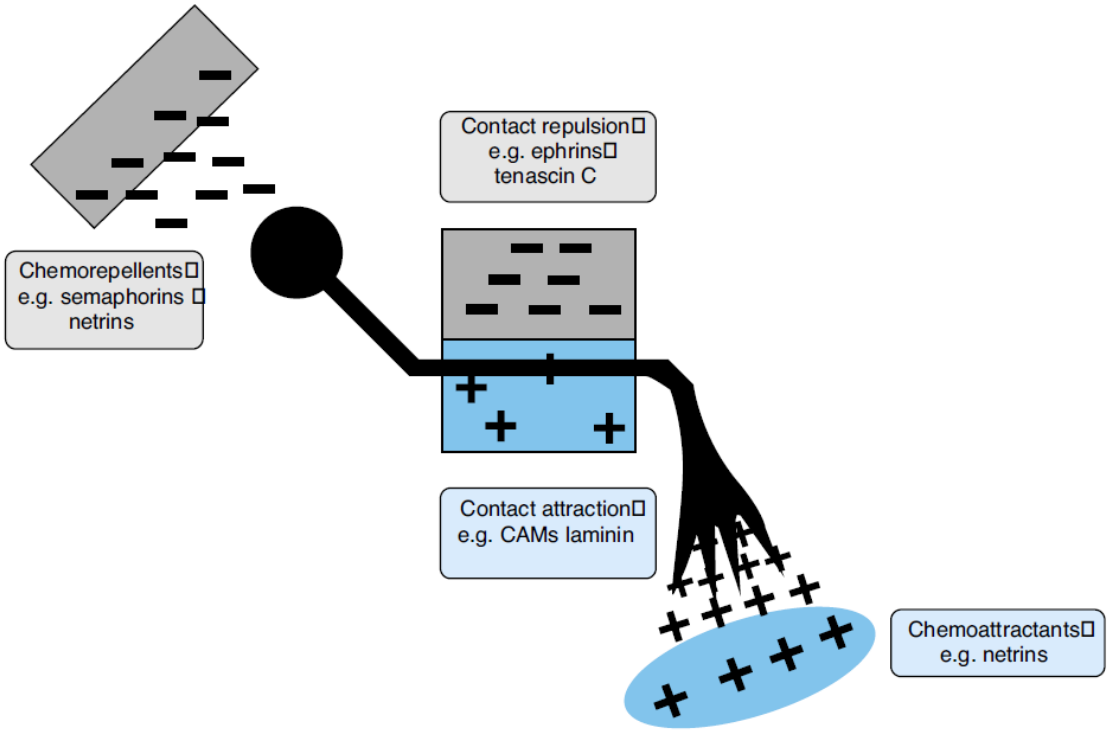


Figure 24: Les différents types de guidage axonaux par attraction/répulsion.
La chemorépulsion ou chemoattraction par contact ou à distance permet de guider le cône de croissance de l'axone et d'assurer un contact correct du neurone avec sa cible (D'après Tear et al., 1998)

Le cytosquelette de microtubules

I. La dynamique des microtubules

1. La structure des microtubules

Les microtubules (MT) sont des filaments composant le cytosquelette de toutes les cellules eucaryotes. Ils sont impliqués avec d'autres types de filaments tels que l'actine dans de nombreux processus comme le transport intracellulaire, la division cellulaire et la motilité cellulaire (Akhmanova and Steinmetz, 2015; Nogales, 2000). Ils présentent une structure en protofilaments composés d'hétérodimère d'α- et de β-tubuline. Un MT présente une structure en cylindre de 24 nm de diamètre composé de 13 protofilaments parallèles et polarisés avec une extrémité (+) et une extrémité (-) (Figure 25). Au sein de ces protofilaments, les dimères de tubuline ont une organisation bien spécifique qui crée cette polarisation avec des monomères d'α-tubulines dirigés vers l'extrémité (-) tandis que les monomères de β-tubulines sont dirigés vers l'extrémité (+). Les MT sont nucléés à leur extrémité (-) et font intervenir un troisième type de tubuline, la γ-tubuline servant de support à l'assemblage des protofilaments. Une fois formé les MT sont très dynamiques et les dimères de tubuline s'assemblent en protofilaments lors du processus de polymérisation ou se désassemblent lors du processus de dépolymérisation à leur extrémité (+) (Conde and Cáceres, 2009; Desai and Mitchison, 1997; Nogales, 2000; Nogales et al., 1998).

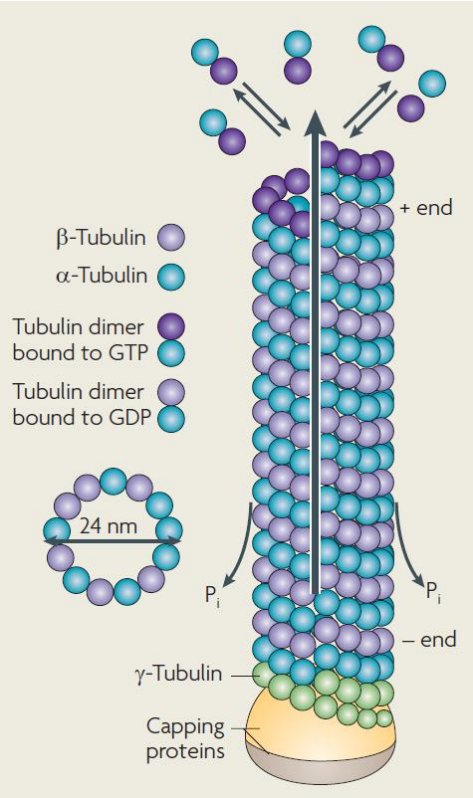


Figure 25: La structure des microtubules en protofilaments.
Les microtubules sont composés de protofilaments d'hétérodimères d'α- et de β-tubuline structurés en forme de cylindre de 24 nm de diamètre. Ils reposent sur le centrosome où la γ-tubuline leurs sert de socle afin de se nucléer (D'après Conde et al., 2009).

5 isoformes d'α-tubuline et 8 isoformes de β-tubuline ont été identifiées chez les mammifères. Ces isoformes se placent librement dans les MT formant une mosaïque de dimères hétérogènes. L'incorporation de ces différentes isoformes dans les MT semble avoir un rôle dans la structure et la dynamique des microtubules à travers une modification des propriétés mécaniques des protofilaments et à travers des modifications de l'interaction entre les protéines associés aux MT (MAP) et les MT (Gadadhar et al., 2017; Janke, 2014). De plus il semblerait que la composition des MT varie en fonction du type cellulaire, en effet des études ont permis de démontrer un enrichissement de β-tubuline dans les MT des neurones mais aussi des axonèmes tel que ceux composant la structure du cil primaire (Denoulet et al., 1986; Joshi and Cleveland, 1989; Raff et al., 2008; Renthal et al., 1993; Roll-Mecak, 2019).

2. La nucléation des microtubules

La nucléation des MT est réalisée aux niveaux des « microtubules-organizing-center » (MTOC) auxquelles ils sont fixés par leur extrémité (-), le principal MTOC des cellules étant le centrosome. Ce processus implique une sous-unité de tubuline très proche des sous unité α et β, la γ-tubuline. La γ-tubuline est composée de deux sous-unités (TUBG1 et TUBG2) et peut s'oligomériser en hétéro-oligomère avec deux protéines du gamma tubulin complex (GCP) afin de former un gamma-tubulin small complex (γTuSC). Ces γTuSC s'assemblent à leur tour en forme de cylindre afin de former le gamma-tubulin ring complex (γTuRC) servant de modèle à l'assemblage des dimères d'α- et β-tubuline en protofilaments afin de former les MT (Figure 26) (Raynaud-Messina and Merdes, 2007; Roostalu and Surrey, 2017; Sulimenko et al., 2017; Tovey and Conduit, 2018).

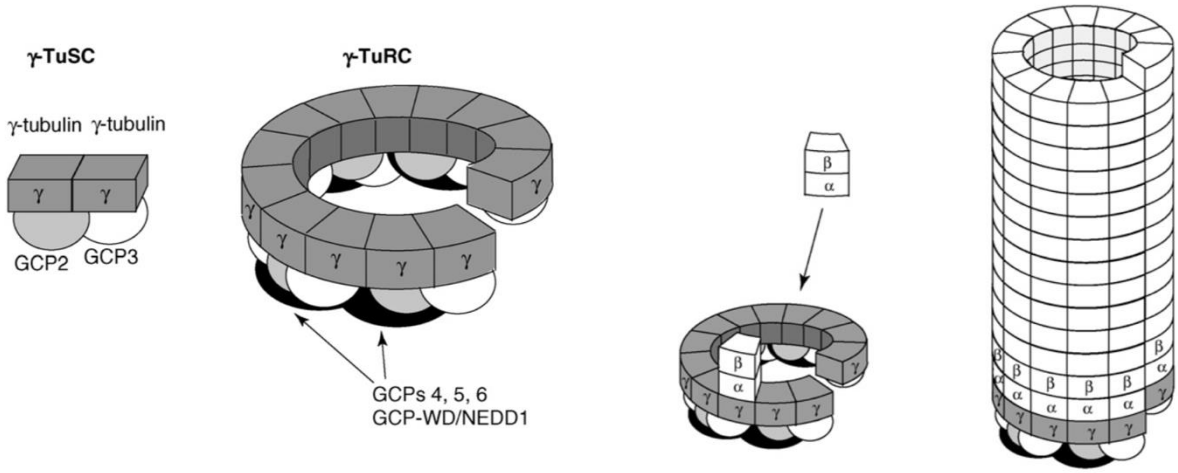


Figure 26: Les complexes de γ-tubuline, un socle et un modèle pour la nucléation des microtubules. Les γ-tubulines sont capables de s'oligomériser avec les GCP afin de former les γTuSC qui vont eux-mêmes s'assembler en forme de cylindre afin de former les γTuRC servant ensuite de support et de modèle pour la nucléation des dimères d' α et β tubuline en MT. (D'après Raynaud-Messina et al., 2007)

Cependant il semblerait que les MT ne nécessitent pas forcément les γTuRC pour se développer. En effet, des études dans des neurones n'exprimant plus la γ-tubuline ont permis de mettre en évidence que ces cellules présentent malgré tout une croissance des MT au niveau de leur extrémité (+) (Yau et al., 2014).

3. La dynamique de polymérisation-dépolymérisation des microtubules

Les MT sont en perpétuelle construction-déconstruction faisant intervenir deux processus à son extrémité (+), la polymérisation et la dépolymérisation. Ces deux processus sont hautement liés à la courbure des MT à leur extrémité positive. En effet des études par microscopie électronique ont permis de mettre en évidence cette courbure et de montrer que celle-ci est bien plus importante lorsque les MT sont en train de se dépolymériser (Mandelkow et al., 1991). Cette courbure est liée à la liaison de la β-tubuline au GTP ou GDP. En effet, la β-tubuline est capable d'hydrolyser le GTP en GDP et donc de pouvoir influencer la courbure des dimères de tubuline. Dans un état lié au GTP, les dimères d'α- et de β-tubuline sont dans une conformation droite augmentant la stabilité du protofilament et formant une extrémité (+) enrichie en GTP lors de la polymérisation tandis que dans un état lié au GDP la conformation devient courbée menant à une instabilité du protofilament (Melki et al., 1989). C'est donc ce mécanisme qui explique la transition entre la croissance rapide des MT appelée sauvetage (Rescue) et le désassemblage rapide du MT appelé catastrophe (Akhmanova and Steinmetz, 2015; Brouhard and Rice, 2014). Les mécanismes sous tendant ces processus de sauvetage et de catastrophe sont très peu compris mais il semblerait que des ilots de GTP le long des protofilaments favorisent le processus de sauvetage (Dimitrov et al., 2008; Gardner et al., 2013). Tandis que le processus de catastrophe serait lié à l'accumulation de défauts le long des protofilaments (Coombes et al., 2013) et à la pression exercée par des obstacles ralentissant la croissance du MT et entrainant la perte de l'enrichissement en GTP à l'extrémité (+) (Figure 27) (Janson et al., 2003).

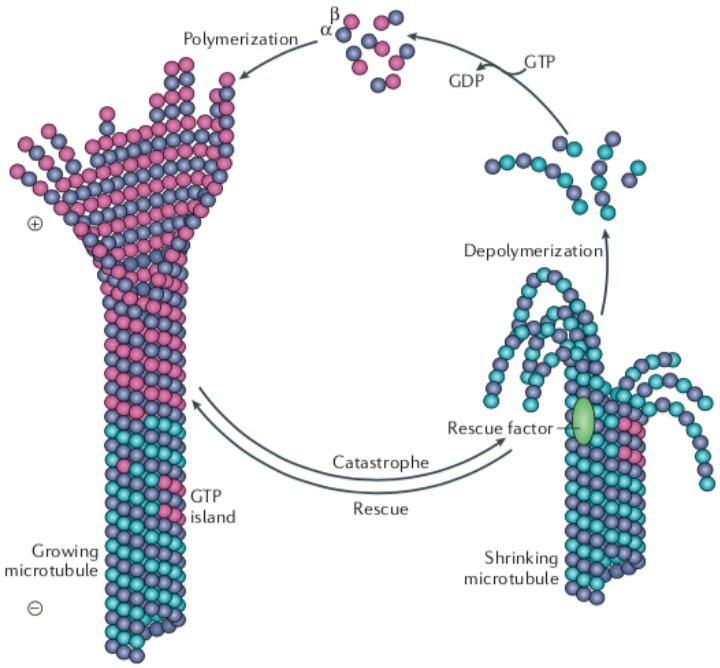


Figure 27: La dynamique de polymérisation/dépolymérisation des microtubules liée à l'hydrolyse du GTP.
Les dimères d' α et de β tubuline liés au GTP (en rose) présentent une conformation droite permettant la polymérisation et la croissance rapide des MT appelée sauvetage (rescue). Tandis que l'hydrolyse en GDP (en bleu) entraine une conformation courbée menant à la dépolymérisation et le désassemblage des MT appelé catastrophe. (D'après Akhmanova et al., 2015)

4. La régulation de la dynamique des microtubules par ses protéines associées

A. Les protéines « classiques » associées aux treillis de microtubules

La dynamique incessante des MT peut avoir un impact sur leurs nombreux rôles dans la cellule, c'est pourquoi ces processus sont hautement régulés grâce à la participation de MAP. Parmi ces MAP, certaines se lient le long des protofilaments sans jamais être localisées à l'extrémité (+) ou (-). Les MAP « classiques » dites structurelles les plus connues dans les neurones sont la protéine Tau, MAP2 et MAP4 et sont très largement localisées dans les axones et les dendrites (Dehmelt and Halpain, 2004; Goodson and Jonasson, 2018). Ces 3 MAP agissent en tant que stabilisateur par augmentation de la rigidité des MT en resserrant les protofilaments entre eux et par inhibition du processus de catastrophe en le stoppant ou en modulant sa durée (Butner and Kirschner, 1991; Chapin and Bulinski, 1991; Dehmelt and Halpain, 2004; Kim et al., 1979). De plus, des études ont mis en évidence que MAP2 peut se fixer aux MT et aux filaments d'actine, montrant un rôle possible de cette protéine à l'interface entre ces deux structures (Roger et al., 2004). Un autre type de MAP se lie le long des protofilaments afin de « sectionner » les microtubules. Parmi ces protéines, la katanine, spastine et fidgetine utilisent

l'hydrolyse de l'ATP afin de retirer les dimères de tubuline au centre des protofilaments entrainant une déstabilisation de l'ensemble (Figure 28) (Goodson and Jonasson, 2018; Roll-Mecak and McNally, 2010).

B. Les protéines associées à l'extrémité (+) des microtubules

Certaines MAP se lient directement à l'extrémité (+) des MT comme la famille des protéines TOG telles que XMAP215 ou les « end binding » protéines (EB) (Akhmanova and Steinmetz, 2015; Ohi and Zanic, 2016). Il a pu être montré que la protéine XMAP215 se fixe préférentiellement sur les protofilaments droits à l'extrémité (+) leurs permettant de se fixer de manière stable aux MT, de recruter les dimères d'α et de β tubuline et donc de promouvoir la polymérisation (Brouhard et al., 2008). Cependant en absence de tubuline soluble, le rôle de XMAP215 s'inverse en fragilisant la liaison entre les sous unités de tubuline à l'extrémité (+) des MT et donc favorise la dépolymérisation (Shirasu-Hiza et al., 2003).
L'autre famille des MAP se fixant à l'extrémité (+) des MT sont les EB, ces protéines sont capables de détecter si les dimères de tubuline sont fixés au GTP ou au GDP et se fixent préférentiellement aux dimères présentant de la GTP (Maurer et al., 2011; Zanic et al., 2009). Ces protéines moduleraient le nombre et la structure des protofilaments de MT en les compactant et en favorisant l'hydrolyse du GTP en GDP au niveau de l'extrémité (+) des MT (des Georges et al., 2008; Maurer et al., 2012; Vitre et al., 2008; Zhang et al., 2015).
Une autre MAP de ce type appelée doublecortine (DCX) a été très largement étudiée car très impliquée dans le développement cortical et reliée à des malformations du développement cortical (Bahi-Buisson et al., 2013; Francis et al., 1999; Gleeson, 2000; des Portes et al., 1998). DCX a un rôle de stabilisateur des MT cependant son fonctionnement est très peu élucidé car son mécanisme n'est pas lié à une modification de l'hydrolyse du GTP. Il a été mis en évidence que DCX reconnaît et se fixe préférentiellement sur les extrémités (+) courbées des MT (Bechstedt et al., 2014). Son mécanisme de stabilisation se réaliserait à travers sa fixation entre les protofilaments permettant le renforcement de la force de contact entre eux (Fourniol et al., 2013; Moores et al., 2004).
Des protéines motrices appelées kinésine et faisant partie de la famille des kinésines-13 se placent aussi à l'extrémité (+) des MT et jouent un rôle de déstabilisateur à travers des mécanismes spécifiques qui seront détaillés dans une prochaine partie (Figure 28) (Akhmanova and Steinmetz, 2015).

C. Les protéines associées à l'extrémité (-) des microtubules

Récemment, une nouvelle famille de MAP appelée Calmodulin-regulated spectrin-associated protein (CAMSAP) se liant à l'extrémité (-) des microtubules a été identifiée. Ces CAMSAP sont capables de suivre les extrémités (-) en croissance lors de la nucléation, de se fixer au niveau des MTOCs et des γTuRC afin de stabiliser les MT à travers une inhibition de la dépolymérisation. Cependant, à travers cette stabilisation les CAMSAP ralentissent drastiquement la croissance des MT en ralentissant voir stoppant l'ajout des dimères de tubulines dans les protofilaments (Figure 28) (Akhmanova and Steinmetz, 2015; Hendershott and Vale, 2014; Jiang et al., 2014).

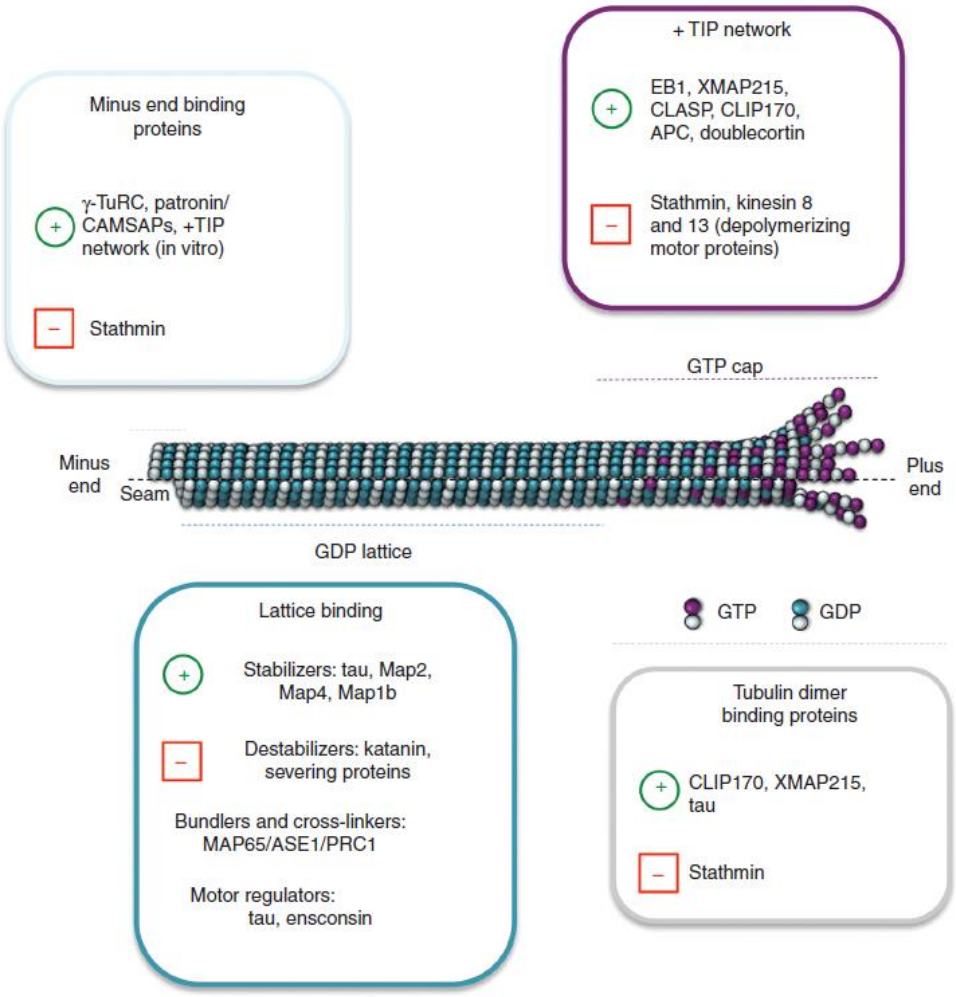


Figure 28: Le rôle des protéines associées aux microtubules dans la stabilisation/déstabilisation de cette structure.
Les MAP sont séparées en trois groupes en fonction de leur localisation au niveau des microtubules. A l'extrémité (+) des MT, les protéines EB, XMAP215 et DCX favorisent la stabilisation des MT tandis que les kinésines-13 entrainent une déstabilisation. Au niveau du treillis de protofilaments, les MAP structurelles telles que MAP2 et Tau stabilisent les microtubules tandis que les protéines « sectionnant » les MT telle que la katanine déstabilisent la structure. A l'extrémité (-) des MT les CAMSAP se fixent au niveau des γTuRC afin de stabiliser les microtubules. (D'après Goodson et al., 2018)

5. Les modifications post-traductionnelles des microtubules

L'autre mécanisme de régulation de la dynamique des MT est la mise en place de modifications post-traductionnelles (MPT). La majorité de ces modifications sont réalisées sur les sous-unités de tubuline une fois polymérisées en microtubules et se divisent en plusieurs types dont nous préciseront uniquement les mécanismes pour celles impliquées dans les neurones. Le premier type de MPT est la tyronisation/détyrosination de l'α-tubuline par des tubulines tyrosine ligases (TTL). Ces TTL réalisent des cycles de tyrosination/détyrosination très rapides des dimères de tubuline, faisant apparaître une distribution en « patch » dans les neurones avec un enrichissement de tubuline détyrosinée dans le segment initial de l'axone et de tubuline tyrosinée dans le cône de croissance. L'étude du fonctionnement de ces TTL a mis en évidence que leur fonction interfère avec la polymérisation des MT et que la surexpression dans des cellules de ces TTL entraine un blocage de ce processus. De plus, la tyrosination et la détyrosination jouent plusieurs rôles dans la dynamique des MT avec une préférence des protéines sectionnant les MT telles que les spastines pour la tubuline détyrosinée tandis que les dimères tyrosinés bloquent leur effet (Roll-Mecak and Vale, 2008). Dans le même contexte, les kinésines-13 impliquées dans la dépolymérisation des MT se fixent préférentiellement à l'extrémité (+) sur les dimères de tubuline tyrosinés afin d'effectuer leur fonction (Ghosh-Roy et al., 2012; Peris et al., 2009).

La deuxième MPT est l'acétylation de l'α-tubuline qui a lieu majoritairement sur le résidu Lys40 le long des microtubules par l'enzyme MEC17 (L'Hernault and Rosenbaum, 1985; Perdiz et al., 2011). Le rôle de cette acétylation est encore très peu élucidée. Cependant, sa localisation sur les microtubules présentant une longue durée de vie tend vers un mécanisme de stabilisation (Janke and Chloë Bulinski, 2011). De plus, des études *in-vitro* ont pu mettre en évidence que l'acétylation des microtubules augmente le transport intracellulaire antérograde par une augmentation de la fixation des kinésines-1 aux MT. Ce processus n'a néanmoins pas été retrouvé *in-vivo* (Reed et al., 2006). Les dimères de tubuline une fois dépolymérisés sont très rapidement désacétylés par les enzymes HDAC5, HDAC6, et SIRT2 (Perdiz et al., 2011).

Le troisième type de MPT abondant dans les neurones et le cil primaire, sont la polyglutamylation et la polyglycylation. Des protéines « TTL-Like » (TTLL) ajoutent des acides aminés sur les MT à travers une réaction enzymatique post-traductionnelle. Lors de ce processus, les TTLL ajoutent des groupements glutamate ou glycine dans le domaine c-terminal de l'α- et de la β-tubuline (van Dijk et al., 2008; Mukai et al., 2009). Il n'y a pour l'instant pas de rôle direct de la polyglutamylation sur les microtubules mais différentes études ont mis en évidence un impact de cette MPT sur l'interaction des

MT avec les MAP. En effet, il a été démontré que la présence de polyglutamylation régule la fonction des MAP structurelles MAP1 et MAP2 sur les MT (Bonnet et al., 2001). De plus, cette MPT aurait aussi un effet sur les protéines motrices telles que la kinésine-3 et la dynéine cytoplasmique qui est encore très peu élucidée (Song and Brady, 2015). En ce qui concerne la polyglycylation, elle est restreinte aux MT présents dans les structures ciliées telles que le cil primaire. Une absence de ce processus mène à une réduction du nombre de cils primaires montrant son implication dans l'assemblage de celui-ci (Rocha et al., 2014).

Le dernier type de MPT identifié dans les neurones est la polyamination facilitant la nucléation, la polymérisation et inhibant la dépolymérisation des MT. Celle-ci permet dans les neurones une augmentation de la stabilité des MT dans les axones et le maintien de cette structure (Song et al., 2013).

L'organisation de ces différentes MPT à travers les MT est très variable en fonction du type cellulaire et du lieu dans la cellule et aucun modèle n'a pour l'heure été proposé. Seulement quelques hypothèses ont été émises telles qu'un enrichissement de la tubuline tyrosinée vers l'extrémité (+) des MT tandis que la tubuline acétylée et détyrosinée serait localisée préférentiellement dans la partie centrale et vers l'extrémité (-). De plus, aucun lien entre la présence de GDP ou GTP et ces MPT n'a pu être établi (Figure 29) (Song and Brady, 2015). Cependant dans les neurones, le paterne d'organisation de ces MPT semble être conservé avec la présence d'un nombre élevé de MT tyrosinés dans le cône de croissance tandis que l'axone semble présenter une proportion élevé de MT glutamylés. En revanche la présence de MT acétylés semble restreinte au soma et aux dendrites (Park and Roll-Mecak, 2018)

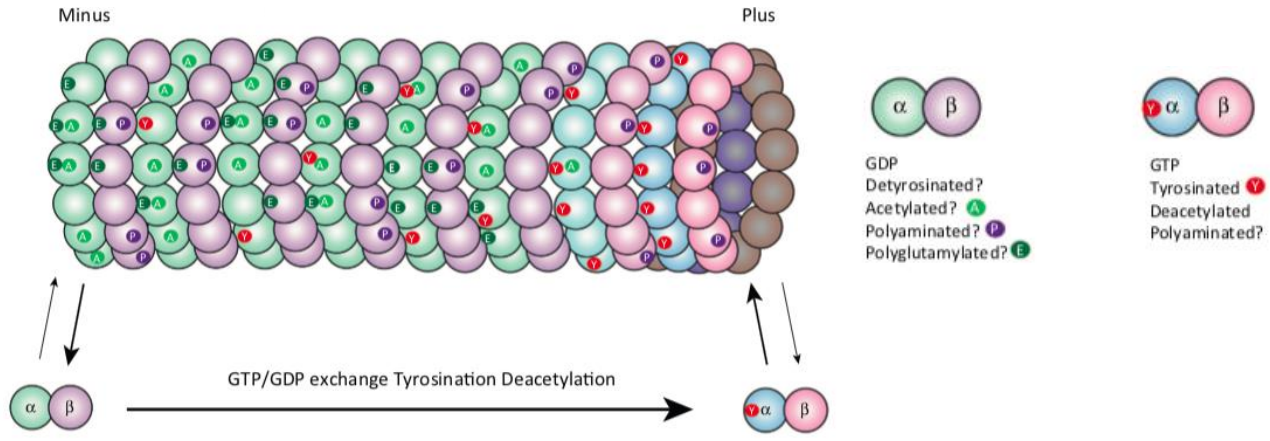


Figure 29: L'organisation des modifications post-traductionnelles le long des microtubules très peu élucidée.
Aucun modèle d'organisation de ces MPT n'a été pour l'heure proposé. Seules quelques hypothèses ont pu être émises sans être confirmées telles que la présence de tubulines tyrosinées (rouge) vers l'extrémité (+) tandis que les tubulines acétylées (vert) et détyrosinées seraient localisées préférentiellement dans le centre et vers l'extrémité (-) des MT. (D'après Song et al., 2015)

II. Les protéines motrices associées aux microtubules

Dans un type cellulaire tel que les neurones, le transport intracellulaire est fondamental car il permet le mouvement d'organelles et de cargos entre le corps cellulaire et la synapse. Lors de ce transport, les microtubules servent de « rails » à de nombreuses protéines motrices telles que la dynéine et les kinésines. Ces protéines motrices à travers leur interaction avec les MT sont aussi impliquées dans de nombreux processus lors du développement cortical que nous illustreront dans une prochaine partie.

1. La dynéine

La dynéine est un complexe composé de 6 polypeptides en deux copies : une isoforme de chaine lourde codée par *DYNC1H1*, deux isoformes de chaines intermédiaires (*DYNC1IC1* et *DYNC1IC2*), deux isoformes de chaines intermédiaires légères (*DYNC1LI1* et *DYNC1LI2*) et trois isoformes de chaines légères (*DYNLRB1*, *DYNLL1*, *DYNLT1*). Ce complexe se lie aux MT et effectue son rôle moteur grâce à l'hydrolyse de l'ATP permettant le transport rétrograde (de l'extrémité (+) vers l'extrémité (-) des MT) d'organelles et de cargos (Bhabha et al., 2016; Cianfrocco et al., 2015; Reck-Peterson et al., 2018). La régulation de sa fonction est réalisée grâce au complexe de protéines adaptatrices Dynactine/LIS1/Ndel1. Ce complexe permet tout d'abord le recrutement de la dynéine à l'extrémité (+) des MT afin qu'elle puisse se fixer aux cargos. Trois modèles expliquant ce recrutement s'affrontent, le premier démontré dans la levure serait lié au transport de la dynéine grâce aux protéines responsables du transport antérograde, les kinésines. A travers une interaction entre LIS1,CLIP170, la kinésine Kip2 et EB1, la dynéine serait transportée jusqu'à l'extrémité (+) afin de fixer à un cargo (Figure 30) (Carvalho et al., 2004; Zhang et al., 2003). De plus, les études de Yamada et coll. ont mis en évidence le transport de la dynéine par la kinésine-1 dans les neurones, permettant de soutenir ce modèle *in-vivo* (Yamada et al., 2008, 2010). Le deuxième modèle également démontré dans la levure démontre que la dynéine serait directement recrutée à l'extrémité (+) des MT depuis le cytoplasme à l'aide de l'interaction entre la dynactine, CLIP170 et EB1 et sans l'intervention de la kinésine Kip2 (Figure 30) (Lloyd et al., 2012; Moughamian and Holzbaur, 2012; Moughamian et al., 2013). Le dernier modèle expose une traduction locale de l'ARN messager des différents composants de la dynéine et ses facteurs de régulation. En effet, le transport de la dynéine du corps cellulaire vers les synapses des neurones pourrait prendre plusieurs jours, c'est pourquoi certains modèles privilégient le transport de l'ARN messager vers la synapse et une traduction locale à ce niveau (Cianfrocco et al., 2015; Gumy et al., 2014; Preitner et al., 2014).

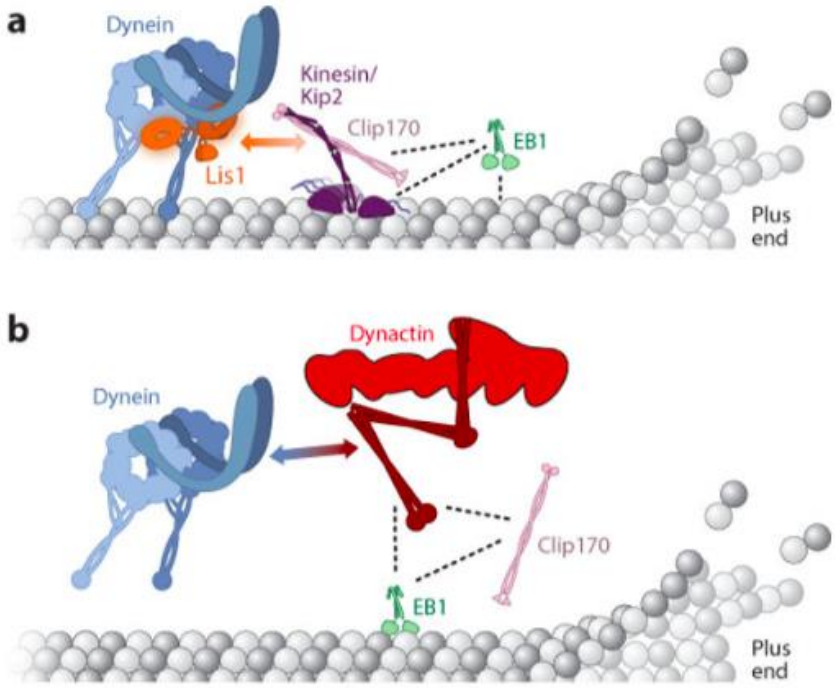


Figure 30: Les modèles de recrutement de la dynéine à l'extrémité (+) des microtubules dans la levure.

(a) Le premier modèle démontre une interaction entre la dynéine (bleu), LIS1 (orange), Clip 170 (rose), la kinésine Kip2 (violet) et EB1 (vert). Cette interaction permettrait de pouvoir transporter de manière antérograde la dynéine vers l'extremité (+) des MT.

(b) Le deuxième modèle démontre un recrutement direct de la dynéine depuis le cytoplasme vers l'extrémité (+) des MT. Ce recrutement se ferait grâce à la participation de la dynactine, Clip170 et EB1.

(D'après Cianfrocco et al., 2015)

L'interaction entre la dynéine et ses facteurs associés permet aussi la régulation de la fixation des cargos et l'initiation du transport rétrograde. Nous nous focaliserons sur la régulation par LIS1, une protéine largement étudiée lors du développement cortical car identifiée dans de nombreuses MDC. LIS1 est le seul interacteur connu se fixant directement sur le domaine moteur de la dynéine. A travers cette fixation et son interaction avec Ndel1, LIS1 augmente l'affinité entre la dynéine et les MT et ralentit sa vitesse de déplacement. Cette augmentation de l'affinité et ce ralentissement de la dynéine permettraient la rétention de celle-ci à l'extrémité (+) des microtubules afin de faciliter la fixation des cargos et l'initiation du transport rétrograde (Figure 31) (Cianfrocco et al., 2015; Huang et al., 2012; Toropova et al., 2014; Yamada et al., 2008). De plus, LIS1 participerait à la fixation de cargos volumineux par la dynéine. En effet, des études d'inactivation de LIS1 dans des neurones provoquent une perturbation du transport de cargos volumineux tandis que le transport des petits cargos n'est pas impacté (Figure 31) (Yi et al., 2011). Enfin, l'interaction avec Ndel1 permet à LIS1 et à la dynéine de se placer correctement au centrosome afin de favoriser l'ancrage des microtubules à ce niveau et leur nucléation (Guo et al., 2006).

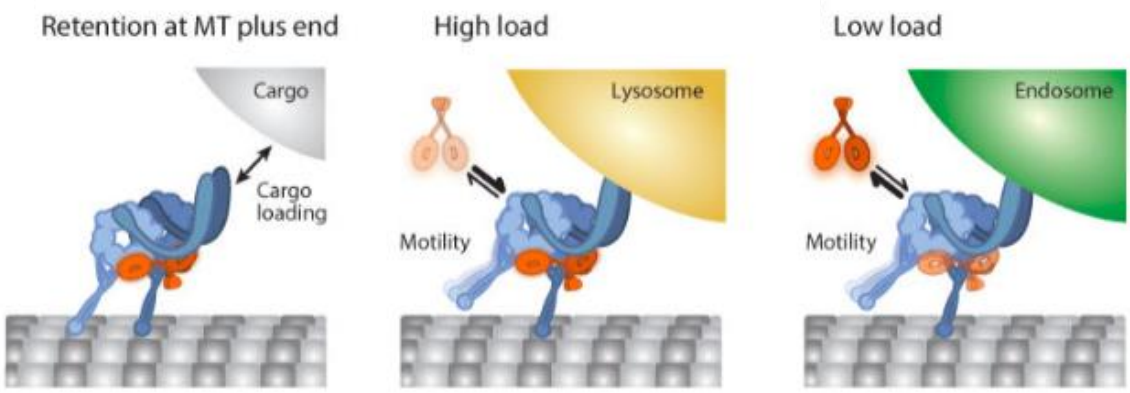


Figure 31: Les différents rôles de LIS1 dans l'interaction dynéine-cargo.
La protéine LIS1 (orange) permet la rétention de la dynéine (bleu) à l'extrémité (+) des MT et facilite l'interaction avec le cargo. De plus un rôle dans le transport de cargo volumineux tel que les lysosomes a pu être mis en évidence avec une augmentation de la fixation de LIS1 avec la dynéine. Tandis qu'il ne semble pas y avoir d'effet de LIS1 avec les cargos de faible volume. (D'après Cianfrocco et al., 2015)

2. Les kinésines

La superfamille des kinésines est composée de 45 gènes dont 38 sont exprimés dans le cerveau. Ces 45 gènes sont eux même divisés en 3 grands groupes en fonction de la localisation de leur domaine moteur, les N-kinésines lorsque le domaine moteur est dans le domaine N-terminal, les C-kinésines lorsqu'il est situé dans le domaine C-terminal et les M-kinésines lorsqu'il se situe dans le centre de la protéine. Elles ont été divisées en 14 sous-familles par homologie entre les domaines moteurs. Ces protéines sont motrices et utilisent l'hydrolyse d'ATP afin d'effectuer deux grands rôles, le transport intracellulaire et la dépolymérisation des microtubules (Hirokawa and Noda, 2008; Hirokawa and Tanaka, 2015; Hirokawa et al., 2009).

A. Les kinésines responsables du transport intracellulaire

Deux parmi les trois groupes de kinésines, sont responsables du transport intracellulaire, les C-kinésines composées des kinésines-14 responsables du transport rétrograde de l'extrémité (+) vers l'extrémité (-) des MT qui sont minoritaires et que nous ne détaillerons pas dans cette partie et les N-kinésines responsables du transport antérograde de l'extrémité (-) vers l'extrémité (+) des MT. Ces N-kinésines sont très largement majoritaires et sont composées de nombreuses familles de kinésines présentant un pourcentage d'identité d'environ 40% au niveau de leur domaine moteur. Malgré cette grande ressemblance, chaque famille serait enrichie dans des compartiments et types cellulaires différents et serait responsable du transport de cargos bien spécifiques. Dans les neurones les kinésines-1 et les kinésines-3 sont très abondantes et jouent un rôle majoritaire dans le transport axonal rapide (Hirokawa and Noda, 2008; Hirokawa and Tanaka, 2015; Hirokawa et al., 2009). En absence de liaison à un cargo, ces kinésines présentent un mécanisme d'auto-inhibition en prenant

une conformation repliée bloquant l'accès de l'ATP au domaine moteur. Cette auto-inhibition a pour rôle d'effectuer un contrôle temporel et spatial sur l'activité de ces kinésines et d'effectuer un transport intracellulaire précis. La fixation du cargo par les kinésines auto-inhibées permet l'activation de celles-ci, entrainant l'induction du transport antérograde. Une fois la cible atteinte le cargo se détache de la kinésine, entrainant de nouveau une conformation inactive de celle-ci puis son recyclage (Coy et al., 1999; Friedman and Vale, 1999; Verhey and Hammond, 2009; Wong et al., 2009).

De plus, il a été mis en évidence que les différentes MPT des MT et les MAP structurelles participent à la régulation du transport par les kinésines-1. En effet, des études ont montré que l'acétylation des MT exerce un rôle positif sur la mobilité et le recrutement des kinésines-1 (Reed et al., 2006) tandis que le cycle de tyrosination-détyrosination de la tubuline influencerait la destination du transport intracellulaire effectué par la kinésine-1 (Dunn et al., 2008; Konishi and Setou, 2009; Verhey and Hammond, 2009). En revanche, l'effet des MAP sur le transport par la kinésine-1 semble être spécifique de chaque protéine. La surexpression de la protéine Tau a montré un ralentissement du transport antérograde par le blocage de la mobilité de la kinésine-1 (Ebneth et al., 1998; Stamer et al., 2002). Dans le même contexte, des études récentes ont démontré que la protéine MAP7 permet de promouvoir le transport intracellulaire d'organelles par le recrutement de la kinésine-1 aux MT (Chaudhary et al., 2019; Tymanskyj et al., 2018)

Récemment, un nouveau rôle de ces kinésines a pu être mis en évidence. Les kinésines-1 sont également responsables d'un processus permettant aux MT de pouvoir glisser les uns par rapport aux autres. Ces kinésines sont capables de fixer deux MT en même temps, un à son domaine N-terminal et un à son domaine C-terminal (Seeger and Rice, 2010). Dans cette conformation, le MT attaché au domaine C-terminal devient un cargo pour la kinésine-1 et lorsque celle-ci se déplace sur le MT fixé à son domaine N-terminal cela mène à un mouvement du MT par rapport à l'autre. Cependant, des études ont permis de démontrer que les kinésines-1 n'adoptent pas de schéma de fixation en fonction de l'orientation des MT. Dans cette situation, dans 50% des cas les MT seront orientés dans un sens inverse et donc le déplacement antérograde des kinésines mènera à un glissement d'un MT par rapport à un autre. Cependant dans 50% des cas, les MT seront orientés dans le même sens et donc le déplacement des deux kinésines bloquera tout mouvement (Figure 32) Ce processus lors du développement cortical permet lors des étapes précoces de polarisation des neurones d'initier la formation des neurites mais aussi lors de l'axonogenèse de permettre le transport antérograde de MT déjà formé (Ahmad and Baas, 1995; Lu and Gelfand, 2017; Winding et al., 2016).

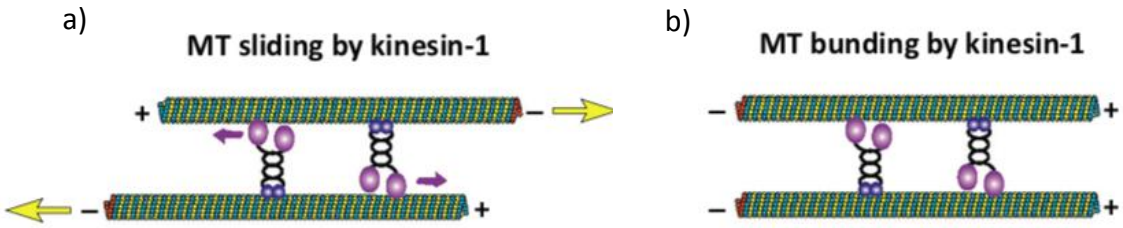


Figure 32: La fixation de la kinésine-1 à deux microtubules permet le déplacement de l'un par rapport à l'autre.
La famille des kinésines-1 est capable de fixer un MT à son domaine N-terminal et dans le même temps fixer un autre MT à son domaine C-terminal, cependant il n'existe pas de schéma de fixation spécifique. Dans ce schéma simplifié avec uniquement deux kinésines nous pouvons voir que si les MT sont orientés en sens inverse (a), le déplacement des kinésines permet le glissement d'un MT par rapport à l'autre. (b) Dans une situation avec les MT dans le même sens, aucun mouvement ne sera possible. (D'après Lu et al., 2017)

B. Les kinésines responsables de la dépolymérisation des microtubules

Le troisième groupe des kinésines-M comporte son domaine moteur au centre de la protéine et effectue un rôle très différent des kinésines dites « classique ». A l'aide de sa capacité motrice et de l'hydrolyse de l'ATP, elle permet la dépolymérisation des MT en retirant les dimères d'α- et de β-tubuline à l'extrémité (+) des protofilaments de MT (Desai et al., 1999). Ce groupe est constitué uniquement de la famille des kinésines-13 qui présente quatre isoformes : KIF2A, KIF2B, KIF2C/MCAK et KIF24 (Hirokawa et al., 2009). Ces protéines fonctionnent sous forme d'homodimère et présentent une organisation similaire selon les isoformes avec un domaine N-terminal et « Neck » impliqué dans la régulation de la localisation de la protéine, un domaine moteur permettant l'hydrolyse d'ATP et enfin un domaine « coil-coiled » contenant le domaine de dimérisation de ces protéines (Figure 33) (Carolyn A. Moores, 2005). Différentes constructions tronquées de la protéine ont montré que les domaines N-terminal et « Neck » sont suffisants à la localisation de la protéine aux MT tandis que le domaine C-terminal de la protéine n'est pas suffisant à la dimérisation de la protéine et requiert aussi la présence du domaine N-terminal (Kline-Smith et al., 2004; Maney et al., 2001; Walczak et al., 2002) . Lors des prochaines parties, nous détaillerons la kinésine-13 KIF2A, la plus abondante et dont le disfonctionnement est associé à des anomalies du développement cortical.

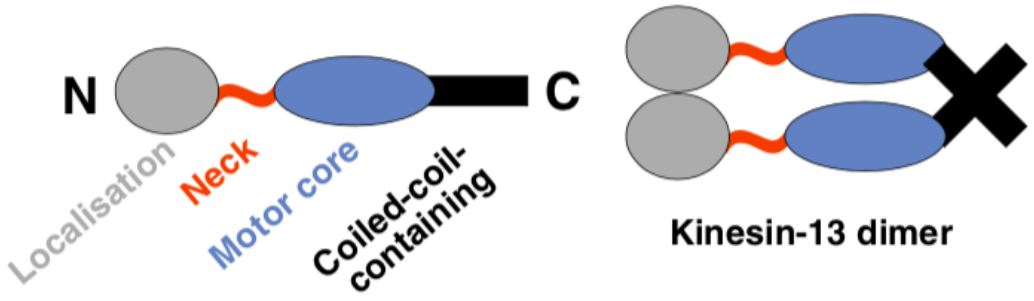


Figure 33: L'architecture des kinésines-13.
L'organisation des kinésines-13 est conservée selon les différentes isoformes. Elles présentent un domaine de localisation (gris) et neck en N-terminal (orange), un domaine moteur central (bleu) et un domaine « coiled-coil » en C-terminal permettant la dimérisation des protéines. (D'après Moores et al., 2013)

C. Le mécanisme de dépolymérisation des microtubules par KIF2A

Comme nous avons pu le voir précédemment KIF2A faisant parti des kinésines-13 a pour rôle la dépolymérisation des MT par retrait des dimères d'α- et de β-tubuline à l'extrémité (+) des protofilaments. Des études mécanistiques par purification de la protéine et étude in-vitro de son comportement sur des MT ont permis de décomposer son processus en différentes étapes :

- Selon certaines études KIF2A se fixe aux MT selon deux processus différents. Le premier est la reconnaissance direct de l'extrémité (+) des MT, où elle doit réaliser son rôle de dépolymérisation. Le deuxième se situe le long du treillis de MT, où KIF2A doit se déplacer jusqu'à l'extrémité (+). Des études, utilisant de l'AMP-PNP un analogue non hydrolysable de l'ATP, ont permis de démontrer que KIF2A nécessite la fixation d'ATP afin de pouvoir viser et se fixer aux MT, mettant la protéine dans un état de « pré-hydrolyse ». Cependant KIF2A ne nécessite pas l'hydrolyse de l'ATP pour se déplacer le long des protofilaments comme les kinésines dites « classiques ». Ce déplacement se fait uniquement par diffusion libre le long des MT jusqu'à l'extrémité (+) (Figure 34,A,B) (Carolyn A. Moores, 2005; Helenius et al., 2006; Ogawa et al., 2017; Trofimova et al., 2018).
- Une fois localisée à l'extrémité (+) dans un état de « pré-hydrolyse » d'ATP, KIF2A se lie à un dimère de tubuline à travers son domaine moteur et des boucles spécifiques. De plus, des études structurelles ont démontré que KIF2A se lie dans le même temps à un deuxième dimère de tubuline à travers son domaine « neck » et une structure appelée « KVD finger » située entre le domaine « neck » et le domaine moteur. Cette double fixation fait passer KIF2A dans un état d'une protéine pour deux dimères de tubulines (1:2 state). A ce moment, la liaison entre KIF2A et les deux dimères de tubuline est exclusive et aucune autre protéine KIF2A ne peut venir se lier à ce complexe (Asenjo et al., 2013; Ogawa et al., 2017; Trofimova et al., 2018) (Figure 34,C) .

- Une fois fixée aux deux dimères de tubuline, KIF2A débute l'hydrolyse d'ATP afin de pouvoir effectuer son rôle de protéine motrice. Lors de cette étape, KIF2A augmente le degré de courbure du protofilament pour finalement le casser à son extrémité entrainant les deux dimères de tubuline auxquelles est fixée la protéine (Ogawa et al., 2017; Trofimova et al., 2018) (Figure 34,C).
- Lorsque le complexe composé de deux dimères de tubuline et de KIF2A est détaché du protofilament, KIF2A est en situation de fin d'hydrolyse d'ATP (ADP+Pi). Lors de cette étape, les deux dimères de tubuline sont séparés, KIF2A ne restant fixé plus qu'à un dimère (Ogawa et al., 2017) (Figure 34,D).
- Finalement, lorsque l'hydrolyse d'ATP en ADP est totale, KIF2A se décroche du dimère de tubuline permettant son recyclage et celui de la tubuline libre (Ogawa et al., 2017) (Figure 32,E).

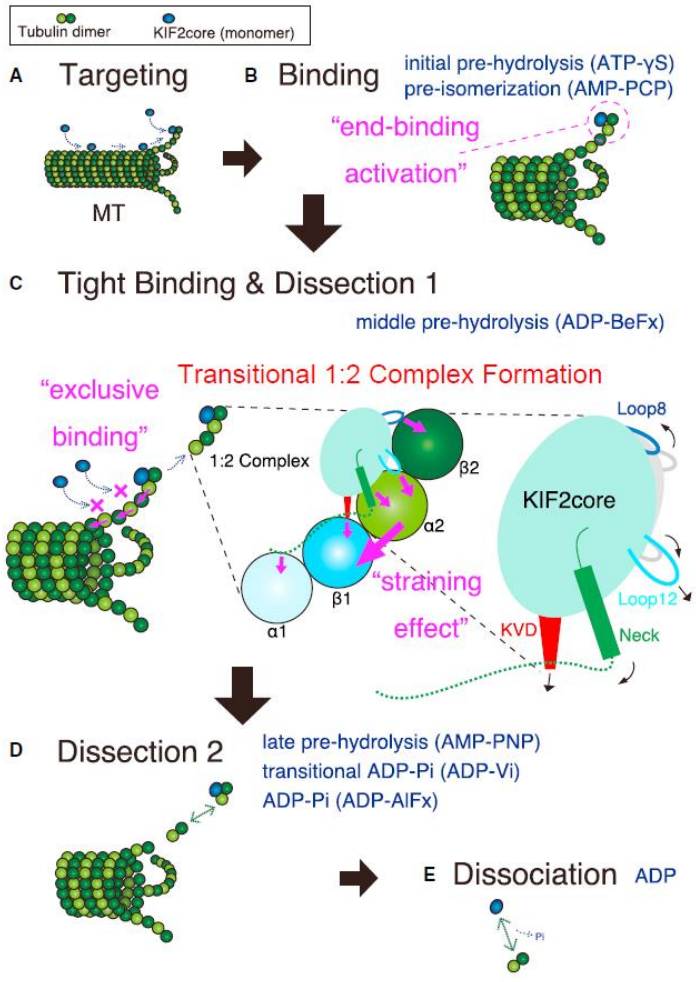


Figure 34: Les différentes étapes de la dépolymérisation des microtubules par KIF2A.

(A) Lors de la première étape, KIF2A se fixe soit directement à l'extrémité (+) soit le long des MT puis diffuse librement afin d'atteindre l'extrémité (+).

(B) Une fois localisée à l'extrémité (+), KIF2A se fixe à deux dimères de tubuline à travers son domaine moteur et son domaine « Neck »-« KVD finger ».

(C) Cette liaison devient exclusive avec uniquement une protéine KIF2A pour deux dimères de tubuline. A cette étape KIF2A utilise sa capacité motrice par hydrolyse d'ATP afin d'augmenter la courbure de l'extrémité du protofilament et le décrochage des deux dimères de tubuline.

(D) Lors de la fin de l'hydrolyse, les deux dimères de tubuline se séparent, KIF2A restant accroché à un seul dimère.

(E) Une fois que KIF2A a complété l'hydrolyse d'ATP en ADP, elle se dissocie du dimère de tubuline, mettant fin à son processus de dépolymérisation. (D'après Ogawa et al., 2017)

D. Les mécanismes de régulation de la dépolymérisation des microtubules par KIF2A.

La polymérisation/dépolymérisation des MT étant des processus très finement régulés au sein de la cellule, KIF2A répond également à ces régulations. La régulation de la protéine KIF2A se fait à travers deux processus, la régulation de son activité dépolymérase et la régulation à travers sa localisation. Des études d'Ogawa et coll. ont mis en évidence une modulation de l'activité de KIF2A en réponse à des cascades de phosphorylation dans les neurones. En effet, en fonction de la nécessité du neurone à étendre ses processus neuritiques ou à les supprimer, différentes cascades de signalisation s'activent entrainant une régulation de la dépolymérisation par KIF2A. La première est l'activation par le brain derived neurotrofic factor (BDNF) des récepteurs TrkB. Cette activation entraine l'activation de PAK1 et CDK5 qui phosphorylent KIF2A sur des sites spécifiques entrainant la répression de son activité dépolymérase (B-type) et donc l'élongation des neurites à travers la croissance des MT. La deuxième voie de signalisation est l'activation du récepteur GPCR par l'acide lysophosphatidique (LPA), activant la voie Rho/ROCK entrainant la phosphorylation de KIF2A sur un site activateur (A-type). Cette phosphorylation entrainant l'augmentation de l'activité dépolymérase de KIF2A permettant la dépolymérisation des MT et la suppression des neurites (Figure 35) (Ogawa and Hirokawa, 2015).

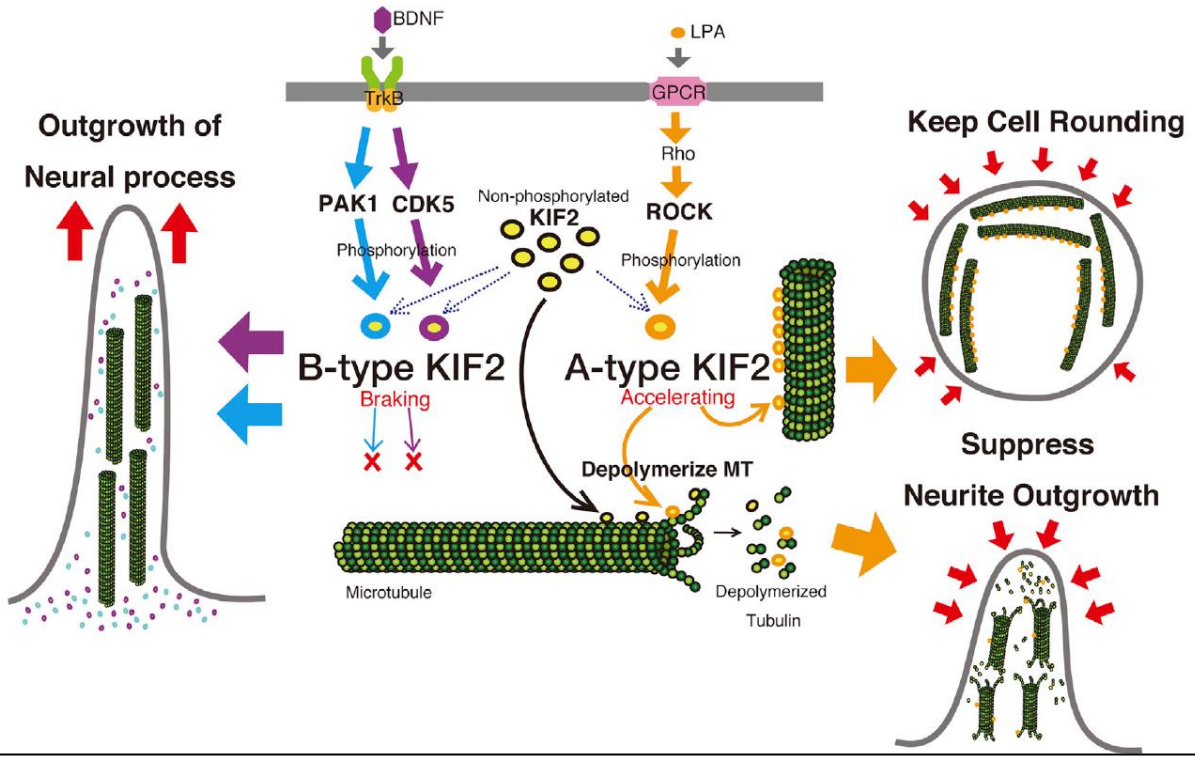


Figure 35: La régulation de l'activité de KIF2A en fonction de la croissance neuritique.
La croissance neuritique dans les neurones répond à plusieurs cascades de signalisation. Ces cascades permettent une modulation de cette croissance à travers celle des MT et l'activité de KIF2A. Par l'activation du récepteur TrkB par le BDNF, PAK1 et CDK5 phosphorylent KIF2A sur des sites réprimants son activité (B-Type) permettant l'arrêt de la dépolymérisation, la croissance des MT et des processus neuritiques. Au contraire, l'activation de GPCR par LPA, active la phosphorylation de KIF2A par Rho/ROCK sur des sites activateurs (A-type). Cette activation augmentant la dépolymérisation des MT par KIF2A et donc la suppression des neurites. (D'après Ogawa et al., 2015)

Finalement, des études de MCAK et KIF2A ont permis de montrer une régulation de la dépolymérisation par le MT lui-même à travers ses MPT. En effet, des études *in-vitro* ont démontré que la détyrosination des MT bloque l'activité de KIF2A menant à la stabilisation des MT (Peris et al., 2009).

III. L'implication des microtubules et ses protéines associées dont KIF2A lors du développement cortical

Les MT étant le composant principal du cytosquelette des cellules, ils participent à de nombreux processus cellulaires dont certains sont indispensables lors des trois principales étapes du développement cortical : la neurogenèse, la migration et la différentiation. Dans cette partie nous allons mettre en relation les différents mécanismes impliquant les MT dans les différentes étapes du développement cortical telles que la division cellulaire, la migration nucléaire intercinétique, la migration neuronale par locomotion, l'acquisition de la bipolarité des neurones ou encore la croissance axonale (Figure 36) (Breuss et al., 2017).

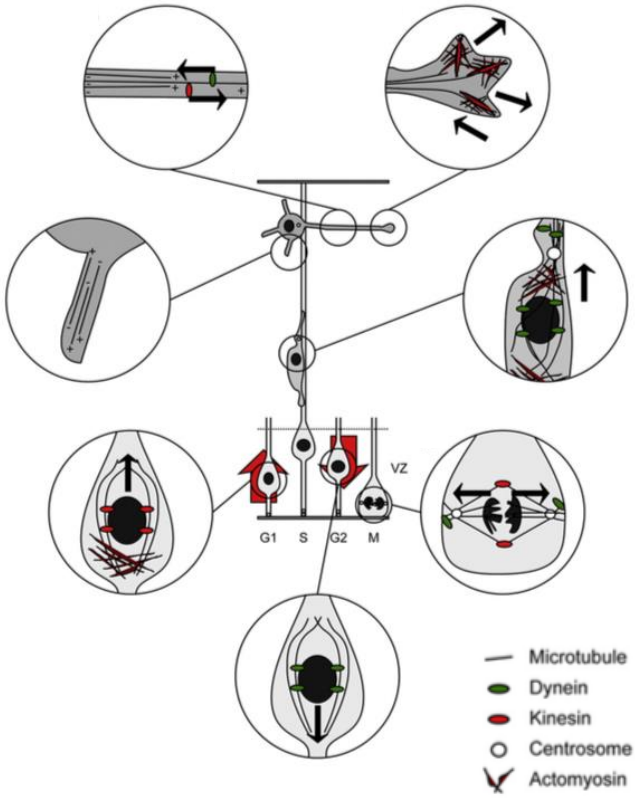


Figure 36: L'implication des microtubules dans les différents processus du développement cortical.
Les microtubules sont impliqués dans de nombreux processus du développement cortical : La division cellulaire, la migration nucléaire intercinétique, la migration neuronale, la polarité neuronale et la croissance axonale. (D'après Breuss et al., 2017).

1. L'implication dans la neurogenèse

Lors de la neurogenèse, l'ensemble des progéniteurs neuronaux effectuent une série de divisions symétriques et asymétriques à l'aide du processus de mitose afin de former la population finale de neurones. Les MT sont essentiels à l'induction de la mitose par la mise en place du fuseau mitotique responsable de la séparation des chromosomes (Breuss et al., 2017). Lors de la formation du fuseau mitotique en métaphase, les MT sont divisés en trois catégories : Les fibres kinétochores (appelées aussi K-fiber) au centre du fuseau mitotique se fixant aux kinétochore des chromosomes et permettant leur ségrégation, les MT astraux ayant pour origine les deux centrioles et responsables de la capture des chromosomes lors du processus mitotique et les MT interpolaires formant la « cage » entre les deux pôles du fuseau que l'on observe lors de la mitose (Figure 35). Lors des différentes étapes de la mitose, les processus de régulation de la dynamique des microtubules réalisés par les MAP et décrites précédemment sont essentielles au maintien du fuseau mitotique et à la ségrégation des chromosomes (Gadde and Heald, 2004; Maiato et al., 2004) (Figure 37).

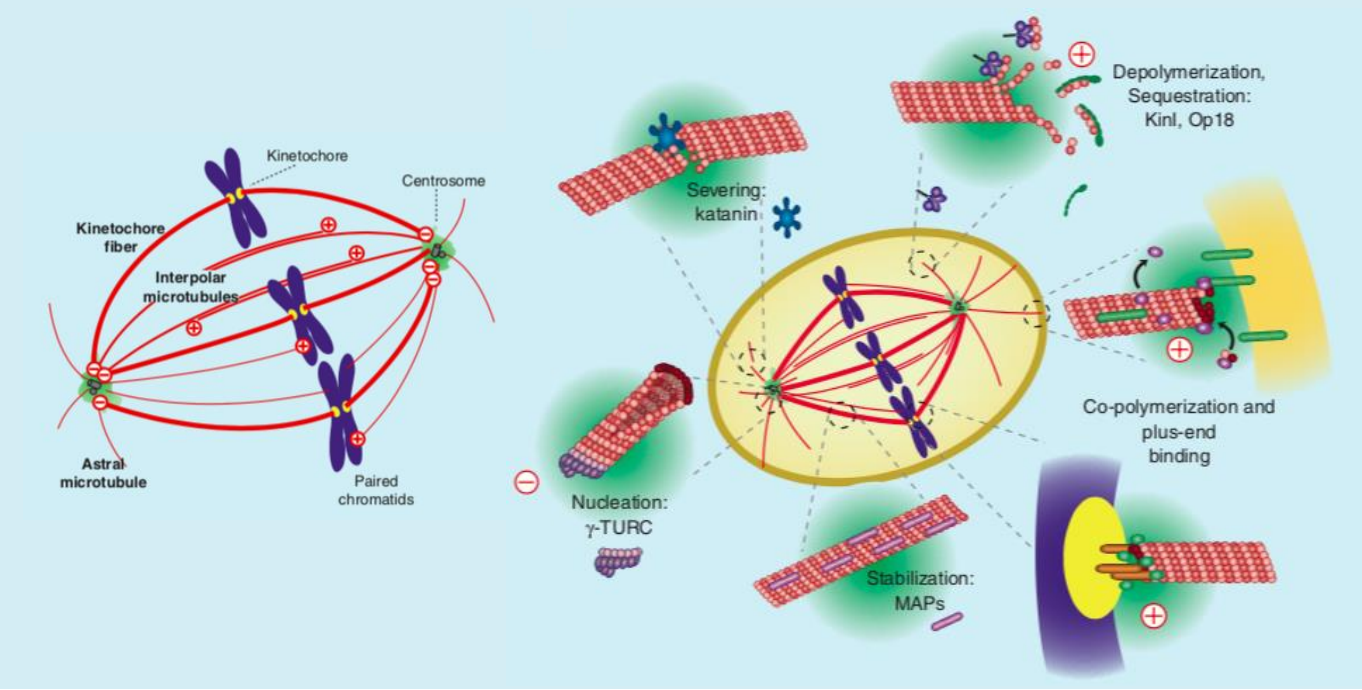


Figure 37: L'organisation des microtubules dans le fuseau mitotique et le rôle des MAP dans la maintenance de cette structure.
Les microtubules forment la structure du fuseau mitotique avec les fibres kinétochores reliant les pôles du fuseau aux kinétochores des chromosomes, les microtubules interpolaires formant la « cage » du fuseau mitotique, et les microtubules astraux reliés aux centrosomes de chaque pôle. L'ensemble des processus dynamiques de maintenance du cytosquelette de MT par les MAP permet le maintien du fuseau mitotique lors de la mitose (D'après Gadde et al. 2004).

Les protéines motrices associées aux MT sont aussi très importantes lors du processus de mitose. Les MAP responsables du transport intracellulaire permettent l'assemblage du fuseau mitotique et sa maintenance comme la dynéine à travers son rôle dans l'orientation des microtubules astraux. Elles sont également impliquées dans la ségrégation des chromosomes avec le rôle des kinésines dans le mouvement des kinétochores qui couplé au raccourcissement des fibres kinétochores par les kinésines-13 dont KIF2A permet la séparation et le mouvement des chromosomes vers chacun des pôles du fuseau mitotique (Gadde and Heald, 2004; Heald, 2000). De plus, des études d'inactivation par ARN-interférent d'un large nombre de kinésines et de la dynéine cytoplasmique chez la drosophile et dans des cellules HeLa ont mis en évidence qu'un très large nombre de protéines motrices sont impliquées dans la maintenance du fuseau mitotique (Goshima and Vale, 2003; Zhu et al., 2005). Dans un contexte similaire, il a été démontré que KIF2A lors de la mitose présente un enrichissement au pôle du fuseau mitotique et permet le contrôle de la longueur des microtubules du fuseau (Amity L. Manning et al., 2007; Uehara et al., 2013; Walczak et al., 2002).

Les MT présentent aussi un impact indirect sur le cycle cellulaire à travers le cil primaire. L'axonème du cil primaire est composé de microtubules qui doivent se dépolymériser afin de pouvoir assurer un désassemblage total du cil primaire afin que la cellule puisse entrer en mitose. KIF2A étant la kinésine majoritairement impliquée dans la dépolymérisation des microtubules de l'axonème du cil primaire et son désassemblage à travers son activation par PLK1, un lien entre KIF2A et le cycle cellulaire a pu être établi. En effet, les travaux de Miyamoto et coll. ont mis en évidence que la mutation dans des sites de phosphorylation de KIF2A par PLK1, bloque le désassemblage du cil primaire. Ce blocage ayant comme effet majeur un blocage du cycle cellulaire et donc de la prolifération cellulaire (Miyamoto et al., 2015). Cette implication de KIF2A dans la prolifération neuronale à travers son effet sur le cil primaire et le cycle cellulaire a pu être aussi abordée par nos travaux « Ciliogenesis and cell cycle alterations contribute to KIF2A-related malformations of cortical development » (Broix et al., 2017) rapporté dans la partie résultat de cette thèse. Ce rôle de KIF2A a aussi été démontré à travers l'inhibition de WDR62 dans un modèle d'organoïde de cerveau menant à un défaut de recrutement de KIF2A au niveau du cil primaire par CEP170, provoquant un défaut de prolifération lié à une anomalie de désassemblage du cil primaire et une microcéphalie (Zhang et al., 2019).

Au cours de la MNI, les MT jouent aussi un rôle crucial. L'étude de Kosodo et coll. sur la MAP Tpx2 a permis de mettre en évidence que lors de ce processus les MT subissent des modifications de leur structure et leur longueur à travers l'activation d'Aurora A inhibiteur connu de KIF2A (Kosodo et al., 2011). Ces modifications des MT permettent au final le mouvement du noyaux des GRa et cNE vers la membrane basale conduit par la kinésine KIF1A et le retour des noyaux vers la membrane apicale grâce

à l'intervention de la dynéine et de Tpx2 (Breuss et al., 2017). De plus les travaux de Tsai et coll. ont permis par l'inactivation de KIF1A de démonter le rôle essentiel de cette protéine dans le déplacement basale du noyau lors de la MNI (Tsai et al., 2010).

2. L'implication dans la migration neuronale radiaire.

La dynamique de remodelage du cytosquelette de MT est essentielle lors des différentes étapes de la migration neuronale allant de la transition multipolaire-bipolaire à la locomotion.
De nombreuses études d'inactivation de gènes codant pour des MAP chez la souris ont pu mettre en évidence des défauts de transition multipolaire/bipolaire (MP-BP) et donc une implication des MT dans ce processus. Par exemple, l'inactivation par électroporation *in-utero* de CDK5, protéine kinase phosphorylant de nombreuses MAP telles que DCX et Ndel1 provoque des anomalies de la transition MP-BP avec des cellules multipolaires n'exprimant plus CDK5 bloquées dans la ZI (Ohshima et al., 2007). Par la même approche, l'inactivation de la kinésine-6 connue pour son implication dans la division cellulaire, provoque également un défaut de transition avec une accumulation de cellules multipolaires sous la plaque corticale (Falnikar et al., 2013). Par ailleurs, des études du facteur de croissance de fibroblaste FGF13 ont pu mettre en évidence sa fixation aux MT et son rôle de stimulateur de la croissance microtubulaire. L'inactivation *in vivo* de cette protéine a pu montrer un délai dans la transition multipolaire-bipolaire. De plus, il semble que cette protéine comporte un rôle similaire à la protéine DCX sur les microtubules dont nous avons parlé précédemment car les phénotypes causés chez la souris par l'inactivation de ce gène sont partiellement reversés lors de la surexpression de DCX (Cooper, 2014; Wu et al., 2012).

Lors de la locomotion, les neurones réalisent des étapes de déplacements successifs de leur noyau appelé nucléokinèse. Lors de ce processus, les MT, le centrosome, le cytosquelette d'actine, la myosine et les MAP participent à l'induction du déplacement du noyau permettant la migration neuronale. Au cours de la nucléokinèse, les MT émergent du centrosome et s'organisent selon un axe antéro-postérieur de la cellule avec une présence en avant de la cellule dans le « leading process », et une présence antérieure formant une cage enveloppant le noyau (Gregory et al., 1988; Tsai and Gleeson, 2005). Ce processus comporte trois grandes étapes, le premier est l'extension du « leading process », puis le mouvement du centrosome dans le « leading process » qui mènera ensuite au mouvement du noyau afin de le rejoindre. C'est lors de ces trois étapes que l'interaction entre les MT, les MAP et le cytosquelette d'actine est cruciale. La première étape est réalisée par les forces exercées entre la polymérisation de l'actine et la croissance des MT (Jiang and Nardelli, 2016; Pacheco and Gallo, 2016). En avant de la cellule, les MAP des extrémités (+) permettent d'ancrer les MT au cytosquelette d'actine

dans le cône de croissance. Ensuite le centrosome se déplace vers le cône de croissance du « leading process », c'est à ce moment qu'un premier modèle a pu illustrer l'implication de la dynéine cytoplasmique. En effet, des études d'inactivation de la fonction de la dynéine ont mis en évidence un défaut de couplage entre le centrosome et le leading process lors de la migration. C'est pourquoi il a été proposé que la dynéine cytoplasmique permette de tirer le centrosome vers le « leading process » grâce à son activité motrice. Ensuite c'est lors de la dernière étape que le noyau se déplace afin de rejoindre le centrosome.

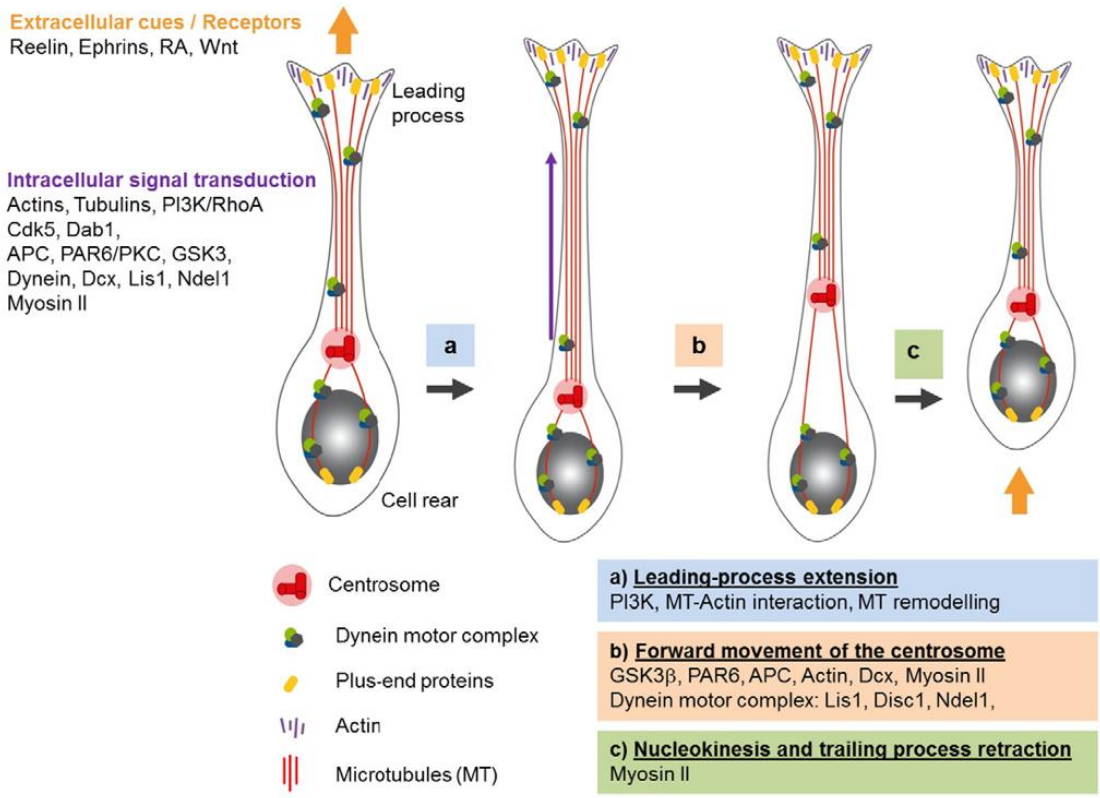


Figure 38: L'implication des microtubules et de ses protéines associées dans le processus de nucléokinèse.
Lors du processus de nucléokinèse, les microtubules émergent du centrosome et sont ancrés en avant du « leading process » au cytosquelette d'actine et en arrière au noyau par le complexe dynéine/Lis1/Ndel1 et les protéines des extrémités (+) telles que EB1. L'initiation de ce processus se réalise par l'allongement du leading process réalisé par la polymérisation de l'actine et la croissance des MT (a). Puis le déplacement du centrosome vers l'avant du « leading process » (b). Ensuite la forcé générée par le complexe de la dynéine lors de son déplacement vers l'extrémité (-) des microtubules permettrait de tirer le noyau vers le centrosome et permettre son déplacement (c). (D'après Jiang et al., 2016)

Lors de ce processus des modèles proposent que les MAP des extrémités (+) tel que EB1 permettent d'ancrer les MT au cytosquelette d'actine en avant du « leading process » tandis que le complexe dynéine/Lis1/Ndel1 permet la fixation des MT au noyau en arrière afin de le « capturer » (Tsai and Gleeson, 2005). Les études de Shu et coll. et Tanaka et coll. ont pu par inactivation de la dynéine, Lis1

et Ndel1 de mettre en évidence une impossibilité de la « cage » de microtubules de se fixer au noyau, prouvant le rôle de ce complexe dans ce processus (Shu et al., 2004; Tanaka et al., 2004). De plus, une étude de Zhang et coll. a pu mettre en évidence la formation d'un complexe entre le complexe dynéine/Lis1/Ndel1 et les protéines Syne-1/2. Selon cette étude, la force motrice générée par la dynéine lors de son déplacement vers l'extrémité (-) des MT permettrait de tirer le noyau afin qu'il rejoigne le centrosome et donc la nucléokinèse (Zhang et al., 2009). Lors de l'ensemble de ces processus, l'intervention de protéine stabilisant les MT telle que DCX permettent de maintenir l'ensemble de la structure stable (Figure 38).

Les travaux de notre équipe sur les mutations de KIF2A qui seront présentés dans la partie résultat et les travaux de Homma et coll. ont aussi permis d'identifier le rôle de KIF2A lors de la migration neuronale à travers son action sur les microtubules. En effet la surexpression des mutations de KIF2A dans les neurones par électroporation *in-utero* et l'inactivation homozygote chez la souris montrent des défauts de migration avec une accumulation de cellules dans les couches profondes du cortex (Broix et al., 2017; Homma et al., 2003). En revanche, le processus spécifique perturbé n'a pas été pour l'heure totalement identifié.

3. L'implication lors de la différenciation

Les MT sont aussi très largement impliqués lors de la différenciation neuronale lors des stades tardifs du développement cortical. Lors de cette partie, nous allons détailler le rôle des MT lors de l'initiation de l'axonogénèse et l'acquisition de la morphologie neuronale.

Lors de l'initiation de l'axonogenèse, le cytosquelette d'actine qui tapisse le cône de croissance de l'axone devient très dynamique tandis que l'actine au niveau du cône de croissance des dendrites reste stable. Cette instabilité au niveau du futur axone permet aux MT de se déplacer du centre du cône de croissance vers la périphérie tandis que la stabilité au niveau des dendrites rend ce processus peu possible. Le déplacement des microtubules au niveau du cône de croissance de l'axone permet son avancée progressive et l'initiation de la formation de l'axone (Bradke and Dotti, 2000; Hoogenraad and Bradke, 2009; Stepanova et al., 2003; Winkle et al., 2016). Ce modèle d'initiation de l'axonogenèse est dans le sens d'une régulation par le cytosquelette d'actine mais des études ont pu démontrer que les MT régulent activement la polarisation des neurones. En effet la phosphorylation des MT par Tau, MAP1B et MAP2 les rendent plus stables dans le futur axone que dans les futures dendrites. Cette

réduction de la stabilité permet de réduire la formation des dendrites tandis que la formation de l'axone continue par polymérisation des MT (Figure 39) (Bradke and Dotti, 2000).

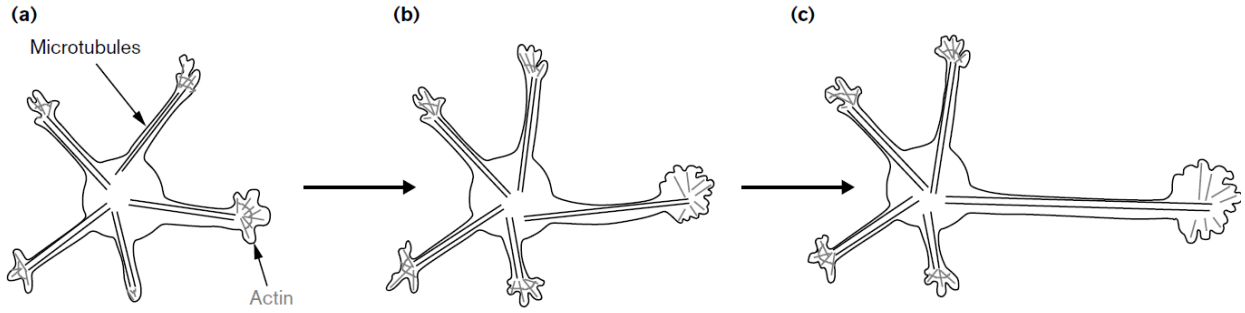


Figure 39: La dynamique des microtubules permet la régulation de la polarisation axonale.
(a) L'instabilité du cytosquelette d'actine permet l'avancée des microtubules et l'initiation de la formation de l'axone
(b) L'instabilité de l'actine continue la formation de l'axone tandis que sa stabilité dans les dendrites empêche leur croissance.
(c) La polymérisation des MT favorise la croissance de l'axone. (D'après Bradke et al., 2000)

De plus, le nombre et la longueur des prolongements de neurones sont également régulés par des MAP tels que DCX et KIF2A (Kalil and Dent, 2014). En effet la délétion du gène codant pour DCX chez la souris provoque une augmentation du nombre de prolongements et de branchements des neurones (Koizumi et al., 2006). Par ailleurs, des études d'inactivation de KIF2A dans des neurones en culture ont mis en évidence un accroissement de la longueur de l'axone avec de nombreuses collatérales secondaires et tertiaires montrant un rôle de la protéine dans la régulation de la croissance axonales (Figure 40) (Homma et al., 2003).

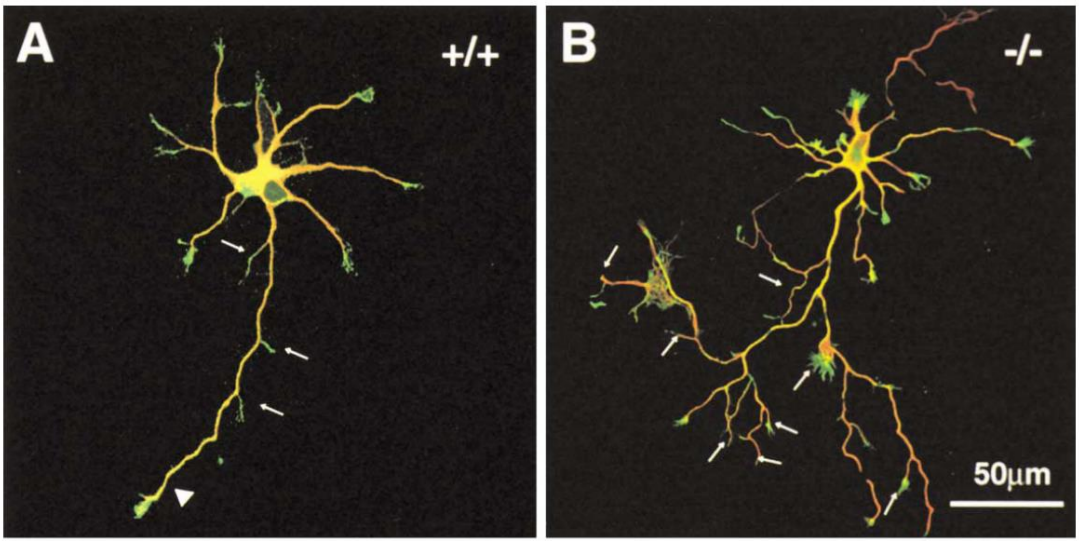


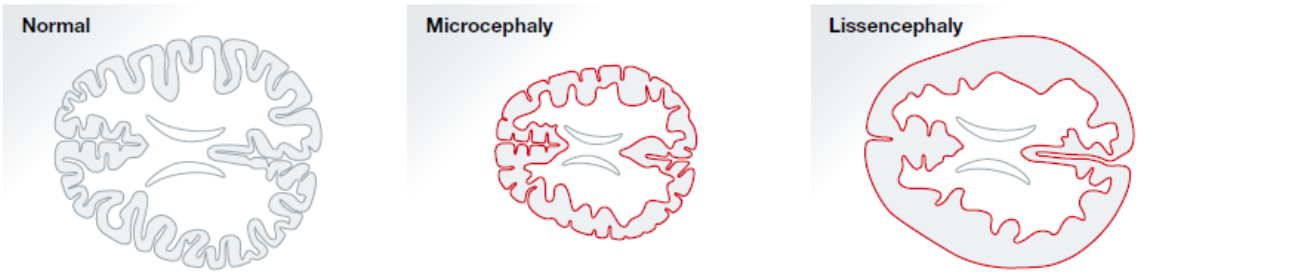
Figure 40: L'activité de KIF2A permet de réguler le nombre et la longueur des prolongements neuronaux.
L'étude de la délétion homozygote de KIF2A a permis de montrer une augmentation drastique du nombre et de la longueur des prolongements dans les neurones n'exprimant plus KIF2A (-/-) (B) par rapport aux neurones exprimant encore la protéine (+/+) (A) (D'après Homma et al., 2003).

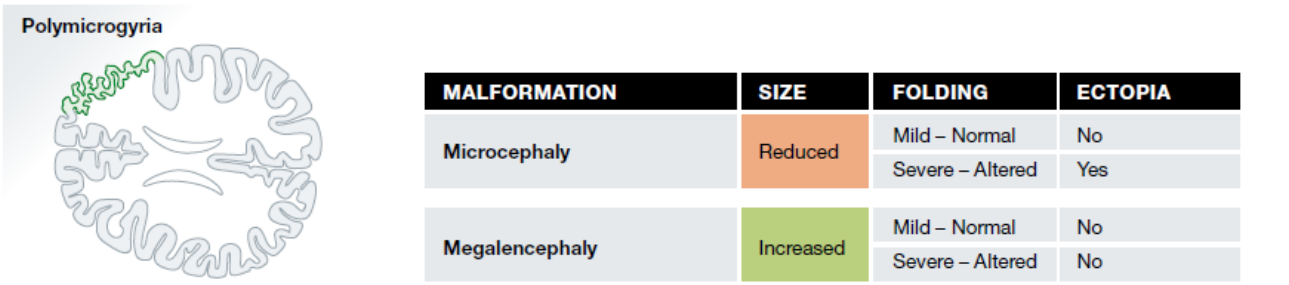
Pour finir, les MT jouent un rôle essentiel dans la synaptogénèse. En effet, par leur rôle de « rail » pour le transport intracellulaire, et grâce à l'aide des protéines motrices responsables du transport axonale, ils permettent la formation et la maintenance de la synapse. Les kinésines responsables du transport antérograde permettent le transport de membrane, protéines présynaptiques et organelles telles que les mitochondries jusqu'au lieu de formation de la synapse, tandis que la dynéine permet de ramener ces composants au corps cellulaire pour leur dégradation et leur recyclage (Winkle et al., 2016; Yagensky et al., 2016).

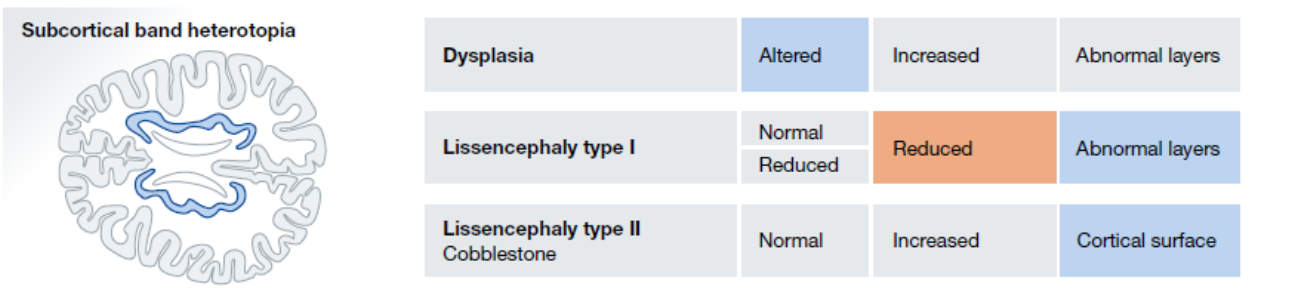
Les malformations du développement cortical

La perturbation ou l'interruption des différents processus du développement cortical expliqués précédemment, peuvent mener à des malformations du développement cortical (MDC). Ces pathologies peuvent avoir une origine environnementale (agent toxique), infectieuse, virale telle que le virus Zika ou génétique. On évalue la contribution génétique à 25% des cas. La majorité des MDC d'origine génétique sont causées par des mutations *de novo* lors de la gamétogenèse parentale ou lors du développement post-zygotique. Les avancées technologiques dans les méthodes de diagnostic génétiques en particulier dans le domaine du séquençage génomique ont permis ces dernières années d'identifier de nombreuses mutations dans des gènes liées aux MDC (Lesca and Depienne, 2015). Sur le plan clinique, l'ensemble les MDC peuvent s'accompagner d'une déficience intellectuelle et de crises d'épilepsie pharmaco-résistantes. (Barkovich et al., 2012; Juric-Sekhar and Hevner, 2019; Lee, 2017). A ce titre, on estime que 40% des épilepsies chez l'enfant sont dites « pharmaco-résistantes » et que 75% des patients ayant des MDC présentent des crises d'épilepsies.

Le spectre de malformations identifiées dans les MDC est très large et une classification a pu émerger en fonction du processus du développement cortical perturbé telle que les malformations due à des défauts de prolifération neuronale ou à l'apoptose comprenant les microcéphalies et les mégalencéphalies et les malformations dues à des anomalies de la migration neuronales comprenant les hétérotopies, les lissencéphalies et les polymicrogyries (Figure 41) (Barkovich et al., 2012). Cependant cette classification en fonction du processus impacté à des limites et certaines malformations telles que les polymicrogyries sont difficiles à répertorier dans cette classification. De plus, il est important de noter que dans cette classification, les MDC chez certains patients sont difficiles à classer car les patients peuvent présenter plusieurs malformations issues de la perturbation de plusieurs processus du développement cortical (Guerrini and Dobyns, 2014). Dans cette partie, nous allons rapporter et expliquer les différentes MDC en fonction du processus développemental perturbé, puis nous détaillerons les MDC liées au gène *KIF2A*, et enfin, nous feront un récapitulatif des différents modèles animaux utilisés en recherche et permettant d'étudier les mécanismes impliqués dans ce type de pathologie.







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

Figure 41: Schéma et tableau illustrant les différentes malformations du développement cortical et leur impact sur la morphologie du cortex.
Cette figure illustre à l'aide de schémas et d'un tableau les différents phénotypes observés dans les différentes malformations du développement cortical. Nous pouvons observer que la réduction de la taille ou de la gyration du cerveau est illustrée en rouge, l'augmentation de ces mêmes propriétés est illustré en vert tandis qu'une altération apparait en bleu (D'après Fernandez et al., 2016).

I. Les malformations du développement cortical liées à un défaut de prolifération ou de l'apoptose.

1. La microcéphalie

La microcéphalie est caractérisée par une réduction du périmètre crânien de plus de 2 déviations standard par rapport à la moyenne de la population saine de même sexe et de même âge. Cette diminution du périmètre crânien est liée à une diminution du volume du cerveau (Figure 41,42) (Gilmore and Walsh, 2013). La majorité des gènes mutés associés aux microcéphalies interviennent

dans la neurogenèse et la division cellulaire, telle que la progression du cycle cellulaire comme les gènes MCPH1, CENPJ et CDK5RAP2, la duplication et la maturation du centrosome telle que NDE1 et CDK5RAP2 ou encore la formation du fuseau mitotique tel que WDR62 et NDE1 (Figure 45). Nous avons pu voir précédemment l'implication des MT et des MAP dans la régulation du fuseau mitotique, c'est pourquoi de nombreux gènes codant pour les composants des MT tels que TUBA1A, TUBB2B, TUBB3 et TUBG1 mais également des mutations dans des gènes codants pour les MAP et protéine interagissant avec les MAP tels que LIS1, DCX, DYNC1H1, NDEL1, KIF5C et KIF2A ont pu être identifié chez des patients présentant une microcéphalie (Figure 45,46). L'ensemble des mutations dans ces gènes mène à une modification de la balance proliférative et une diminution du nombre de neurones formés lors de la neurogenèse (Barkovich et al., 2012; Desikan and Barkovich, 2016; Gilmore and Walsh, 2013) Mais ces mutations peuvent aussi mener à des anomalies d'alignement des chromosomes ou à une duplication du centrosome activant la voie p53 illustrée précédemment et mener finalement à la mort cellulaire par apoptose (Breuss et al., 2016; Marthiens et al., 2013). De plus, des mutations dans des gènes telles que MCPH1, NBN ou RAD50 impliqués dans la réparation de l'ADN ont pu être identifiées, créant un lien entre un défaut de réparation de l'ADN lors du développement cortical et l'induction de la microcéphalie par perturbation de la prolifération ou de la mort cellulaire (Figure 45) (Gilmore and Walsh, 2013). De plus, il existe un autre type de microcéphalie se développant après la naissance semblant être lié à des défauts post-mitotiques (Passemard et al., 2017; Seltzer and Paciorkowski, 2014).

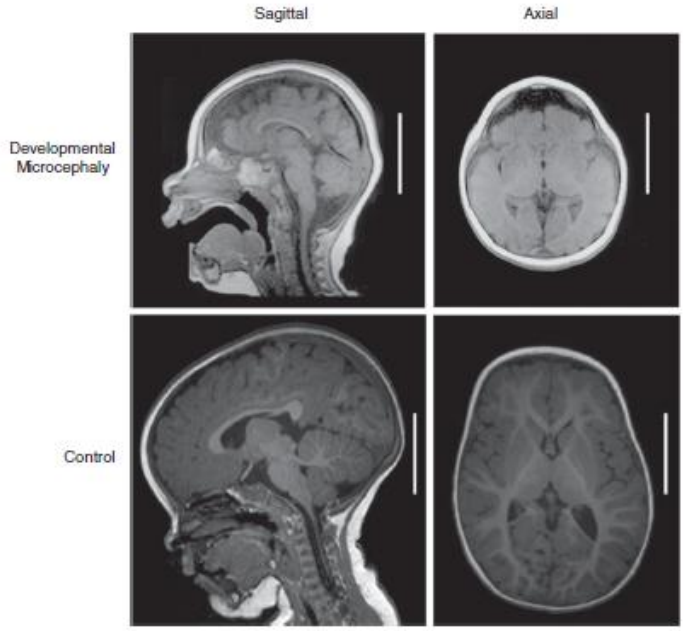


Figure 42: IRM d'un patient présentant une microcéphalie.
Images d'IRM de deux enfants de 12 mois. L'IRM du patient en haut présente une microcéphalie avec une réduction du volume cortical par rapport au patient sain en bas. (D'après Gilmore et al. 2012)

2. La mégalencéphalie

La mégalencéphalie est caractérisée par un volume du cerveau excédant trois fois la déviation standard par rapport à la moyenne des personnes saines, de même sexe et de même âge (Guerrini and Dobyns, 2014). Dans certain cas, cette augmentation du volume du cerveau peut être unilatérale et être appelée hémimégalencéphalie. La mégalencéphalie a souvent été classifiée comme une anomalie de la taille du cerveau mais elle est dans la majorité des cas syndromique et accompagnée de nombreuses autres malformations telles que le syndrome MPPH (Macrocéphalie, polymicrogyrie, polydactylie, hydrocéphalie) ou MCAP (macrocéphalie, malformation capillaire). Ce type de malformation est liée à une production élevée de progéniteurs et de neurones due à un raccourcissement ou à une réentrée dans le cycle cellulaire mais également dans certains cas à une diminution voir une absence d'apoptose. Des études récentes ont permis d'identifier chez des patients présentant cette malformation, des mutations dans les gènes de la voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la survie, l'organisation du cytosquelette et l'autophagie (D'Gama et al., 2015; Laplante and Sabatini, 2012; Lee et al., 2012; Rivière et al., 2012).

3. Les dysplasies corticales focales

Les dysplasies corticales focales (DCF) sont caractérisées par des lésions plus limitées que celle observées dans les mégalencéphalie. Dans la majorité des cas elles sont restreintes à un ou deux lobes corticaux avec la présence de neurones dits dysplasiques qui sont une cause majoritaire d'épilepsies pharmaco-résistantes. Des analyses histologiques et génétiques de ces lésions ont permis de distinguer trois classes. La première classe des DCF de type 1 est caractérisée par des anomalies de la lamination du cortex, celle de type 2 par une perte de lamination et la présence de neurones dysmorphiques et de cellules ballonisées. Tandis que le type 3 comprend les DCF associées à une lésion du cerveau telle qu'une tumeur cérébrale. L'ensemble de ces DCF a pu être mis en lien avec des anomalies neuronales focales et des études génétiques ont pu identifier chez des patients présentant ces malformations, des mutations dans les gènes de la voie mTOR tel que mTOR, GATOR1,DEPDC5 et NPRL2 NPRL3 (Baldassari et al., 2019; Barkovich et al., 2012; Baulac et al., 2015; Desikan and Barkovich, 2016; Møller et al., 2016; Parrini et al., 2016; Ribierre et al., 2018; Weckhuysen et al., 2016).

II. Les malformations du développement cortical liées à un défaut de migration neuronale

L'ensemble des malformations décrites dans cette partie sont souvent présentées comme étant liées à des anomalies de migration neuronale. Cependant, de nombreuses anomalies de migration sont subséquentes soit à des anomalies lors de la prolifération telles que des modifications de la longueur du cycle cellulaire et du moment de naissance des neurones, soit à des anomalies de polarisation des cellules neuronales (Juric-Sekhar and Hevner, 2019).

1. Les lissencéphalies

Les lissencéphalies (LIS) sont divisées en deux sous types : Les LIS de type I lorsqu'elles sont induites par une sous-migration (type I) ou les LIS de type II ou Cobblestone lorsque la migration est trop importante. Les LIS de type I se traduisent par une absence de gyration, appelé agyrie, des gyri anormalement sous-développées et profondes appelée pachygyrie ou la présence de neurones ectopiques en bande sous le cortex appelée hétérotopie subcorticale en bande ou « double cortex » (Figure 41). Le cortex des patients atteint de cette malformation prend une apparence plus épaisse et est souvent associé à d'autres malformations telles que des ventricules latéraux plus larges, une modification de l'épaisseur du corps calleux et des anomalies du cervelet. De plus, les LIS peuvent être associées à une microcéphalie et prendre le nom de microlissencéphalie. La majorité des lissencéphalies de type I est associée à des mutations dans des gènes liés au MT, tels que les sous-unités de tubuline (tubulinopathies) que nous détaillerons dans une prochaine partie, mais aussi les MAP et protéines interagissant avec les MAP tel que LIS1, DCX, DYNC1H1, KIF5C et KIF2A (Figure 46) (Cavallin et al., 2016; Di Donato et al., 2018; Jang et al., 2013; Leventer et al., 2001; Pilz et al., 1998; Poirier et al., 2013; Sicca et al., 2003; Uyanik et al., 2007). Cependant certaines LIS de type I sont liées à des mutations dans des gènes non liés aux MT, tels que des mutations dans le gène codant pour la RELN dont nous avons détaillé le rôle précédemment et dans le gène *ARX* qui code pour un facteur de transcription (Desikan and Barkovich, 2016; Juric-Sekhar and Hevner, 2019; Romero et al., 2018). Récemment, l'identification de ces différents gènes et les avancées technologiques dans le domaine du diagnostic génétique ont permis de diagnostiquer les mutations d'une large cohorte mondiale de 811 patients atteint de LIS de type I, avec un pourcentage remarquable de 81% de diagnostic (Di Donato et al., 2018)

Les LIS de type II appelées aussi LIS Cobblestone sont liées à une anomalie de migration neuronale et gliale dans l'espace sous-arachnoïdien situé dans les méninges à la superficie du cerveau (over

migration). A l'IRM, les LIS de type II peuvent prendre deux formes, une première pouvant être confondue avec la polymicrogyrie que nous détaillerons lors d'une prochaine partie lorsque les amas de neurones dans les méninges sont espacés, et une deuxième mimant les lissencéphalies de type I lorsque les amas de neurones sont diffus (Figure 43). Cette sur-migration résulte d'un problème de fixation du prolongement basal des GR à la surface piale du cortex menant à des anomalies de la lamination du cortex. De plus, la majorité des patients atteint de LIS de type II présentent également une dystrophie musculaire, des anomalies rétiniennes et du cervelet (Desikan and Barkovich, 2016; Romero et al., 2018). Un grand nombre de gènes mutés identifiés dans ce type de LIS sont liés à une anomalie de la O-glycosylation de l'α-dystroglycan et le dépôt de la laminine α 1 au niveau du « pied » basal de la GR essentiel à l'encrage de celle-ci à la surface piale secondaire à des mutations dans les protéines LAMB1, LAMB2 et LAMC3 (Figure 45) (Barkovich et al., 2012; Luo et al., 2011; Myshrall et al., 2012).

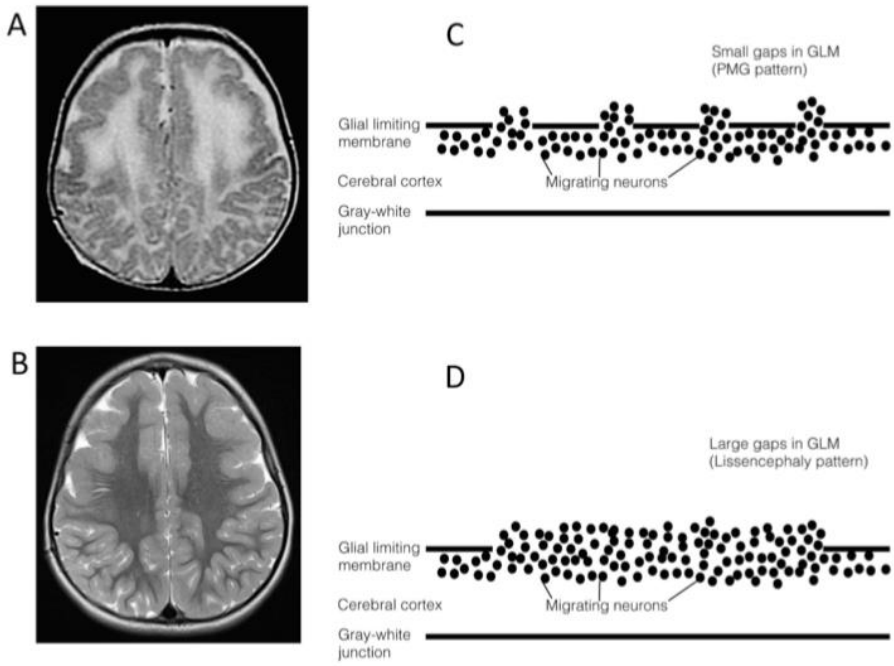


Figure 43: Les lissencéphalies de type Cobblestone peuvent prendre la forme d'une polymicrogyrie ou d'une lissencéphalie de type I.
Lorsque les neurones ectopiques dans les méninges sont espacés, la lissencéphalie de type Cobblestone prend à l'IRM l'apparence d'une polymicrogyrie (A,C) tandis que si les neurones ectopiques sont organisés de manière diffuse, la malformation prend l'apparence d'une lissencéphalie de type I (B,D). (D'après Desikan et al. 2016)

2. Les tubulinopathies

De nombreuses mutations dans les gènes codant pour des sous unités de la tubulines ont été identifiées chez des patients présentant des lissencéphalies, pachygyries et hétérotopies subcorticales

en bande ce qui a permis de les regrouper sous le terme de tubulinopathies. La première mutation à avoir été reliée à une LIS de type I, se situe dans *TUBA1A*, codant pour une sous unité de l'α-tubuline. Des mutations dans d'autres gènes codant pour des sous-unités de tubulines ont pu être identifiées telles que *TUBB2A, TUBB2B, TUBB3* et *TUBB5* codant pour des β-tubulines, mais aussi *TUBG1* codant pour la γ-tubuline (Figure 45,46) (Bahi-Buisson et al., 2014; Brock et al., 2018; Cushion et al., 2014; Di Donato et al., 2018; Fallet-Bianco et al., 2008; Ivanova et al., 2019; Jaglin et al., 2009; Keays et al., 2007; Morris-Rosendahl et al., 2008; Poirier et al., 2010, 2013, 2007; Romaniello et al., 2015; Tian et al., 2010; Yuen et al., 2019). Ces mutations faux-sens *de novo* entrainent des perturbations de la fixation de la GTP et des interactions protéine-protéine menant à des anomalies de la dynamique des MT (Romaniello et al., 2015). Comme nous avons pu le voir précédemment, les MT étant impliqués dans un très grand nombre de processus lors du développement cortical, ces différentes mutations dans la tubuline mènent à un large spectre de malformations liées à des
anomalies dans des processus variés lors de la migration et de la différentiation neuronale (Bahi-Buisson et al., 2014) (Figure 44).

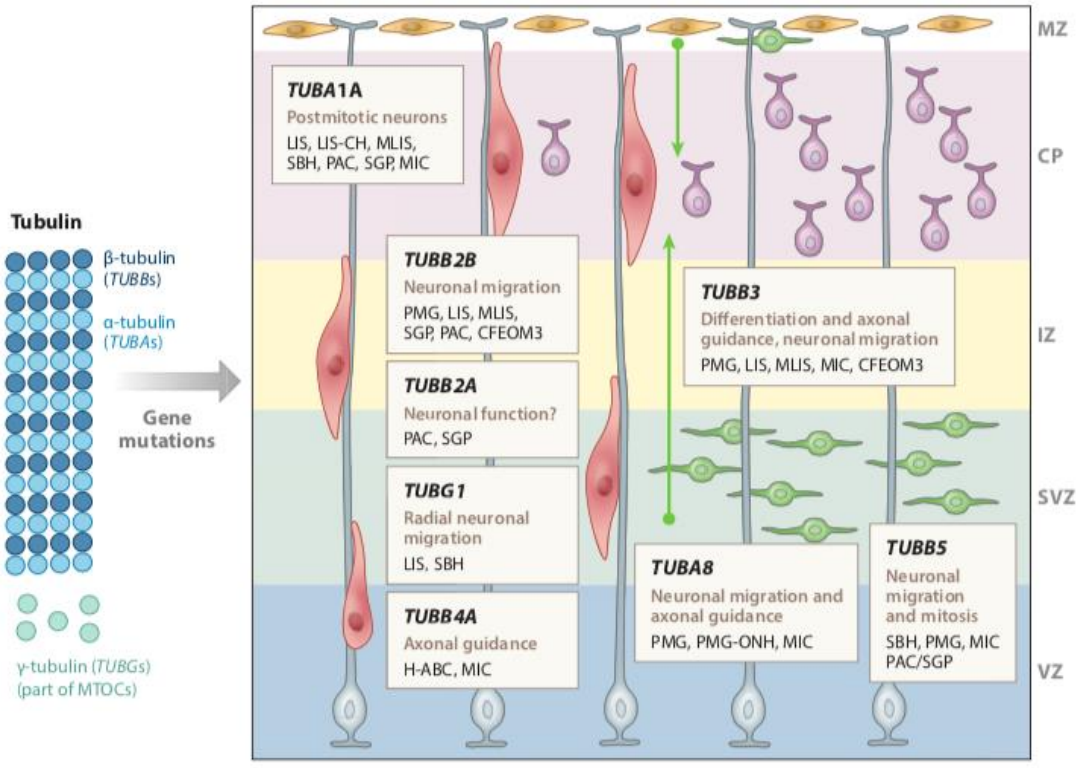


Figure 44: Les tubulinopathies : De nombreux mécanismes impliqués menant à un large spectre de malformations du développement cortical.
Les microtubules étant largement impliqués lors du développement cortical, les mutations dans les sous unités α, β et γ de la tubuline mènent à de nombreux processus perturbés tels que la migration neuronale et l'axonogenèse provoquant un large spectre de MDC. VZ : zone ventriculaire, SVZ : zone sous-ventriculaire, IZ : zone intermédiaire, CP : plaque corticale, MZ : zone marginale (D'après Juric-Sekhar et al., 2019).

3. Les hétérotopies nodulaires périventriculaires et hétérotopies « en ruban »

Lors du développement cortical, les différentes étapes de prolifération des progéniteurs se déroulent proche du ventricule dans la VZ et SVZ. Si les neurones nouvellement formés à ce niveau n'arrivent pas à initier leur migration vers la plaque corticale, ils s'accumulent en bordure du ventricule formant des petits amas de neurones en nodule appelés hétérotopies nodulaires périventriculaires (HNP) (Figure 41). Les HNP représentent environ 30% des MDC liées à un défaut de migration neuronale. Souvent, les patients présentant uniquement des HNP ne présentent pas d'anomalie sévère du cortex et donc ne présentent pas de déficience intellectuelle mais essentiellement de l'épilepsie liée à la présence des nodules de cellules. Cependant, la majorité des HNP sont syndromiques et associées à des malformations de l'hippocampe, du cervelet ou du cortex (Desikan and Barkovich, 2016; Francis et al., 2006; Romero et al., 2018). Les mutations les plus fréquemment identifiées dans ce type de malformations sont localisées dans le gène codant pour la filamine A (*FLNA*) impliquée dans le remodelage du cytosquelette d'actine lors de la migration neuronale (Parrini et al., 2006). Des analyses chez la souris et en post-mortem sur le cerveau d'un patient atteint de HNP reliée à une mutation *FLNA* ont permis de mettre en évidence une perturbation de la membrane neuroépithéliale menant à un décrochage des GR au niveau apical (Carabalona et al., 2012). D'autres mutations plus rares ont pu être identifiées dans ARFGEF2, une protéine responsable du transport intracellulaire de membranes et de vésicules, FAT4 et DCHS1 responsables de l'adhésion cellulaire et NEDD4L ayant un rôle dans l'ubiquitination et lié à la voie mTOR, l'ensemble de ces mutations ouvrant la porte à de nouveaux mécanismes pouvant expliquer les HNP (Figure 45) (Broix et al., 2016; Cappello et al., 2013; Sheen et al., 2004).

Des cas d'hétérotopies massives dites « en ruban » ont pu être identifiés chez des patients présentant une mutation dans le gène EML1 codant pour une protéine associée aux microtubules. La structure de ces hétérotopies est différente de celles observées chez les HNP et les hétérotopies subcorticales en bande, en effet les patients présentent une accumulation massive de cellules tout le long du cortex. Ce type d'hétérotopie est causé par le déplacement d'une grande quantité de progéniteurs dans la zone intermédiaire, cependant le mécanisme expliquant l'accumulation d'une telle quantité de cellules sous le cortex est encore très peu élucidée mais le rôle de EML1 au niveau des microtubules et sa localisation dans la VZ-SVZ tend vers une anomalie de la fixation des GR au niveau apical et basal lié à une perturbation de la formation du cil primaire (Guarnieri et al., 2018; Kielar et al., 2014; Uzquiano et al., 2019).

4. Les polymicrogyries

Les polymicrogyries se traduisent par un nombre anormal de petits gyri faisant prendre au cortex une apparence ondulée (Figure 41). Ces malformations sont très hétérogènes et peuvent être focale, multifocale ou diffuse et concerner uniquement un hémisphère où les deux. Elles peuvent être isolées mais sont souvent associées à d'autre MDC sous forme syndromique comme dans le syndrome d'Aicardi et le syndrome de Delleman (Barkovich, 2010). Les études génétiques des patients atteints de polymicrogyrie ont pu identifier des mutations dans des gènes tels que *WDR62* ou *NDE1*, des gènes codant pour des protéines associées aux microtubules tels que *KIF1B, TUBA1A, TUBB2B, TUBB3* et *DYNC1H1*, mais également une implication de la voie mTOR avec des mutations dans *AKT3* et *mTOR* (Romero et al., 2018) et de la phosphorylation du phosphatidylinositol avec des mutations dans *FIG4* (Baulac et al., 2014). Cette malformation est souvent regroupée dans les anomalies de la migration neuronale cependant les mécanismes physiopathologiques des polymicrogyries sont encore très peu élucidés et l'utilisation des modèles murins lissencéphales ne permet pas d'apporter des réponses suffisantes sur les mécanismes physiopathologiques sous tendant cette pathologie. Dans ce contexte deux hypothèses s'affrontent : la première a été émise par Jaglin et coll. où par analyse histologique post-mortem d'un cerveau de fœtus atteint de polymicrogyrie, ces auteurs ont pu mettre en évidence des anomalies de fixation des glies radiaires à la surface piale (Jaglin et al., 2009). Cependant d'autres études suggèrent que les malformations présentant des anomalies de fixation des glies radiaires à la surface piale ne sont pas réellement des polymicrogyries mais plutôt des LIS de type Cobblestone prenant l'apparence de polymicrogyrie à l'IRM comme illustré précédemment (Barkovich et al., 2012; Jansen and Andermann, 2005).

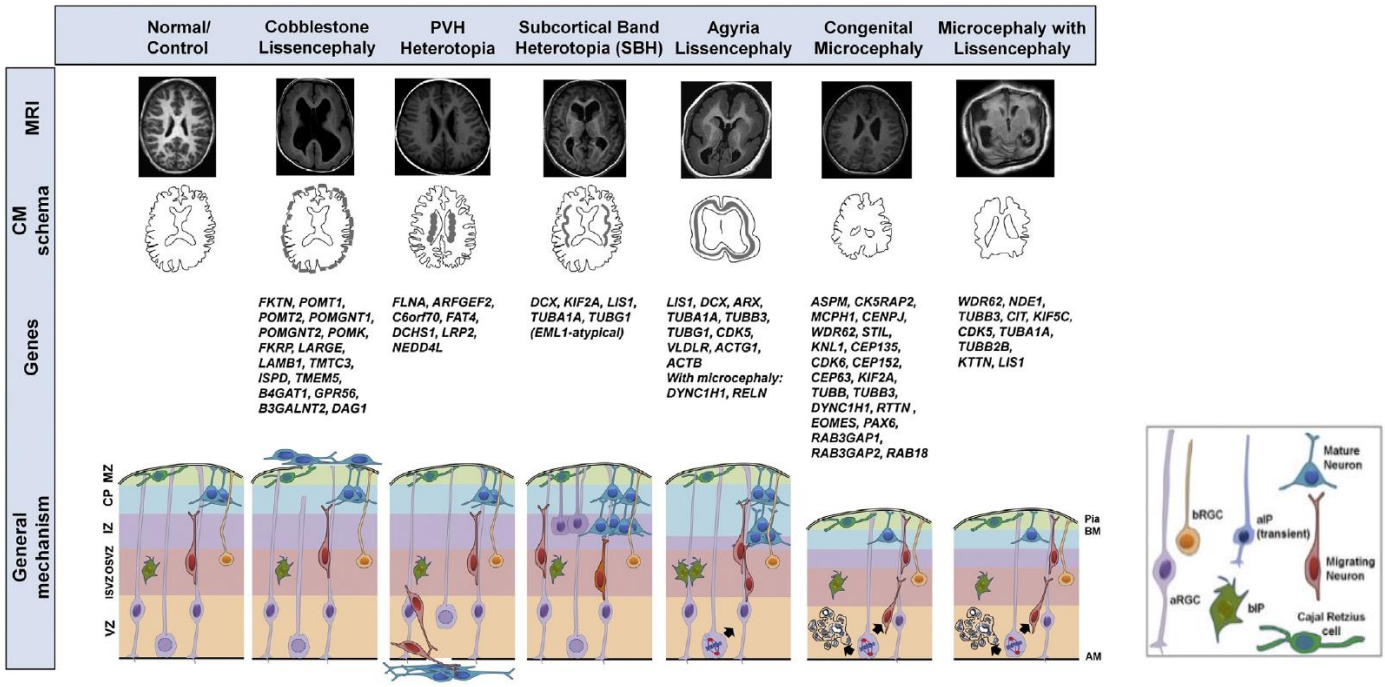


Figure 45: Tableau récapitulatif des malformations du développement cortical et des mécanismes impliqués.
Ce tableau récapitulatif comprend un IRM type et son schéma associé, les gènes mutés identifiés et les mécanismes perturbés par ces mutations lors du développement cortical pour chaque type de MDC décrit précédemment. VZ : zone ventriculaire, SVZ : zone sous-ventriculaire, IZ : zone intermédiaire, CP : plaque corticale, MZ : zone marginale, aRGC : cellule de la glie radiaire apicale, bRGC : cellule de la glie radiaire basale, aIP : progéniteur intermédiaire apical, bIP : progéniteur intermédiaire basal (D'après Romero et al., 2018).

III. Les malformations associées aux mutations dans le gène KIF2A.

Plusieurs mutations dans le gène codant pour la protéine KIF2A ont été identifiées chez des patients présentant des MDC. Ces patients présentent une pachygyrie bilatérale plus ou moins étendue associée dans certain cas à une microcéphalie, des hétérotopies subcorticales en bande et un corps calleux sous-développé. L'ensemble des mutations identifiées dans KIF2A sont toutes hétérozygotes *de novo* et localisées dans le domaine moteur de la protéine et plus précisément dans ou aux abords du domaine de fixation de l'ATP (Cavallin et al., 2016; Poirier et al., 2013; Tian et al., 2016). Les deux premières mutations p.His321Asp (c.961C>G) et p.Ser317Asn (c.950G>A) ont été identifiées en 2013 par séquençage d'exome entier (Figure 47) (Poirier et al., 2013). En 2016, deux laboratoires ont pu identifier 2 nouvelles mutations chez des patients présentant des MDC similaires aux deux premières identifiées : p.His321Pro et p.Thr320Ile (Figure 46) (Cavallin et al., 2016; Tian et al., 2016). Parmi les signes cliniques, les patients présentent une DI sévère, des déficiences motrices et des crises d'épilepsies pharmaco-résistantes (Figure 47). De plus, des études immuno-cytochimiques réalisées sur les fibroblastes de patients montrent une localisation anormale de KIF2A suggérant une séquestration de KIF2A aux MT, perdant sa localisation diffuse à travers le cytoplasme dans une

condition normale (Figure 48). L'intégralité des travaux sur les mécanismes physiopathologiques liés à ces mutations de KIF2A seront détaillés dans la partie résultat de cette thèse.

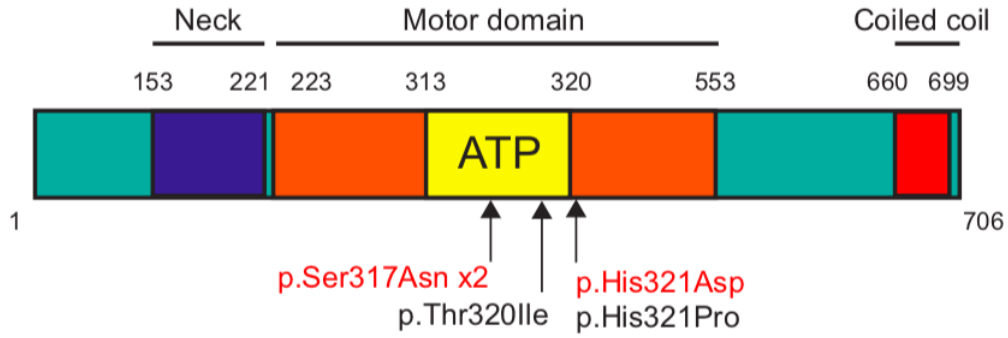


Figure 46: Schéma illustrant la localisation des différentes mutations de *KIF2A* identifiées chez des patients atteint de malformations du développement cortical.
L'ensemble des 4 mutations identifiées chez 5 patients présentant des MDC se situe dans le domaine moteur de KIF2A et plus précisément dans ou aux abords du domaine de liaison à l'ATP (D'après Broix et al., 2017).

	Poirier et al	Poirier et al	Patient 1	Patient 2
Mutation	c.961C>G p.His321Asp de novo	c.950G>A p.Ser317Asn de novo	c.950G>A p.Ser317Asn de novo	c.962A>C p.His321Pro de novo
Sex	Female	Female	Female	Male
Neonatal parameters	2060 g (−3 SDS) 45 cm (−3,5 SDS) 32 cm (−3,5 SDS)	2930 (−1 SDS) 47.5 (−1.5 SDS) 30 (−2.5 SDS)	2900 g (0.5 SDS) 40 cm (−1 SDS) 30 cm (−2.5 SDS)	3460 g (−0.2 SDS)
Age at last evaluation	4 years 10 months	8 years	9 months	13 years
Head circumference at last evaluation	43 cm (−5 SDS)	44 cm (<−4 SDS)	40 cm (− 4 SDS)	51.5 cm (−1 SDS) (at 8 years)
Weight	9.4 kg (−7 SDS)	20.9 kg (−1 SDS)	9.46 kg (− 1 SDS)	32 kg (−2.4 SDS)
Length	88.5 cm (−8 SDS)	112 cm (−2.5 SDS)	67 cm (−1 SDS)	148 cm (−2 SDS)
Dysmorphic features	Minor signs small ears, mildly enlarged nose bridge, thin tented lips.	Minor signs slightly long nose, mildly short philtrum	Minor signs round face, subtle synophrys, thin tented lips	Minor signs Broad but sparse eyebrows a tented mouth
Developmental delay (DD)	Spastic tetraplegia Cortical blindness (nystagmus) Scoliosis	Spastic tetraplegia Cortical blindness (nystagmus)	Spastic tetraplegia Axial hypotonia	Spastic tetraplegia Axial hypotonia Nystagmus (cone/rod dysfunction) Scoliosis
Motor ability	Virtually no development	Virtually no development	Virtually no development	Virtually no development
Autistic features	Absent	Absent	Absent	Absent
Epilepsy	Neonatal seizures Seizure control at 3.5 years with GVB and VPA	Neonatal seizures Seizure control	Absent	Neonatal seizures Poor seizure control
Cortical malformations	Posterior agyria Thin corpus callosum	Posterior Agyria and frontal pachygyria	Posterior Agyria and frontal pachygyria	Posterior Agyria and frontal pachygyria
Reference	[8]	[8]	This report	This report

Figure 47: Tableau clinique de 4 parmi les cinq patients présentant une mutation dans le gène *KIF2A*.
(D'après Cavallin et al., 2016)

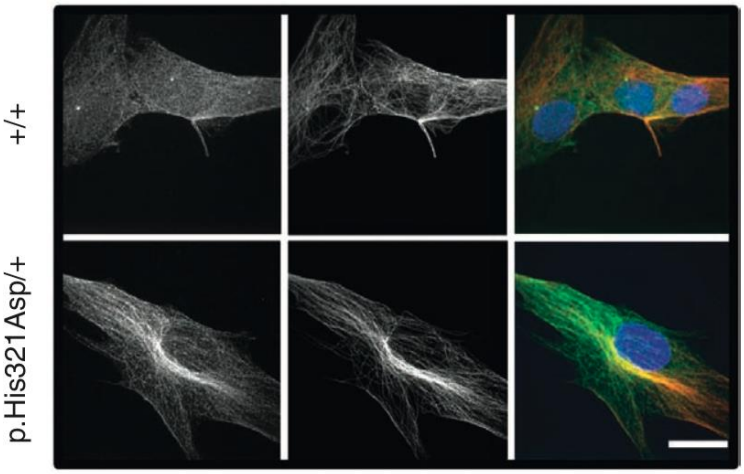


Figure 48: La mutation p.His321Asp provoque une localisation anormale de KIF2A aux microtubules.
L'analyse des fibroblastes du patient présentant la mutation p.His321Asp a permis de démontrer que les mutations dans la protéine KIF2A liée aux MDC provoque une localisation anormale de KIF2A séquestrée aux MT en comparaison à la localisation diffuse dans le cytoplasme dans les fibroblastes contrôles (+/+) (D'après Poirier et al., 2013).

IV. Les modèles animaux utilisés pour l'étude des malformations du développement cortical

Les modèles animaux les plus utilisés pour étudier la physiopathologie des MDC sont le modèles rat et souris. Ces rongeurs sont lissencéphales et donc ne permettent pas de modéliser parfaitement les MDC induisant des anomalies de la gyration. Cependant, le développement cortical étant très conservé entre l'homme et la souris, et la majorité des gènes identifiés chez les patients étant exprimés chez la souris, l'utilisation de ce type de modèles permet de modéliser et mieux comprendre les différents mécanismes perturbés induisant les MDC (Wong and Roper, 2016). Les trois grands types d'approches utilisées pour étudier les processus neuro-développementaux impliqués dans les MDC sont l'électroporation *in-utero* de souris gestantes, les souris dites « knock-out » pour un gène lorsqu'elle ne l'exprime plus, et « knock-in » lorsqu'elles expriment le gène avec une mutation faux-sens.

1. L'électroporation *in-utero*

L'électroporation *in-utero* (EIU) est la méthode la plus rapide pour étudier le développement cortical et l'impact des mutations identifiées chez les patients présentant des MDC. Cette technique consiste en l'injection d'une solution contenant de l'ADN sauvage ou muté du gène à étudier, ou de l'ARN interférant (ARNi) ou une construction exprimant un sh-RNA ciblant un gène d'intérêt a inactivé, dans le ventricule d'embryons en cours de développement. Au cours de cette manipulation, une femelle gestante est anesthésiée puis une chirurgie est pratiquée pour mettre en évidence les cornes utérines contenant les embryons. Ensuite la solution contenant l'ADN ou l'ARNi est injectée dans un des deux ventricules latéraux de l'embryon à l'aide d'un capillaire. L'ADN étant chargé négativement, une impulsion électrique transmise par des électrodes est utilisée pour faire pénétrer et guider l'ADN dans une faible population de progéniteurs bordant le ventricule (Figure 49). De plus, l'orientation et l'angle entre ces électrodes permettent de choisir la structure du cerveau étudiée. Enfin, les cornes utérines sont replacées dans l'abdomen de la femelle et des sutures sont pratiquées afin que le développement

des embryons injectés puisse se poursuivre. L'ADN cible étant injecté avec un gène rapporteur tel que la GFP, il est ensuite possible de suivre la prolifération et les processus de migration et différentiation des cellules surexprimant la construction injectée et de voir l'influence de celle-ci sur le développement cortical. Cette méthode est très rapide et ne nécessite pas le développement d'une souris génétiquement modifiée, cependant elle ne peut pas parfaitement modéliser la pathologie des MDC car tout d'abord uniquement une faible population de neurones peut être étudiée et le développement de ceux-ci se réalise à travers un cortex sain. Mais aussi par le fait que cette technique permet la surexpression des mutations et donc ne permet pas leur étude dans un cadre physiologique (Pacary et al., 2012; Shimogori and Ogawa, 2008).

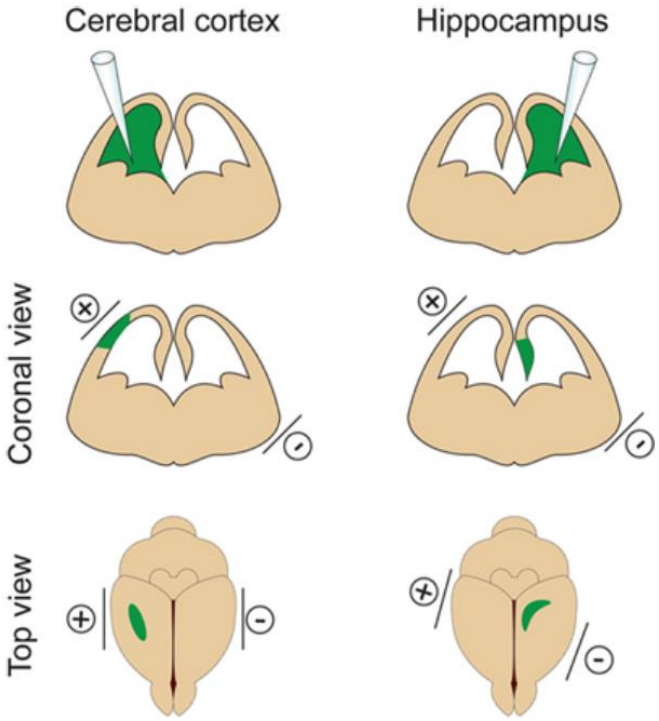


Figure 49 : La technique d'électroporation *in-utero.*
La première étape consiste en l'injection d'une solution (en vert) contenant l'ADN du gène cible à étudier dans un des ventricules latéraux. L'utilisation d'électrodes et d'une impulsion électrique permet de faire pénétrer la construction dans une faible population de progéniteurs et suivre leur évolution au cours du développement cortical (D'après Pacary et al., 2012).

2. Les modèles souris « knock-out »

Les modèles souris dites « knock-out » (KO) permettent l'inactivation d'un gène d'intérêt et d'étudier l'impact de l'absence de la protéine sur le développement cortical. Cette méthode a été très largement utilisée ces dernières années et a permis de nombreuses avancées dans la compréhension des processus du développement cortical mais aussi dans les mécanismes physiopathologiques des MDC. Dans le cadre des LIS, les modèles KO les plus étudiés ont été ceux pour les gènes *LIS1*, *RELN* et *DCX*. Le modèle homozygote KO *LIS1* n'étant pas viable et létal durant l'embryogénèse, la majorité des explorations ont été réalisées sur le modèle hétérozygote. De manière surprenante le modèle hétérozygote ne présente pas d'anomalie majeure du cortex mais des anomalies de la structure de

l'hippocampe. De plus, 5% de ces souris présentent des crises d'épilepsie (Hirotsune et al., 1998). Une étude plus précise de l'impact du KO hétérozygote *LIS1* sur le développement de l'hippocampe a pu montrer une fragmentation de l'ensemble des couches de l'hippocampe (CA1, CA3, Gyrus denté) conséquent à des anomalies de migration des neurones hippocampiques (Fleck et al., 2000)
De manière intéressante, l'étude du modèle KO *DCX* a fourni des résultats similaires à ceux observés avec *LIS1*, avec une absence notoire d'anomalies corticales et des problèmes dans la couche CA3 de l'hippocampe avec des neurones mal positionnés et présentant une morphologie anormale. L'étude par électro-encéphalogramme (EEG) de ces souris a permis de mettre en évidence des crises d'épilepsies spontanées dans ce modèle murin (Bazelot et al., 2012; Nosten-Bertrand et al., 2008).
En ce qui concerne l'étude des tubulinopathies, l'étude du modèle KO TUBB3 a permis de mettre en évidence des anomalies de la migration neuronale avec une accumulation de neurones bloqués dans la ZI, et un effet sur la prolifération avec une diminution du nombre de progéniteurs intermédiaires (Saillour et al., 2014).

Par ailleurs, l'étude du modèle KO *KIF2A* a permis de mettre en évidence l'implication de cette protéine dans le développement cortical. Le modèle murin homozygote n'étant viable qu'un jour, l'intégralité de la caractérisation de ce modèle a été réalisée lors du développement cortical. Les différentes analyses ont permis d'identifier une anomalie de la migration neuronale dans le cortex avec une accumulation de neurones dans la ZI et dans l'hippocampe avec une double couche dans les structures CA1 et CA3 (Homma et al., 2003). Plus récemment, ces auteurs ont utilisé ce même modèle couplé à la technologie Cre-ERT2, permettant le contrôle temporel de l'induction de la mutation et de mettre en évidence le rôle post-natal de *KIF2A* dans le développement des connections hippocampiques avec des anomalies de la morphologie neuronale couplées à des crises d'épilepsie induites par l'inactivation post-natale de KIF2A (Homma et al., 2018).

L'absence d'anomalies corticales lors de l'étude de certains modèles KO montre les limites de l'utilisation de ce type de modèle dans l'étude des MDC. En effet, pour les MDC dues à des mutations faux-sens et non pas à une haplo-insuffisance, l'utilisation de ce type de modèle ne permet pas de modéliser l'anomalie génétique présente chez les patients et donc dans de nombreux cas de ne pas permettre de modéliser les phénotypes corticaux.

3. Les modèles souris « Knock-in »

Les modèles souris « Knock-in » (KI) peuvent soient être générées par modifications génétiques afin d'insérer dans leur génome une mutation identifiée chez un patient, soient exprimer de manière spontanée par une mutation faux-sens dans un gène impliqué lors du développement cortical et servir de modèle d'étude. C'est le cas du modèle souris Reeler qui présente une mutation spontanée dans le gène codant pour la RELN. Ce modèle a été largement étudié car il modélise précisément la pathologie humaine avec la présence d'une lamination inversée et désorganisée du cortex, des hétérotopies au niveau du cortex et de l'hippocampe et des anomalies du cervelet avec une diminution du nombre de cellules de Purkinje (D'Arcangelo et al., 1995; Ogawa et al., 1995).

Les modèles KI exprimant une mutation identifiée chez des patients atteint de MDC peuvent être générés soit par ingénierie génétique, soit par utilisation d'agents mutagènes. Cette technique présente l'avantage de pouvoir modéliser parfaitement l'anomalie génétique du patient et de pouvoir mieux modéliser les phénotypes corticaux impliqués dans les MDC. De nombreux modèle KI pour les gènes de la tubuline ont été générés pour mieux comprendre la physiopathologie des tubulinopathies. Parmi eux le modèle pour la mutation S140G de *TUBA1A* présentant des anomalies de l'organisation des couches corticales et hippocampiques et une hypotrophie généralisée de la souris associée à une microcéphalie. L'ensemble de ces phénotypes cérébraux entrainant des phénotypes comportementaux tels qu'une hyperactivité (Keays et al., 2007). L'analyse du modèle KI *TUBG1* pour la mutation p.Tyr92Cys a permis de modéliser les phénotypes présents chez le patient, tels qu'une microcéphalie et des anomalies de la migration neuronale dans le cortex et l'hippocampe. De plus, les analyses comportementales et d'EEG ont permis de reproduire les phénotypes cliniques avec des conséquences sur la mémoire, une hyperactivité et une susceptibilité accrue à l'épilepsie. L'ensemble des résultats concernant l'étude de ce modèle est rapporté dans la partie « travaux annexes » de cette thèse (Ivanova et al., 2019).

4. La technologie Cre-Lox

Un grand nombre de modèles KO générés par ingénierie génétique présentés précédemment utilise la technologie Cre-Lox. Cette technologie est basée sur l'utilisation de la Cre-recombinase (CRE), une protéine provenant du bactériophage P1 qui par reconnaissance de séquences spécifiques LoxP sur l'ADN permet la recombinaison de la séquence située entre les deux sites LoxP. En effet, si les deux sites LoxP sur la séquence d'ADN sont orientés dans le même sens, la CRE permet l'excision de la séquence située entre ces deux sites tandis que si ces deux sites LoxP sont orientés en sens inverse, la CRE permet l'inversion de la séquence d'intérêt (Figure 50) (Hoess et al., 1982; Sternberg and

Hamilton, 1981). Cette technologie a pu être très largement utilisée dans la génération de KO, par délétion d'une séquence indispensable à une protéine mais aussi afin d'activer l'expression d'une séquence donnée par inversion. Mais le principal atout de cette technologie réside dans le fait qu'elle soit inductible et contrôlable dans l'espace et dans le temps.

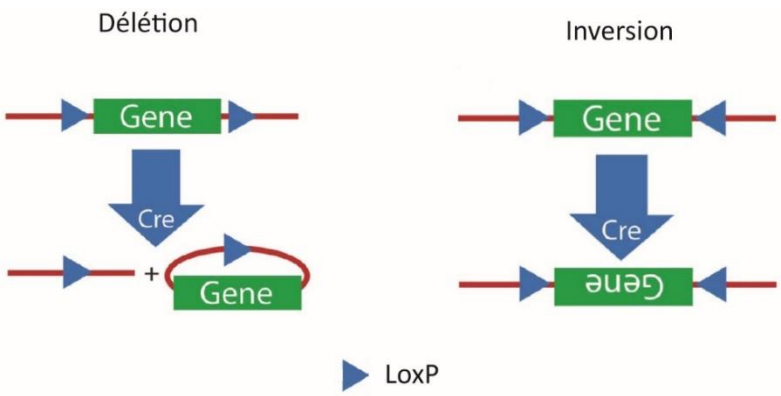


Figure 50 : La technologie Cre-Lox. L'utilisation de la Cre-recombinase du bactériophage P1 couplée aux séquences LoxP permet de réaliser des recombinaisons au niveau de la séquence d'ADN. Si les séquences LoxP encadrant le gène d'intérêt sont orientées dans le même sens, cela permet la délétion du gène. En revanche si ces séquences sont orientées en sens inverse, le gène d'intérêt sera inversé (Adapté d'après Fuller et al., 2015).

Son contrôle dans l'espace réside dans le fait, qu'en fonction du promoteur sous lequel est régie l'expression de la CRE, il est possible de restreindre son expression uniquement à un type de tissu ou à un type de cellule et donc de permettre la recombinaison avec les sites LoxP uniquement dans ce tissu ou ces cellules d'intérêt (Bouabe and Okkenhaug, 2013; Orban et al., 1992). Par exemple, dans l'étude de processus neurologiques et du développement cortical, la souris Nestin-Cre exprimant la CRE sous le promoteur Nestin, l'expression de la CRE sera uniquement présente dans certains progéniteurs, tandis que la souris Nex-Cre sous le promoteur Nex l'expression de la CRE sera uniquement présente dans les neurones post-mitotiques (Dubois et al., 2006; Goebbels et al., 2006).

En ce qui concerne le contrôle spatial de l'expression de la CRE, celle-ci a été possible par la génération d'un nouveau modèle exprimant la CRE couplée à un récepteur aux œstrogènes appelé Cre-ERT. La liaison de la CRE à la heat shock protein 90 (HSP90) induite par le récepteur aux œstrogènes réprime la localisation de la Cre-recombinase au noyau et donc son activité recombinase avec les séquences LoxP. Ce n'est que lors de l'apport de tamoxifène qui est un modulateur spécifique des récepteurs aux oestrogènes que l'activation du récepteur interrompt la liaison entre la CRE et HSP90 et qu'elle est transloquée dans le noyau permettant la recombinaison avec les sites LoxP (Figure 51). Dans cette configuration, c'est l'injection du tamoxifène à un temps précis, défini en fonction des processus étudiés, qui permet de contrôler l'induction de la recombinaison de la technologie Cre-Lox et donc permet le contrôle temporel de celle-ci. Plus récemment un nouveau modèle CRE-ERT2, qui couple la

CRE à deux récepteurs aux œstrogènes a permis une meilleure spécificité et donc de meilleurs résultats (Kim et al., 2018; Metzger and Chambon, 2001, 2011).

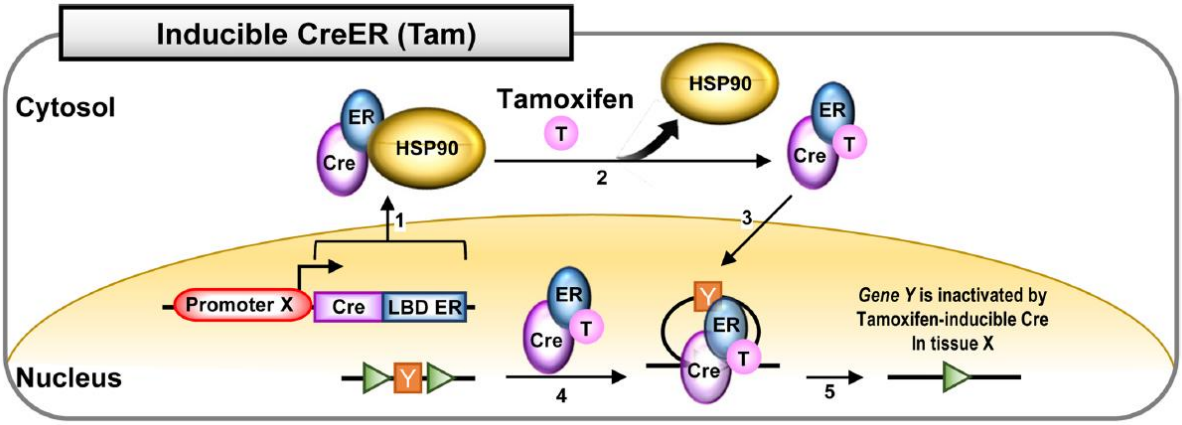


Figure 51 : La technologie Cre-ERT.
En configuration normale la CRE est liée à la protéine HSP90 par le récepteur aux œstrogènes (ER) empêchant sa translocation dans le noyau. L'ajout de tamoxifène, permet d'interrompre la liaison entre la CRE et HSP90 et permet sa translocation dans le noyau. C'est à ce moment que la recombinaison avec les sites LoxP est possible et permet l'inactivation du gène Y dans cette figure (D'après Kim et al., 2018).

L'utilisation de ces technologies dans le cadre d'un modèle souris nécessite de générer une souris transgénique comportant l'insertion de sites LoxP dans la séquence du gène d'intérêt, puis le croisement avec une souris exprimant la Cre recombinase sous un promoteur spécifique illustré ci-dessus permettant ensuite la recombinaison entre la CRE et les sites LoxP. La majorité des modèles conditionnelles utilisant la technologie Cre-Lox dans le développement cortical concerne des modèles KO car pour l'heure les modèles KI pour une mutation ponctuelle ne fonctionnent uniquement que si la mutation est localisée dans le dernier exon de la protéine comme pour le cas de l'étude de Scekic-Zahirovic et coll. dans l'étude de la sclérose latérale amyotrophique (Scekic-Zahirovic et al., 2016)

5. La technologie FLEx

Récemment, une nouvelle amélioration de la technologie Cre-Lox a permis le remplacement d'une séquence donnée par une autre séquence. Cette technologie appelée « FLEx switch » est composée d'une séquence A en position dans le sens de lecture de l'ADN et d'une séquence B en position anti-sens. Ces deux séquences sont encadrées par deux couples de sites LoxP et de sites Lox511 mutés, ces deux types de Lox ne pouvant recombiner que spécifiquement entre eux. En présence de la CRE, un des deux couples de LoxP ou Lox511 recombine et réalise une inversion, permettant à l'autre couple d'être dans la bonne orientation pour réaliser une excision. Comme résultat, la séquence B est en position sens et s'exprime tandis que la séquence A est supprimée. Cette technologie peut être utilisée

dans la génération de plusieurs types de modification génétique différents. Par exemple, dans le cadre d'une souris KO ou le gène d'intérêt délété est remplacé par un gène rapporteur tel que la GFP permettant de suivre les cellules où le gène d'intérêt ne s'exprime plus (Figure 52). Mais également dans la génération d'un modèle KI, par remplacement d'une séquence sauvage par une séquence mutée (Schnütgen and Ghyselinck, 2007; Schnütgen et al., 2003).

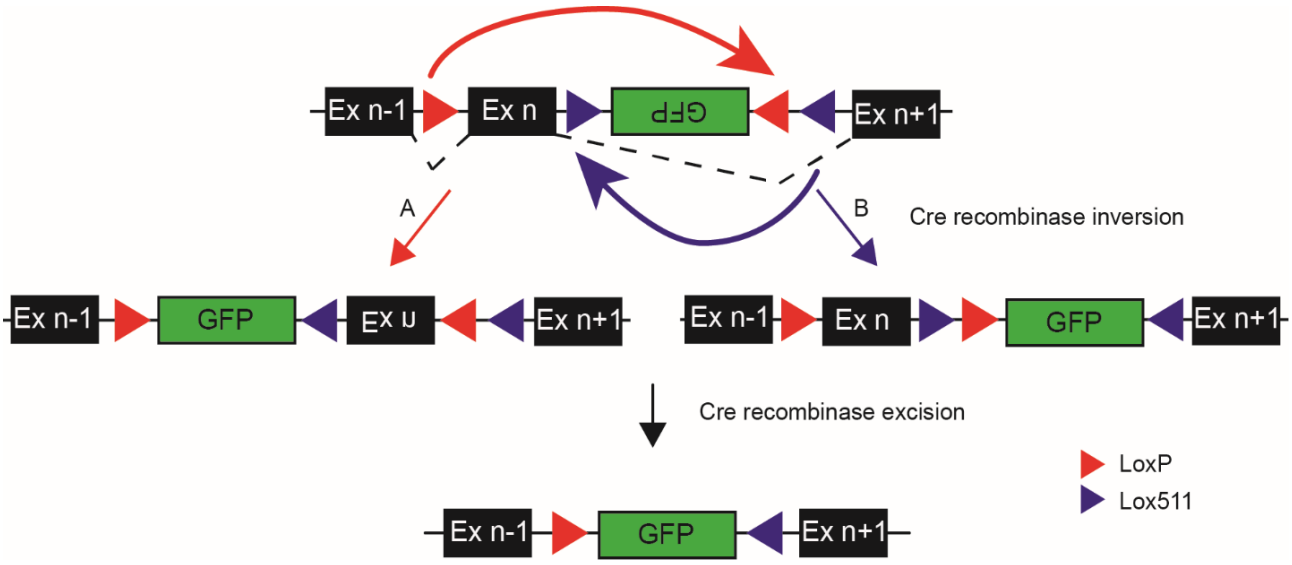


Figure 52 : La technologie « FLEx switch ».
Cette technologie permet par l'utilisation du Cre-Lox de pouvoir remplacer l'expression d'une séquence par une autre séquence telle que celle de la GFP:

A) L'exon d'intérêt en position sens et la GFP en position anti-sens sont encadrées par des séquences LoxP et Lox 511

B,C) La recombinaison de l'une des deux séquences LoxP ou Lox511 avec la Cre recombinaison permet une inversion, positionnant le couple n'ayant pas réagi dans la bonne orientation pour réaliser une excision.

D) Comme résultat l'exon d'intérêt ne s'exprime plus tandis que la GFP s'exprime.

(Adapté D'après Schnütgen et al., 2003 et Schnütgen and Ghyselinck, 2007)

Objectifs de ma thèse :

L'introduction de ma thèse a permis de détailler certaines étapes du développement cortical et de comprendre l'implication du cytosquelette de microtubules dans la formation d'un cerveau sain et fonctionnel. Une interruption ou des anomalies lors des différents processus du développement cortical mènent à des pathologies neuro-développementales telles que des MDC. Les avancées dans le domaine de la génétique ont permis au cours des dernières années d'identifier chez des patients présentant des malformations du développement cortical, des mutations dans des gènes liés aux microtubules et les protéines associées dont KIF2A. Malgré l'identification de ces mutations, les mécanismes perturbés au niveau protéique mais aussi lors du développement cortical restent encore mal définis. C'est pourquoi je me suis intéressé, lors de mon doctorat, à l'étude de l'impact des différentes mutations identifiées dans le gène *KIF2A* chez des patients présentant des malformations du développement cortical.

Au début de ma thèse, j'ai pu participer à l'étude de l'impact de ces mutations à travers leur surexpression dans différents types cellulaires et lors du développement cortical à l'aide de l'électroporation *in-utero*. Cette étude a permis de montrer l'influence des mutations de KIF2A sur la prolifération et la migration neuronale à travers une perturbation de la ciliogenèse et du cycle cellulaire. L'ensemble de ces résultats a été publié dans *Human Molecular Genetic* (Broix et al., 2017).

Dans la continuité de ces résultats, pour étudier l'influence des mutations de KIF2A dans un cadre physiologique, j'ai réalisé l'étude et la caractérisation d'un modèle « knock-in » exprimant conditionnellement la mutation p.His321Asp de KIF2A dans un modèle murin pour lequel nous avons modifié et perfectionné l'utilisation de la technologie FLEx. L'étude de ce modèle souris a permis de reproduire et modéliser la majorité des phénotypes corticaux observés chez le patient porteur de cette mutation tels que la microcéphalie et l'hétérotopie neuronale ainsi que des phénotypes cliniques associés tels que des troubles comportementaux et une susceptibilité à l'épilepsie.
Le croisement de ce modèle avec des souris exprimant la cre-recombinase sous l'influence de promoteurs spécifiques a permis d'analyser l'influence de la mutation de KIF2A lors des étapes spécifiques du développement cortical et de mettre en évidence des anomalies de positionnement neuronale dans le cortex et l'hippocampe ainsi qu'une microcéphalie liée à une augmentation de la mort cellulaire lors des processus précoces du développement. Enfin, la purification de la protéine mutée, et l'analyse de la dynamique des microtubules dans les fibroblastes du patient ont permis de montrer une incapacité de la protéine mutée à dépolymériser les MT et entrainant des anomalies de

leur dynamique. L'ensemble des résultats obtenus lors de l'étude de ce modèle murin ont été soumis dans le journal *Human Molecular Genetic* (Gilet et al. 2019)

Finalement, l'utilisation de ce modèle « knock-in » conditionnel KIF2A couplé à l'utilisation de souris transgéniques CRE-ERT2 m'a permis d'étudier l'influence de la mutation de KIF2A uniquement sur les processus post-nataux. En effet, l'injection de tamoxifène après la naissance de ces souris, a permis d'exprimer la mutation de *KIF2A* uniquement à partir de la période post-natale et a permis un développement cortical normal. L'utilisation de ce modèle m'a permis de vérifier si des anomalies post-natales induites par l'expression de la mutation de *KIF2A* participent ou suffisent à l'induction des phénotypes cliniques tels que l'épilepsie. L'ensemble des résultats de l'étude du modèle KIF2A CreERT2 est rapporté dans la partie « résultats non-publiés ».

Conjointement au sujet principal de ma thèse, j'ai étudié les mécanismes physiopathologiques de mutations dans *TUBG1* et *DYNC1H1*. Lors de l'étude du modèle murin « knock-in » pour la mutation Tyr92Cys du gène *TUBG1* et des fibroblastes de patients, j'ai mis en évidence des anomalies de la migration neuronale liées à des anomalies de la dynamique des microtubules. L'ensemble de ces résultats est publié dans « Nature Communication » (Ivanova et al., 2019)

Lors de l'étude d'une cohorte de fibroblastes de patients présentant différentes mutations dans le gène *DYNC1H1* codant pour une sous-unité de la dynéine cytoplasmique, j'ai étudié le transport intracellulaire des lysosomes et mis en évidence une perturbation du transport rétrograde induisant une accumulation anormale de lysosomes autour du noyau de ces cellules. L'ensemble de ces résultats figure dans la partie « résultats annexes » de ma thèse (Manuscript en préparation, Bery*, Gilet* et al. 2019).

Résultats

Article 1

Ciliogenesis and cell cycle alterations contribute to KIF2A-related malformations of cortical development.

Loïc Broix, Laure Asselin, Carla G. Silva, Ekaterina L. Ivanova, Peggy Tilly, **Johan G. Gilet**, Nicolas Lebrun, Hélène Jagline, Giuseppe Muraca, Yoann Saillour, Nathalie Drouot, Madeline Louise Reilly, Fiona Francis, Alexandre Benmerah, Nadia Bahi-Buisson, Richard Belvindrah, Laurent Nguyen, Juliette D. Godin, Jamel Chelly, Maria-Victoria Hinckelmann

Article publié dans *Human Molecular Genetics* en 2017.

Résumé:

Les découvertes génétiques rapportées par plusieurs équipes dont la nôtre ont montré que les mutations faux-sens *de novo* identifiées dans le gène KIF2A mènent à des malformations du développement cortical telles que des pachygyries et une microcéphalie. KIF2A fait partie de la famille des kinésines-13 impliquées dans la régulation de la dynamique des microtubules à travers son activité de dépolymérisation des microtubules dépendante de l'hydrolyse d'ATP. Par l'utilisation de l'électroporation in-utero, nous avons montré que les mutations de KIF2A menant à des malformations du développement cortical perturbent le positionnement des neurones et la prolifération des progéniteurs neuronaux. De manière intéressante, des analyses précises des processus de neurogenèse ont mis en évidence que la régulation du cycle cellulaire par le cil primaire est altérée. L'ensemble de ces résultats suggère que la dérégulation de la relation entre le cycle cellulaire et cil primaire contribue à la physiopathologie des malformations reliées aux mutations *KIF2A*. Ces résultats soulèvent également la question de savoir si les anomalies de la ciliogenèse sont une caractéristique des autres malformations cérébrales, telles que celles liées aux variants dans les tubulines et dans les protéines motrices associées aux microtubules.

Lors de ce projet, j'ai participé à l'étude de l'impact des mutations de KIF2A sur la ciliogénèse par des approches cellulaires soit dans les fibroblastes de patients soit à l'aide de la surexpression des constructions des mutations dans des modèles cellulaires.

OXFORD

Human Molecular Genetics, 2018, Vol. 27, No. 2 224–238

doi: 10.1093/hmg/ddx384
Advance Access Publication Date: 25 October 2017
Original Article

ORIGINAL ARTICLE

Ciliogenesis and cell cycle alterations contribute to *KIF2A*-related malformations of cortical development

Loïc Broix[1,2,3,4,5], Laure Asselin[1,2,3,4], Carla G. Silva[6], Ekaterina L. Ivanova[1,2,3,4], Peggy Tilly[1,2,3,4], Johan G. Gilet[1,2,3,4], Nicolas Lebrun[5], Hélène Jagline[1,2,3,4], Giuseppe Muraca[5], Yoann Saillour[5], Nathalie Drouot[1,2,3,4], Madeline Louise Reilly[7,8,9], Fiona Francis[10,11,12], Alexandre Benmerah[8,9], Nadia Bahi-Buisson[7,8], Richard Belvindrah[10,11,12], Laurent Nguyen[6], Juliette D. Godin[1,2,3,4], Jamel Chelly[1,2,3,4,13,†] and Maria-Victoria Hinckelmann[1,2,3,4,*,†]

[1]Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch 67400, France, [2]CNRS U7104, [3]INSERM U964, [4]Université de Strasbourg, Illkirch 67400, France, [5]Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS U8104, Paris Descartes University, Paris 75000, France, [6]GIGA-Neurosciences, University of Liège, C.H.U. Sart Tilman, Liège 4000, Belgium, [7]Paris Diderot University, Paris 75013, France, [8]INSERM UMR 1163, [9]Paris Descartes – Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute, Paris 75015, France, [10]Inserm UMR-S 839, Paris 75005, France, [11]Sorbonne Université, Université Pierre et Marie Curie, [12]Institut du Fer à Moulin, Paris 75000, France and [13]Service de Diagnostic Génétique, Hôpital Civil de Strasbourg, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg 67000, France

*To whom correspondence should be addressed at: Department of Translational Medicine and Neurogenetics, 1, rue Laurent Fries, BP 10142, 67404 Illkirch Cedex, France. Tel: +33 3 88655624; Fax: +33 3 88 65 32 01; Email: hinckelm@igbmc.fr

Abstract

Genetic findings reported by our group and others showed that *de novo* missense variants in the *KIF2A* gene underlie malformations of brain development called pachygyria and microcephaly. Though KIF2A is known as member of the Kinesin-13 family involved in the regulation of microtubule end dynamics through its ATP dependent MT-depolymerase activity, how KIF2A variants lead to brain malformations is still largely unknown. Using cellular and *in utero* electroporation approaches, we show here that *KIF2A* disease-causing variants disrupts projection neuron positioning and interneuron migration, as well as progenitors proliferation. Interestingly, further dissection of this latter process revealed that ciliogenesis regulation is also altered during progenitors cell cycle. Altogether, our data suggest that deregulation of the coupling between ciliogenesis and cell cycle might contribute to the pathogenesis of KIF2A-related brain malformations. They also raise the issue whether ciliogenesis defects are a hallmark of other brain malformations, such as those related to tubulins and MT-motor proteins variants.

[†]These authors contributed equally.

Received: July 31, 2017. **Revised:** October 13, 2017. **Accepted:** October 17, 2017

© The Author 2017. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by IGBMC - ULP user on 22 October 2019

Introduction

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

In humans, alterations in one of these processes can lead to neurodevelopmental disorders including malformations of cortical development (MCD) that represent frequent causes of intellectual disability, psychomotor delay and severe epilepsy (1).

Among the genetic causes involved in MCD disorders, the predominance of genes encoding microtubule (MT)-related proteins is increasingly convincing. For example, mutations in *LIS1* and *DCX*, both of which encode proteins involved in MT homeostasis, are associated with a large spectrum of neuronal migration disorders encompassing agyria, pachygyria and laminar heterotopias (2–5). In addition to *DCX* and *LIS1* genes, the importance of MTs in the development of the cortex is reflected in the finding that mutations in various tubulin genes, including α-tubulin *TUBA1A*, β-tubulin *TUBB2B*, *TUBB3* and *TUBB* and γ-tubulin *TUBG1*, cause a range of MCD syndromes, now referred to as the tubulinopathies (6–11). These tubulin-related cortical dysgeneses are thought to involve a combination of abnormal neuronal proliferation, migration, differentiation and axonal growth (7,9,10,12–14). More recently, we have reported through whole-exome sequencing, mutations in genes encoding MT-dependent motor proteins *DYNC1H1*, *KIF5C* and *KIF2A* in a wide range of cortical and gyral pattern abnormalities associated with microcephaly, reinforcing the idea that MT-dependent mitotic and post-mitotic processes are major contributors to the pathogenesis of MCD (10).

As far as *KIF2A* is concerned, several missense variants (c.950G > A, p.Ser317Asn; c.959C > T, p.Thr320Ile; c.961C > G, p.His321Asp and c.962A > C, p.His321Pro) located in the motor domain of KIF2A were identified as being causative of MCD (Supplementary Material, Fig. S2A). Individuals presented with cortical gyration abnormalities and microcephaly (10,15,16), highlighting the crucial role of *KIF2A* during cortical development.

KIF2A belongs to the Kinesin-13 family which regulates MT end dynamics through its ATP dependent MT-depolymerase activity (17,18). Kinesin-13 proteins are largely described for their critical roles during the cell cycle (19). KIF2A was shown to be localized at spindle poles to control bipolar spindle assembly and anaphase chromosome movements by destabilizing minus-end MTs (20–24). In addition to its role in regulation of the mitotic process, KIF2A is also implicated in various functions in the nervous system. KIF2A is enriched in developing neurons and predominantly accumulated in growth cones where it is required for the regulation of axonal collateral branching, as well as playing a role in axonal pruning (25–27). Recently, KIF2A was shown to be a key regulator of primary cilia disassembly through its MT-depolymerizing activity at the mother centriole and this activity is regulated by the mitotic kinase PLK1 that plays a crucial role in the coupling between cilia disassembly and cell proliferation (28).

In order to better understand pathophysiological mechanisms underlying MCD resulting from KIF2A dysfunction, we investigated the consequences of KIF2A pathogenic variants on cortical development. Here we provide evidence revealing that KIF2A mutants lead to neurodevelopmental defects that combine deregulation of neurogenesis and neuronal migration. Importantly, we showed that *KIF2A* variants disrupt ciliogenesis and the cell cycle of neuronal progenitors, suggesting the involvement of these two cellular processes in KIF2A-related MCD.

Results

KIF2A is expressed in the developing cerebral cortex

In view of previous observations showing that mutations in *KIF2A* result in MCD in humans (10,15,16), and keeping in mind that these pathologies are tightly associated with alterations in cortical development (29), we first examined the expression pattern of the KIF2A protein at different stages of brain corticogenesis in mice. KIF2A was detected throughout the cortical wall at different developmental stages (E14, E16 and E18) with an enrichment in the ventricular zone (VZ) and cortical plate (CP), as shown by immunostainings against the endogenous protein in coronal sections of mouse brains (Supplementary Material, Fig. S1A), and in agreement with previous observations (30). This expression remained ubiquitous but became more homogeneous at postnatal day 2 (P2) where a uniform staining throughout the cortex was observed.

We then focused on embryonic day 16, a developmental stage in which there is active cell proliferation and neuronal migration. At this developmental stage, endogenous KIF2A is expressed both in proliferating cells as well as in postmitotic neurons, as shown by its localization in Pax6 positive radial glia in the VZ (Supplementary Material, Fig. S1B) and β-III tubulin (Tuj1) in the CP and intermediate zone (IZ) (Supplementary Material, Fig. S1B). Taken together, MCD caused by *KIF2A* variant as well as KIF2A expression profile in developing mouse cortex suggest a role in different stages of corticogenesis.

Mutant KIF2A alters cortical neuronal positioning

To investigate the consequences of MCD-related *KIF2A* variants p.Ser317Asn and p.His321Asp reported by our group (10) (Supplementary Material, Fig. S2A), we used *in utero* electroporation to induce the expression of different human *KIF2A* constructs combined with a Tomato reporter into cortical progenitors of embryonic day 14.5 (E14.5) mouse embryos. First, in line with previously reported data (10), we showed that *in utero* electroporation of mutant *KIF2A* constructs leads to an abnormal distribution of mutant proteins in migrating projection neurons (Supplementary Material, Fig. S2B). Whereas the overexpressed wild type (WT) protein is mainly diffusely dispersed within the cytoplasm, mutant KIF2A localization resembles that of MTs. This mislocalization was also observed in Cos7 cells overexpressing the p.His321Asp variant. While WT KIF2A is dispersed within the cell, without any specific association to MTs, the pathogenic form of KIF2A appears to be sequestered to MTs. The mutant protein heavily co-localizes with tyrosinated-tubulin, and is almost devoided from acetylated-tubulin, suggesting a strong association with dynamic MTs (Supplementary Material, Fig. S2C and D).

We then studied the consequences of the MCD-related KIF2A mutants initially identified (p.Ser317Asn and p.His321Asp) on

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by IGBMC - ULP user on 22 October 2019

neuronal positioning. For this, we analysed the distribution of electroporated projection neurons within the E18.5 cortical wall, four days after *in utero* electroporation. At this stage, Tomato-positive neurons expressing either of the two KIF2A mutants were mainly clustered in the IZ, with very few neurons migrating towards or reaching the cortical plate (Fig. 1A). On the other hand, neurons expressing the wild type form of KIF2A were dispersed throughout the cortical wall. Indeed, compared with the control empty vector, the overexpression of wild type KIF2A leads to an accumulation of neurons in the IZ. However, this effect is less severe compared with the mutants which show an almost complete absence of electroporated cells in superficial layers of the developing cortex (Fig. 1A).

To explore whether the embryonic phenotype persists after birth, we studied the positioning of E14.5 electroporated neurons at P2. As shown in Figure 1B, most of the neurons electroporated with the control empty vector reach the most superficial cortical layers (IV-II, Cux1-positive). As in the control situation, the overexpression of the WT form of KIF2A, leads to an almost complete absence of electroporated cells in the white matter, although there is a small but significantly lower proportion of electroporated cells reaching layers IV-II. These results suggest that the WT KIF2A phenotype is mostly transient as, with time, there is a recovery of the phenotype observed in early stages. In the case of cells expressing mutant KIF2A, abnormally positioned neurons at E18.5 remained arrested in the white matter (WM) at P2 (Fig. 1B). In this case, over 40% of electroporated neurons accumulate in the WM compared with less than 5% observed in the control. Consistent with this, only 30% of mutant-expressing neurons are located in the Cux1 positive layers. Taken together, these results indicate that *KIF2A* has a key role in determining neuronal positioning during cortical development, and that both pathogenic *KIF2A* variants result in a similar phenotype consisting

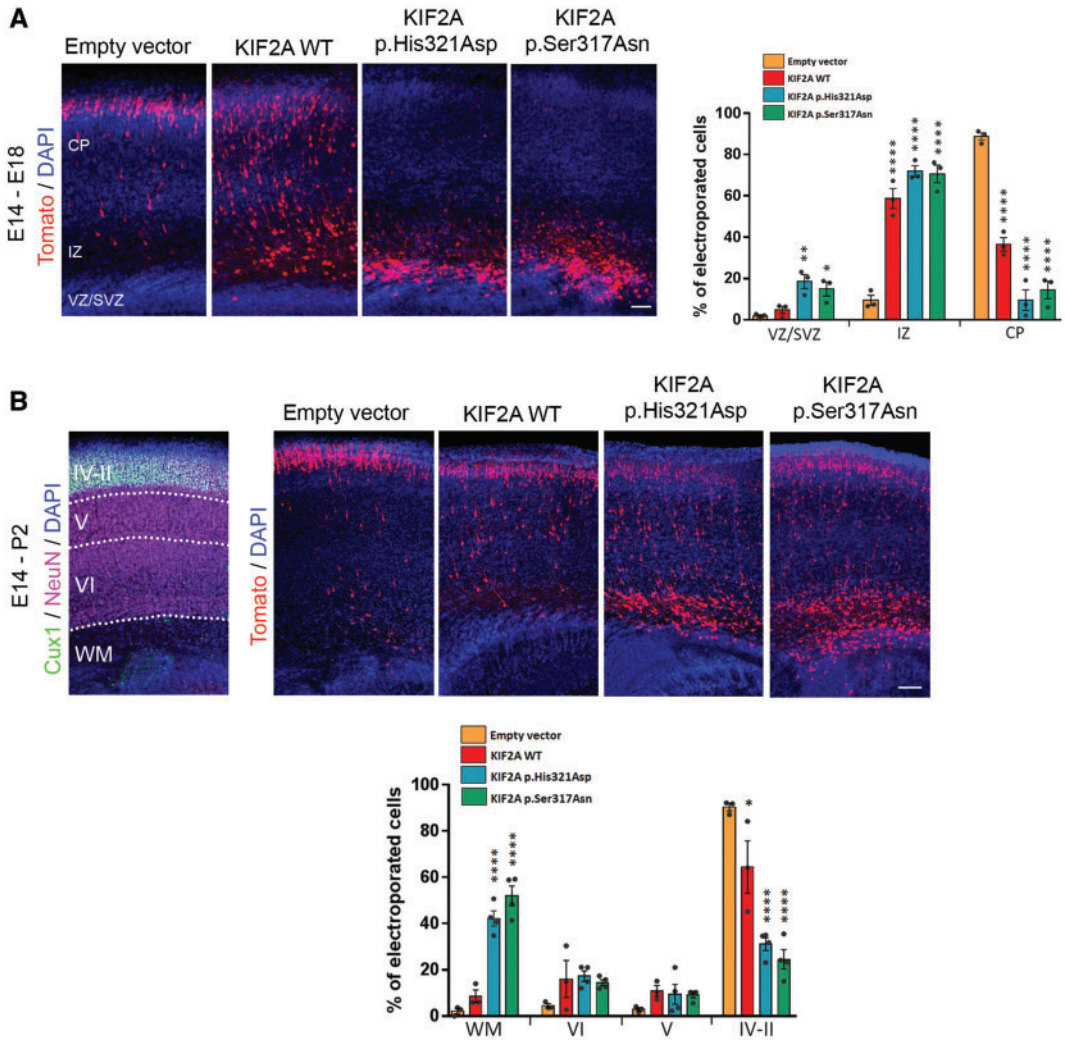


Figure 1. KIF2A mutations and overexpression affects neuronal positioning. (**A**) Coronal sections of the cerebral cortex electroporated at E14.5 and analysed at E18.5. Histograms show the distribution of Tomato-positive cells expressing different constructs in the ventricular/subventricular zone (VZ/SVZ), intermediate zone (IZ) and the cortical plate (CP). One-way ANOVA with Dunnett's post hoc test used to compare conditions ($n = 3$ embryonic brains for each condition). Scale bar, 50 μm. (**B**) Representative images of brain cortices electroporated at E14.5 and analysed at P2. Sections were stained for a neuronal marker, NeuN, and an upper-layer marker, Cux1, and were counterstained with DAPI to determine neuronal positioning. Histograms show the quantification of the distribution of electroporated cells in the white matter (WM), and different cortical layers (II–VI). One-way ANOVA with Dunnett's post hoc test used to compare conditions ($n = 3$ embryonic brains for Empty vector and KIF2A WT conditions and $n = 4$ for KIF2A p.His321Asp and KIF2A p.Ser317Asn). Scale bar, 100 μm. Dots on top of bar graph represent individual data points for each condition. Error bars are mean +/- s.e.m. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$.

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by IGBMC - ULP user on 22 October 2019

of an accumulation of ectopic neurons in the deep layers and WM.

Implication of postmitotic processes in the positioning defects

To further understand the mechanisms underlying the ectopic localization of neurons expressing *KIF2A* constructs, we first focused on the migration of pyramidal neurons. As a strong and consistent phenotype was found for the two mutants, we specifically focused our study on the p.His321Asp variant. We initially controlled the integrity of radial glia, which acts as the scaffold along which post-mitotic neurons migrate, being essential for proper migration (31). We co-electroporated *KIF2A* constructs and GFP construct driven by the radial glia specific promoter BLBP (BLBP-GFP), and we observed no evident alteration of glial scaffolding (Supplementary Material, Fig. S3). We then focused on the postmitotic effect of the p.His321Asp variant on neuronal positioning. For this, we *in utero* electroporated at E14.5 constructs that express GFP and the different versions of *KIF2A* under the neuron-specific Doublecortin (*DCX*) promoter. At E18.5, the specific expression of both wild type and mutant KIF2A in postmitotic neurons, resulted in an increased fraction of GFP-positive neurons remaining in the IZ with a corresponding depletion of cells reaching the CP (Fig. 2A). It is worth mentioning that the postmitotic effect of the wild type construct in the distribution of electroporated cells highly resembles that of the overexpression of the protein starting at progenitor stages (Fig. 1A). However, the mutant construct leads to a less severe phenotype (Fig. 1A).

In view of the similar phenotype observed for the wild type and mutant overexpression, we focused on the dynamics of the different steps of radial migration to further search for differentially regulated processes between the WT and mutant conditions. For this, we performed time-lapse videomicroscopy acquisitions of *DCX-KIF2A* expressing neurons in organotypic cultures. Time-lapse acquisitions showed that expression of both WT and mutant constructs affect the initial multipolar to bipolar transition required to start locomotion (Fig. 2B), the velocity of locomotion of bipolar pyramidal neurons (Fig. 2C and D) as well as the total duration and number of pauses were significantly affected (Fig. 2E and F), leading to an overall delay of radial migration (Fig. 2G). Though these data suggest that level of expression of KIF2A is critical and migration defects could contribute to the phenotype resulting from KIF2A mutants expression, they do not allow to differentiate between dosage effect and the suspected dominant negative (or gain of function) effect of the MCD-related KIF2A variants.

Mutant KIF2A expression leads to interneuron migration defects

The correct formation of a fully functional cortex requires the timed migration and insertion of interneurons in cortical networks. Cortical interneurons initially migrate through tangential routes, adopting later on a radial mode of migration. Both types of migration depend on cytoskeleton remodeling. To examine the consequences of *KIF2A* pathogenic variant on interneuron migration and therefore assess the potential contribution of this process in the pathogenicity of KIF2A-related MCD, we performed real-time imaging of electroporated medial ganglionic eminence (MGE) explants cultured on wild type cortical feeders. This *in vitro* system allowed us to study the effect of KIF2A overexpression in the migration of interneurons, independently from defects in pyramidal neurons. These experiments revealed that, although interneurons were able to migrate out of the explant, cells expressing the mutant form of KIF2A moved significantly slower than the control empty vector or those overexpressing the wild type construct (Fig. 3A and B). Additionally, KIF2A variant affected the directionality of this displacement. In the control situation interneurons migrated with a higher persistence of movement, whereas those expressing the pathogenic form of KIF2A frequently changed directions (Fig. 3A and C). Interneurons use a saltatory mode of migration consisting of nuclear displacements (nucleokinesis) and pauses (32). During nucleokinesis, cells acquire a higher instantaneous speed. We thus, analysed in more detail the kinematics of these cells. As expected, KIF2A pathogenic variant decreased the frequency and amplitude of the nucleokinesis (Fig. 3D–F). Conversely, interneurons overexpressing the wild type version of the protein moved faster by performing a higher number of nuclear translocations. Together, these data show that MCD-related KIF2A variant delays interneuron migration.

Mutant KIF2A alters neural progenitor proliferation and cell cycle exit

In view of the high expression of KIF2A in proliferative zones of the developing cortex (Supplementary Material, Fig. S1) we investigated whether proliferation defects could contribute to the pathophysiology of *KIF2A*-related MCD. To explore this, we electroporated *KIF2A* constructs in E14.5 embryos and analysed the expression of PH3, Pax6 and Tbr2 in electroporated cells two days later. First, we focused on the regulation of progenitor proliferation and we observed that mutant KIF2A overexpression induced an increased proportion of VZ progenitors undergoing mitosis, reflected by a higher mitotic index (Fig. 4A). We further estimated the balance between proliferative and neurogenic divisions of radial glia. Although the mutant did not affect the amount of apical progenitors (APs) (Pax6+/Tbr2-), we observed an increased percentage of newborn intermediate progenitors (IPs) (Pax6+/Tbr2+) in the mutant condition, with a concomitant reduction of neurons (Pax6-/Tbr2-) in the VZ/SVZ (Fig. 4B). This suggests a decreased generation of neurons in favor of the production of progenitors. We also examined the apical junctions of radial precursors, known to be involved in symmetric versus asymmetric divisions in these cells (33,34), and observed no apparent change in β-catenin distribution, indicating that apical junction integrity was not altered (Supplementary Material, Fig. S4). These data show that mutant KIF2A, but not the overexpression of the wild type protein, interferes with the process of neurogenesis by favoring the generation of progenitors at the expense of neurons.

To further study the basis of this increase in proliferative cells, we analysed the consequences of *KIF2A* variant on cell cycle regulation. To investigate this, the electroporation of the different constructs at E14.5 was followed by a pulse of EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridin, a thymidine analogue) one day after to label progenitors undergoing DNA replication. Brains were collected and stained for the proliferative marker Ki67 at E16.5. Although there were no significant differences in the percentage of electroporated cells undergoing S-phase (EdU+), we observed a significantly larger population of Ki67+ cells in the mutant condition. This resulted from a reduced number of cells exiting the cell cycle in the pathogenic condition (Fig. 4C). These results suggest that progenitors expressing the *KIF2A* variant remain longer as cycling progenitors. These proliferation

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by IGBMC - ULP user on 22 October 2019

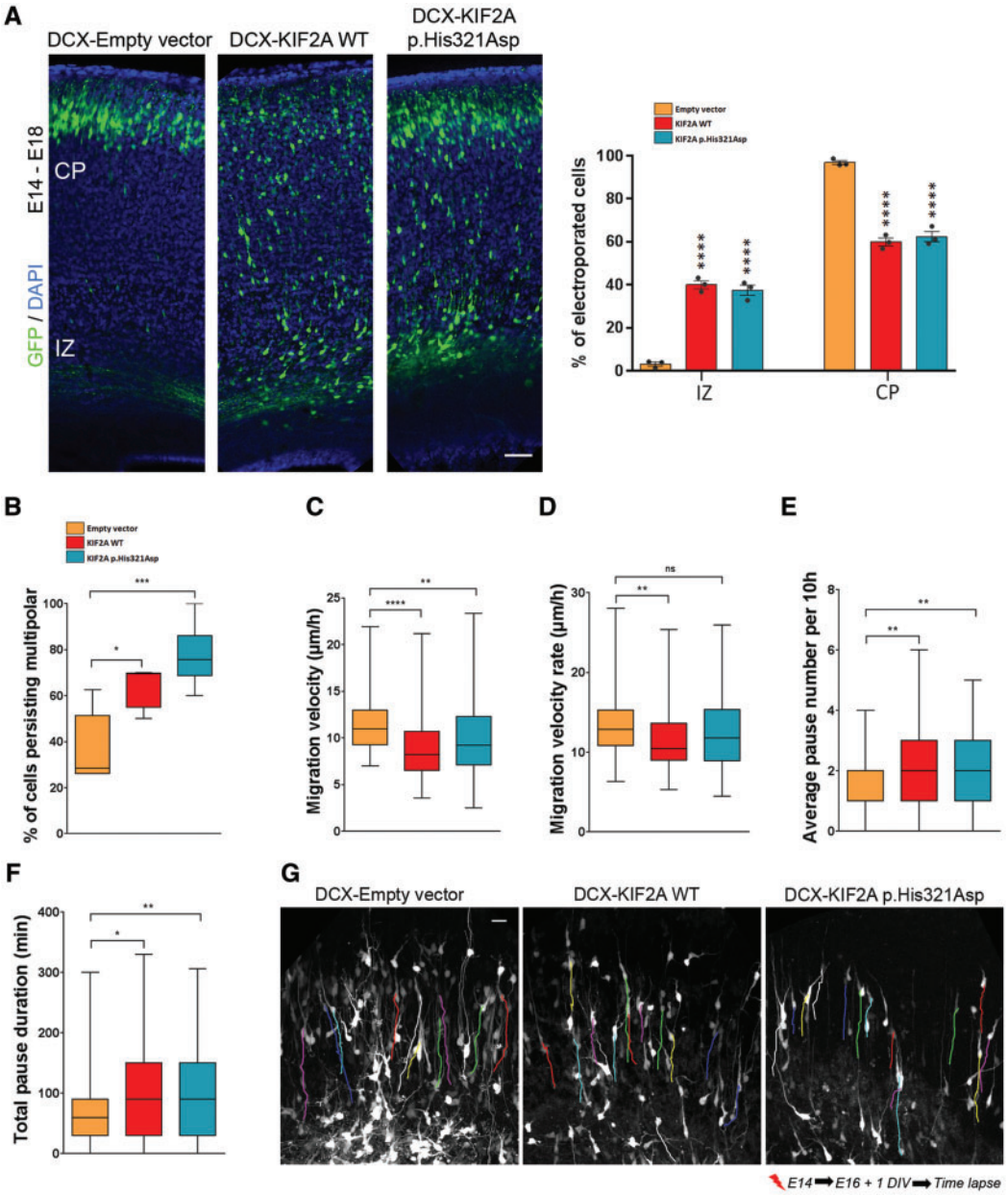


Figure 2. Postmitotic effects of mutant KIF2A (**A**) Distribution of postmitotic GFP-positive neurons expressing different *KIF2A* constructs under the DCX promoter in mouse cortex. Brains were electroporated at E14.5 and analysed at E18.5. Histograms represent the percentage of electroporated neurons that reside in the IZ and CP of the developing cortex. Dots on top of the bar graph represent individual data points for each condition. Error bars are mean +/- s.e.m. Scale bar, 50 µm. One-way ANOVA with Dunnett's post hoc test used to compare conditions ($n = 3$ embryonic brains for each conditions). (**B–G**) Real-time imaging of DCX-empty vector, DCX-KIF2A-WT or DCX-KIF2A p.His321Asp electroporated neurons at E14 in E16 brain slices cultured for a day. (B) Percentage of electroporated cells persisting with a multipolar morphology in the IZ during 10 h recording ($n = 5$ (Empty vector), $n = 5$ (WT), $n = 8$ (p.His321Asp), mean per explant). Quantification of (C) migration velocity ($n = 76$ cells (Empty vector), $n = 79$ (WT), $n = 114$ (p.His321Asp) from at least 3 explants), (D) migration velocity rate (e.g. migration velocity without the pauses) ($n = 76$ cells (Empty vector), $n = 79$ (WT), $n = 114$ (p.His321Asp) from at least 3 explants), (E) average pause number ($n = 56$ cells (Empty vector), $n = 64$ (WT), $n = 61$ (p.His321Asp) from at least 3 explants) and (F) total pause duration during 10 hr of recording ($n = 56$ cells (Empty vector), $n = 64$ (WT), $n = 105$ (p.His321Asp) from at least 3 explants). (G) Locomotory paths (colored lines) of electroporated neurons recorded during time-lapse imaging for 10 hr. From (*B*) to (F), the central line represents the median, the box limits the interquartile range, and the whiskers the minimum and maximum. One-way ANOVA with Tukey's post hoc test used to compare conditions. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$.

defects are specific to the mutation and hence potentially relevant for the pathophysiology of MCD.

Mutant KIF2A alters mitotic spindle integrity and impairs mitotic progression

To better understand the cellular mechanisms underlying mitotic division impairments upon expression of mutant KIF2A, we used the available fibroblasts derived from a female subject bearing the heterozygous *KIF2A* p.His321Asp variant and that presented with frontal band heterotopia, posterior predominant pachygyria and microcephaly. We first investigated the distribution of KIF2A in metaphasis cells. As previously described (35), KIF2A mainly localizes to spindle poles as seen by its co-localization with γ-tubulin, and is present at the mitotic spindle (Fig. 5A), while the mutated version of the protein is

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by IGBMC - ULP user on 22 October 2019

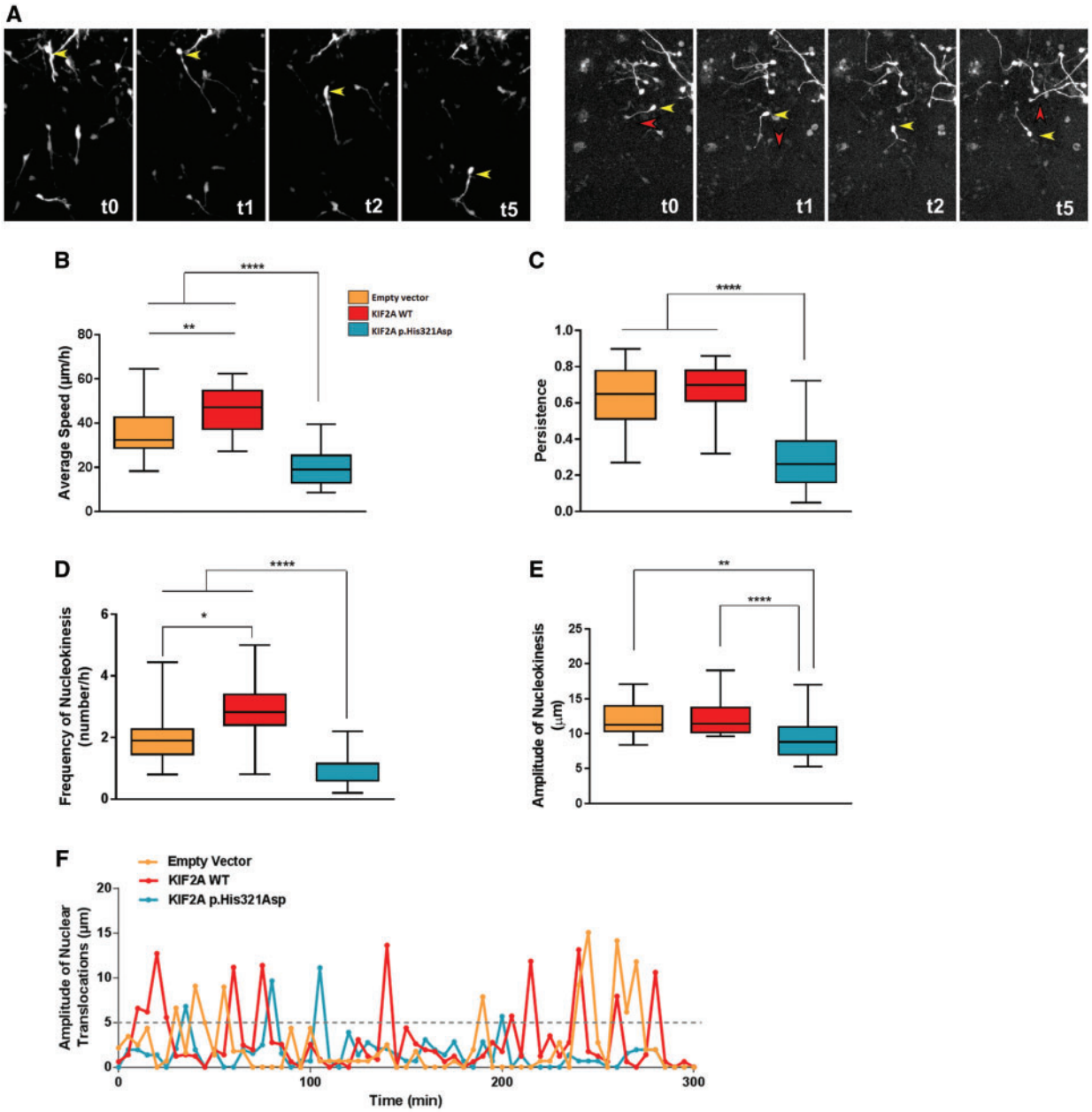


Figure 3. Mutant KIF2A alters interneuron migration dynamics (**A**) depicting the displacement of an interneuron (indicated by the yellow arrow) overexpressing WT KIF2A (left) or mutated KIF2A (right). The red arrows show the orientation of this interneuron during the recording time. Time corresponds to hours. (**B–E**) Quantification of migration parameters such as average speed, persistence, frequency and amplitude of nuclear translocations of interneurons electroporated with an empty vector, WT or mutated KIF2A. One-way ANOVA with Tukey's post hoc test used to compare conditions ($n = 20$ cells per conditions from 3 explants). (**F**) Kymographs describing the saltatory behavior profile of interneurons electroporated with an empty vector, WT or mutated KIF2A. The dashed line represents the threshold for nuclear translocations. From data (B) to (E), the central line represents the median, the box limits the interquartile range, and the whiskers the minimum and maximum. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{****}P < 0.0001$.

mislocalized and predominantly accumulated at the spindle poles, surrounding this structure. We first sought to analyse spindle orientation during mitosis, which is generally known to regulate the balance between symmetric and asymmetric divisions and therefore cell fate, which could explain the increased pool of proliferative progenitors. However, no significant differences were observed between the control and mutant fibroblasts (Fig. 5B) and was further confirmed in *in utero* electroporated brains, as no differences were observed in the orientation of the cleavage plane during anaphase (Supplementary Material, Fig. S5). We then characterized the morphology of mitotic spindles in fibroblasts by measuring their length, which is the distance from spindle pole to spindle pole, and the spindle width, considered to be the distance between the upper and lower extremities of the mitotic spindle in the metaphase plate (Fig. 5B). As shown by the quantifications, mutant fibroblasts displayed shorter spindles with a reduction in the spindle width. To sum up, mutant KIF2A is abnormally localized during mitosis and is associated with an alteration of mitotic spindle integrity.

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by IGBMC - ULP user on 22 October 2019

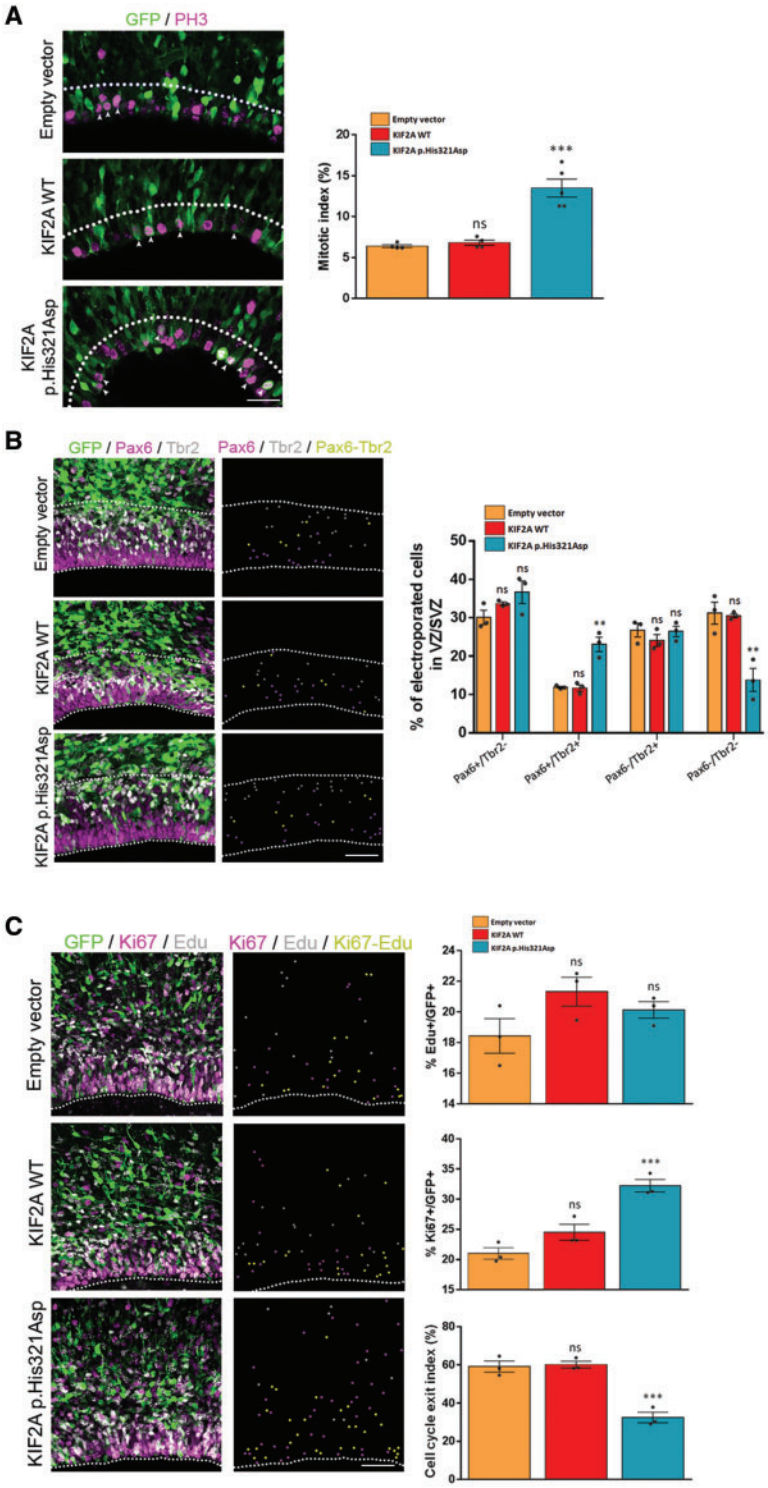


Figure 4. Effect of pathogenic KIF2A mutation on progenitor proliferation (**A**) Confocal images of E16.5 brain cortices electroporated two days before, showing electroporated cells (GFP+) and co-labeled with PH3. Quantifications represent the percentage of electroporated cells that co-express PH3 (Mitotic index). The dotted line delimits the area of quantification. Scale bar, 30 μm. (**B**) Distribution of Pax6+ and Tbr2+ in GFP+ cells on E16.5 coronal sections from brains electroporated at E14.5 (left panels). Right panels represent the localization of electroporated cells that colocalize with Pax6 (magenta dots), Tbr2 (gray dots) or both (yellow dots). Dotted line delimits the area of quantification. Histograms show the percentage of electroporated cells that express the different markers. Scale bar, 50 μm. (**C**) Coronal sections of E16.5 cortices, *in utero* electroporated at E14.5, followed by EdU injection at E15.5 and immunolabeled for Ki67 and EdU (left panels). Right panels represent the distribution of electroporated cells expressing Ki67 (magenta dots), EdU (gray dots) or both (yellow dots). Quantifications represent the percentage of electroporated cells that incorporated EdU (upper right), that were positive for Ki67 (middle right) and that exit the cell cycle (GFP + EdU + Ki67-/GFP + EdU+) (bottom right). Scale bar, 50 μm. Dots on top of bar graph represent individual data points for each condition. Error bars are mean +/- s.e.m. One-way ANOVA with Dunnett's post hoc test used to compare conditions ($n = 3$ embryonic brains for each condition). *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$, ns: non significant.

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by IGBMC - ULP user on 22 October 2019

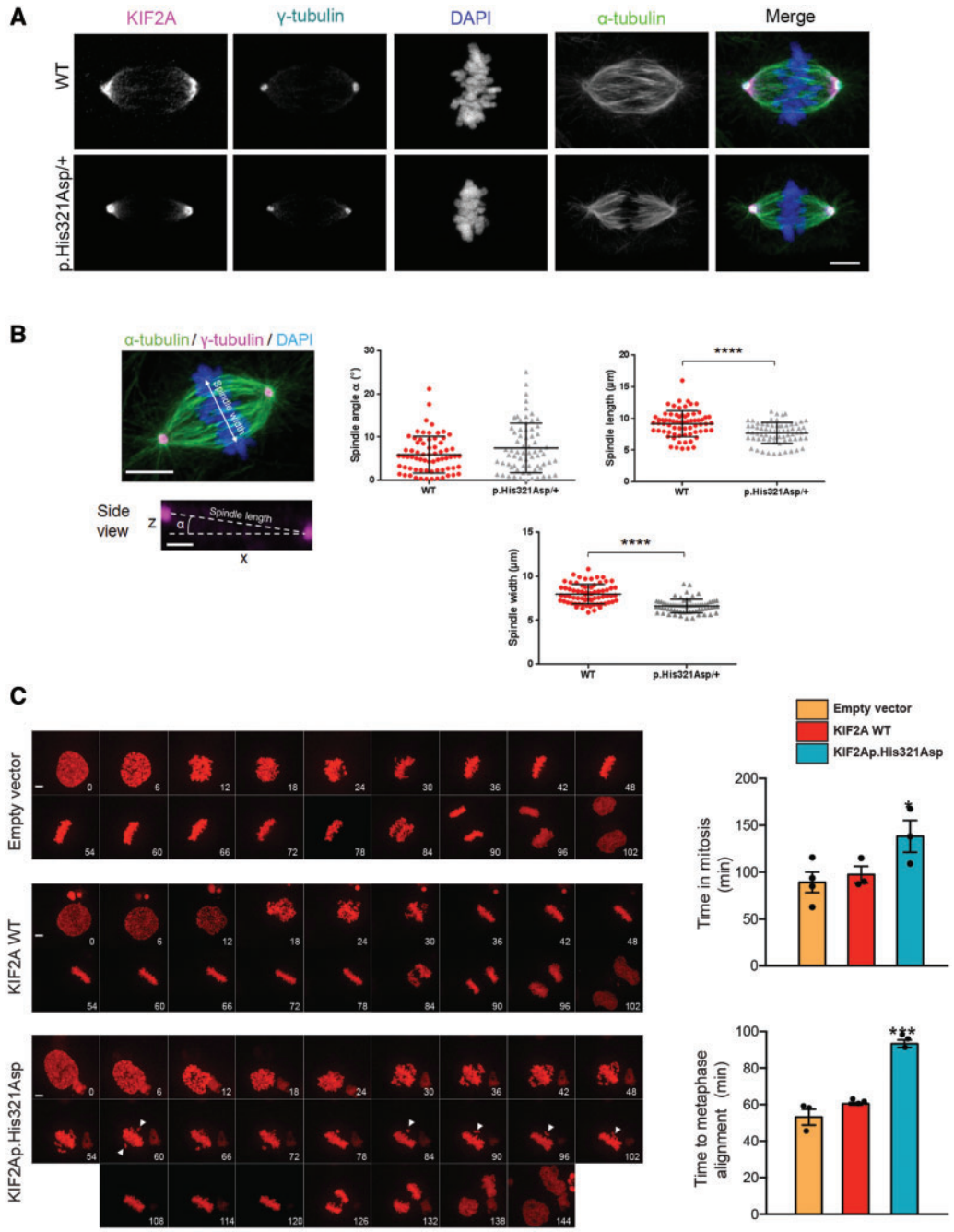


Figure 5. Mutant KIF2A alters mitotic spindles and mitotic progression in mutant fibroblasts (**A**) Immunofluorescent images of metaphasic fibroblasts expressing wild type or mutant KIF2A and stained for KIF2A (magenta), γ-tubulin (cyan) and α-tubulin (green). Scale bar, 5 μm. (**B**) Representative image depicting spindle width, length (upper panel) and spindle angle measurements (lower panel). Scale bar, 5 μm (upper view), Scale bar, 2 μm (side view). Quantification of spindle orientation (upper left, $n = 69$ cells from 4 experiments), length (upper right, $n = 69$ cells from 4 experiments) and width [bottom, $n = 70$ cells (WT) and 68 cells (KIF2A p.His321Asp)] from 4 experiments in metaphasic fibroblasts. Data are represented as mean +/- SD. Unpaired t-test used to compare conditions. (**C**) Representative time-lapse sequence of HeLa cells expressing H2B-RFP and transfected with empty vector, WT KIF2A or mutant KIF2A construct. Arrows indicate unaligned chromosomes. Quantifications of time spent in mitosis and time to metaphase alignment. One-way ANOVA with Dunnett's post-hoc test used to compare conditions ($n = 3$, mean from 3 independent experiments). Scale bar, 5 μm. Data are represented as means +/- s.e.m. Dots represent individual data points. $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$.

To further investigate the functional consequences resulting from these morphological defects, we focused on mitotic progression. In order to assess this, we used HeLa cells which stably express Histone2B tagged with RFP, and perform time-lapse live imaging to study the dynamics of mitosis. Cells were either transfected with a control empty vector, the wild type or the mutant version of *KIF2A*, and were imaged for 12 h. Cells expressing the mutant KIF2A protein, exhibit a delay in mitotic progression, with a particular impact in metaphase alignment of chromosomes (Fig. 5C). This delay in mitosis progression could therefore explain the increased percentage of *in utero* electroporated PH3+ cells in the mutant condition.

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by IGBMC - ULP user on 22 October 2019

Mutant KIF2A alters ciliogenesis in apical progenitors

It has been well established that KIF2A localizes to the basal body, where it acts as a negative regulator of ciliogenesis controlling axonemal MT disassembly (28). On the other hand, defects in primary cilia structure and function have been associated to numerous genetic diseases with neurodevelopmental consequences (36). We therefore analysed the localization of endogenous KIF2A on primary cilia in mutant fibroblasts. As previously described, we found that wild type KIF2A is enriched in the basal body as seen by its localization in the basal part of the primary cilia (Fig. 6A). On the other hand, the mutant version of the protein is less accumulated in the basal body and dispersed within the primary cilia, as shown by its colocalization with acetylated-tubulin (Fig. 6A).

Since KIF2A is abnormally localized in mutant fibroblasts, and its MT-depolymerizing activity at the basal body is essential for cilia disassembly in proliferating cells (28), we assessed the impact of *KIF2A* variant on ciliogenesis. For this, we analysed cilia number and morphology in fibroblasts derived from affected individuals 24h after serum stimulation. In order to assess specifically cilia disassembly, we focused on cells in S-G2 phase of cell cycle, which is when primary cilia are reabsorbed. We observed no difference between the proportion of cells in S/G2 as shown by the percentage of geminin+ cells (Supplementary Material, Fig. S6A), and no variation in the percentage of ciliated cells in this phase (Supplementary Material, Fig. S6B). However, when we examined the length of cilia in re-stimulated fibroblasts in S/G2, we observed that the mutant fibroblasts had longer cilia than those in the control fibroblasts (Fig. 6B). During cortical development, proper ciliogenesis is essential for the correct progression of cell cycle in APs. To further explore the *in vivo* consequences of KIF2A mutant on ciliogenesis and the potential implication in cortical development, cilia length and frequency were determined in APs of *in utero* electroporated brain slices. E14.5 embryos were electroporated with KIF2A constructs, BLBP-GFP and V5-tagged Arl13b. Co-immunostaining of brain at E15.5 for V5 and the S/G2 marker geminin in the ventricular zone revealed cilia alterations. In line with our cellular observations, the proportion of electroporated cells in S/G2 phase was not altered *in vivo* (Supplementary Material, Fig. S6C). Furthermore, geminin+ neurons overexpressing mutant *KIF2A* have longer cilia compared with those electroporated with the empty vector or wild type construct (Fig. 6C and D). Additionally, we observed an increase of 20% in the percentage of ciliated APs in the mutant condition (Fig. 6C and E), which strengthens the idea of a possible defect in the disassembly of cilia during these phases. However, the apparent absence of accumulation of electroported S/G2 APs was intriguing. As geminin marker does not allow to distinguish cells in G2 and S phases, we sought to assess the distribution with respect to the ventricular surface of ciliated geminin+ APs nuclei that had been electroporated. For this we divided the VZ in equal-sized bins parallel to the ventricle and quantified the number of nuclei present in each bin. We observed that the dispersion of the nuclei was significantly different between mutant expressing cells than in those expressing either the WT form of KIF2A or the empty vector (Fig. 6F). Indeed, the percentage of cells expressing the mutated form of the protein are clearly enriched in lower half of the VZ compared with the controls (Fig. 6G) consistent with an enrichment of electroporated cells in G2-phase (37,38). Together, these findings suggest a defective regulation of ciliogenesis in APs during cortical development that could contribute to the pathophysiology of KIF2A-associated MCD.

Discussion

KIF2A is an MT-associated motor protein which has been well described for its MT-depolymerizing activity (18). Currently, all of the identified variants in this gene associated to MCDs are located in or in close vicinity of the nucleotide binding pocket within the motor domain of the protein (Supplementary Material, Fig. S2A). Here, we performed a combination of *in vivo* and *in cellulo* studies, to better understand the pathophysiological mechanisms underlying MCD associated with p.His321Asp and p.Ser317Asn variants, thought to be different from *KIF2A* loss-of-function related cortical development defects previously reported in the mouse (25). Indeed, *Kif2a* knock-out mice (*kif2a-/-*) are viable only until one day after birth, and presented multiple brain alterations including cortical lamination defects as a result of a faulty migration of newborn neurons, emphasizing the importance of KIF2A during brain development. In fact, *KIF2A* seems to be relatively intolerant to loss-of-function variants according to ExAC database (pLi = 1) though the number of synonymous variations are similar to the expected, standing against a loss-of-function mechanism. Our work demonstrates that KIF2A pathogenic mutants are stable and lead to an abnormal localization of neurons within the deep layers of neocortex during development and that persists in the white matter after birth. Although the developmental phenotype observed due to the expression of the mutant protein resembles that of the downregulation (Figs 1 and 3, Supplementary Material, Fig. S7) and the knock-out animal model, the molecular mechanisms involved may be different. First, it is worth mentioning that most pathogenic variants identified so far in genes related to MCD correspond to heterozygous missense variants but not loss-of-function variants. Additionally, clinical data argue against an haploinsufficiency, as individuals with proximal 5q12 deletions that contain *KIF2A* presented neurocognitive defects but without any evidence of MCDs in the brain MRI (39). Second, and consistent with a dominant negative effect, previous data showed that in heterozygous fibroblasts bearing *KIF2A* pathogenic variants, endogenous KIF2A is mainly mislocalized along microtubules (10,16). The present study expands this phenotype to migrating neurons overexpressing a KIF2A mutant. Given that KIF2A functions as a dimer (40), these observations suggest that in interphase mutant KIF2A could sequester the wild type protein to MTs, probably blocking its function. Altogether, these data indicate that MCD-related KIF2A mutants act through a potential dominant negative effect in dividing cells, post-mitotic migrating neurons and primary cilia, and could therefore disrupt neuronal processes during cortical development (Fig. 7).

Here, we provide evidence showing that expression of mutant KIF2A leads to a mislocalization of pyramidal neurons, likely resulting from the combination of migration and proliferation defects. We found that mutant KIF2A engenders a locomotion defect in migrating projection neurons. Cytoskeleton remodeling is essential for this, as it ensures the dynamic cell-shape changes required for the proper migration of pyramidal neurons during development (41–44). In line with this, the downregulation of the MT-associated proteins LIS1 and DCX, also known to be implicated in MCDs, have severe consequences in neuronal migration (45,46). More rarely studied, but nevertheless as important as projection neurons, are interneurons and their contributions in pathophysiological processes underlying MCD. In this study, we showed that KIF2A variants not only alter migration of pyramidal neurons, but also interneuron migration dynamics. During cortical development,

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by IGBMC - ULP user on 22 October 2019

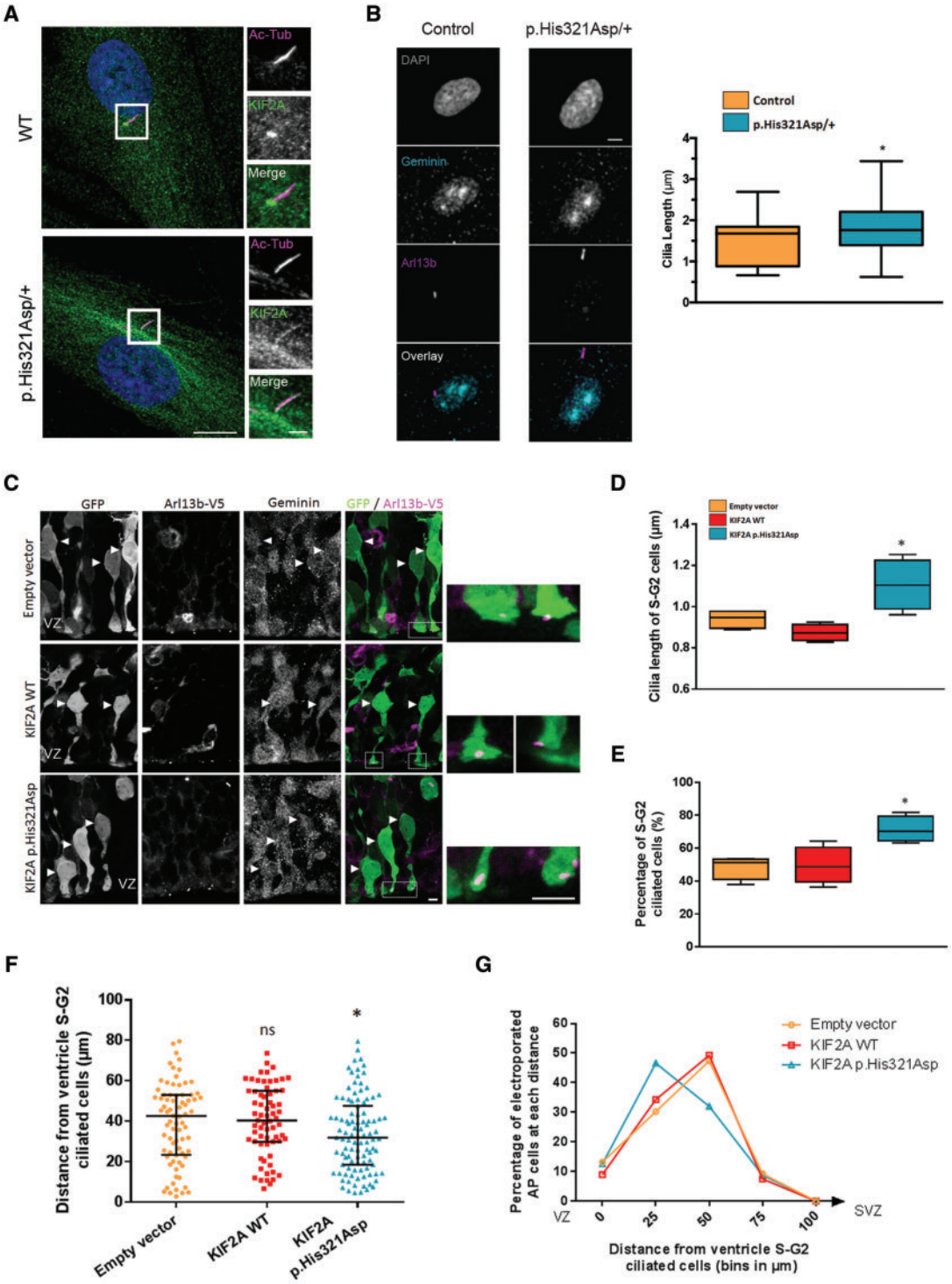


Figure 6. KIF2A mutation alters ciliogenesis. (**A**) Immunofluorescent staining of KIF2A (green) and acetylated-tubulin labeling primary cilia (magenta) in *KIF2A* p.His321Asp and control human fibroblasts. Scale bar, 10 µm. (**B**) Representative images showing primary cilia (purple) in geminin positive (cyan) fibroblasts. Quantification represents the percentage of ciliated cells and cilia length in control and patient fibroblasts that are geminin+. Unpaired *t*-test used to compare conditions [$n = 29$ cells (Control)] and $n = 39$ cells (p.His321Asp/+) from 4 experiments). Scale bar, 5 µm (**C**) Confocal images of E15.5 brain cortices electroporated one day before with either control empty vector, KIF2A WT or KIF2A p.His321Asp constructs in combination with BLBP-GFP and V5-tagged Arl13b expressing vectors. Brain sections were immunolabeled against GFP (green), V5 (magenta) and geminin. White arrows indicate the geminin positive and ciliated cells. Right panels show high magnification of the dotted boxes. VZ: ventricular zone. Scale bar, 5 µm. (**D**) Quantification of cilia length and (**E**) percentage of ciliated cells in GFP+ progenitors that contact the ventricular surface and are geminin+ (S/G2). One-way ANOVA with Dunnett's post hoc test used to compare conditions ($n = 4$ embryonic brains for each condition). (**F**) Measurements correspond to the distance between the surface of ventricle to the center of the nucleus of S/G2 ciliated AP cells in E15.5 brains electroporated at E14.5. Kolmogorov-Smirnov test used for non-parametric distributions [$n = 76$ cells (Empty vector)], $n = 67$ (WT), $n = 103$ (p.His321Asp) from 4 brains). (**G**) Data in (F) are represented as the frequency of electroporated S/G2 ciliated AP cells in each bin of distances. In (B) and from (D) to (E), the central line represents the median, the box limits the interquartile range, and the whiskers the minimum and maximum. In (F), error bars represent the median +/- the interquartile range. *$P < 0.05$.

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by IGBMC - ULP user on 22 October 2019

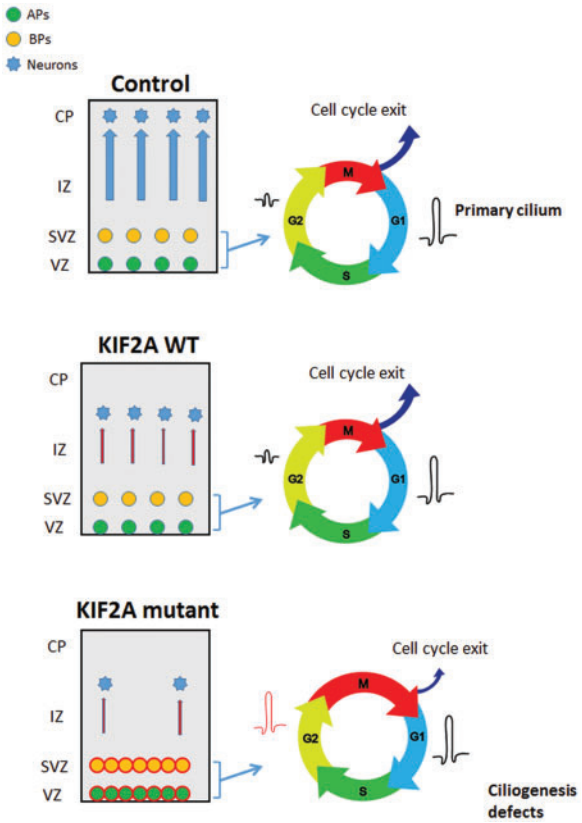


Figure 7. Model depicting the consequences of MCD-related KIF2A mutations on neurogenesis and neuronal migration during cortical development. The left panel shows that expression of mutant KIF2A alters progenitor pool, favoring the generation of basal progenitors (BPs: yellow circles) at the expense of neurons (blue symbols) and the neuronal migration velocity (blue arrows in control condition and red arrows in KIF2A WT and KIF2A mutant conditions), leading to abnormal localization of neurons within the deep layers of the cortex. The right panel summarizes cell cycle and ciliogenesis defects resulting from KIF2A mutant expression including a delay in mitotic progression, a reduced number of cells exiting the cell cycle and a longer cilia in S/G2 phase of the cell cycle. APs: apical progenitors, VZ: ventricular zone, SVZ: Subventricular zone, IZ: intermediate zone, CP: cortical plate.

interneurons migrate tangentially from the ganglionic eminences to reach their appropriate location in the cerebral cortex. We observed a reduction in migration velocity with defective nucleokinesis, all of this highly dependent on MT remodeling. This suggests a possible contribution of tangential migration in the pathogenesis of these MCDs.

Interestingly, we found that mutant KIF2A is associated with cell cycle defects (Fig. 7). Indeed, we observe a higher mitotic index and an increase in the number of newborn intermediate progenitors. We then showed that this is not due to an increase in proliferation *per se*, but rather to a delay in cell cycle progression with a longer duration of mitosis that could be reflected by the higher percentage of PH3 positive cells observed *in vivo*. This idea is supported by several sets of data. First, our video-microscopy analysis shows a delay in mitotic progression, as a result of a defect during chromosome alignment in metaphase. Indeed, it has been shown that KIF2A regulates mitotic spindle formation and disassembly and the consequences of KIF2A downregulation is consistent with our observations (20). Second, the increased amount of progenitors seems not to be due to an imbalance between symmetric and asymmetric divisions. This process is known to regulate cell fate and highly depends on mitotic spindle orientation. However, we did not observe any alteration in spindle angle during mitosis in cultured cells or *in vivo* (Fig. 5B, Supplementary Material, Fig. S5), implying that the increase in the progenitor pool could be due to a prolonged cell cycle. Finally, there is a decrease in cell cycle exit *in vivo*, consistent with the proposed hypothesis. It is well established that the date of birth of neurons is crucial in defining their identity and positioning within the cerebral cortex (47). The delay in cell cycle exit observed in the mutant condition could therefore modify the fate of newly formed neurons as well as influence their positioning in the cerebral cortex, which could contribute to the layering abnormalities observed in the pathology.

Our study also raises the possibility of an implication of primary cilia in the pathogenesis of the observed defects (Fig. 7). Though the cause and effect concept between the convincing observed ciliogenesis abnormalities and progenitors proliferation deregulation remains to be further reinforced (mainly because KIF2A acts also as a regulator of MT dynamics at the mitotic spindle) our study clearly raises the possibility of an implication of primary cilia in the pathogenesis of the observed defects and therefore in the pathogenicity of KIF2A-related MCD. First, convergent evidence indicates that mutant KIF2A localization in primary cilia is disrupted. Instead of being enriched at the basal body, mutant KIF2A is predominantly distributed at the axoneme. Though MT disassembly occurs mainly at the ciliary tip, it has been clearly shown that the MT-depolymerizing activity of KIF2A at the basal body is essential for its role in ciliogenesis (28). Moreover, *in vivo* and *in cellulo* data revealed that MCD-related *KIF2A* variant results in cilia reabsorption defects during S/G2 phases and an increased number of ciliated APs. Primary cilia are known to be dynamically regulated during cell cycle and seem to control the transition between different cell cycle phases (48). Indeed, it has been suggested that the initiation of cilia disassembly during late G1 is necessary for the transition to S phase (49,50). Deregulations in cilia reabsorption seem to retain cells in G1 phase and as a result alter the balance between proliferation and differentiation of AP cells (50). Yet, no study has ever assessed the role of G2 cilia disassembly prior to mitosis entry in neuronal progenitors. However, it is important to highlight that KIF2A MT-depolymerizing activity is enhanced through PLK1 phosphorylation, which is specifically expressed during S/G2 (28). In view of these data, primary cilia disassembly defect and its dependent cell cycle deregulation could be seen as coherent consequences of mutant KIF2A expression if we take into account its depletion from the basal body and the fact that MCD-related variants act very likely through a dominant negative mechanism and affect therefore the distribution of wild type KIF2A.

So far, several studies have focused on the role of centrosome-related genes encoding for centrosomal proteins in the pathogeny of microcephaly (51). Lately, it has been proposed that microcephaly could be described as a 'centriolopathy' (52). However, a recent study highlighted that disruption of primary cilia dynamics, rather than centrosome biogenesis, could also contribute to the pathogenesis underlying microcephaly (53). Moreover, it is worth mentioning that examination of primary cilia proteomics and the centrosome-cilium protein interaction landscape during ciliogenesis reveal the presence of most of the MCD-related genes, such as *LIS1*, *TUBA1A*, *TUBB2B*, *DYNC1H1*, *KIF5C*, *TUBG1* and *KIF2A* (54–56). In conclusion, in view of the findings indicating that MCD-related KIF2A variants affect progenitors ciliogenesis and possibly the interplay between

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by IGBMC - ULP user on 22 October 2019

ciliogenesis and progenitors cell cycle, this strongly warrant widening investigations to assess whether mutations in other MCD-related genes are associated with primary cilia defects, and whether such defects, yet to be identified, contribute to better understand disrupted processes and pathophysiological mechanism underlying the heterogeneous group of MCD.

Materials and Methods

Western blot

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

In utero electroporation

In utero electroporation was performed as described previously (10) using adult Swiss mice (Janvier). Animal experimentations were performed at the IGBMC animal facilities. The light/dark cycle for animals housed was 12h and all experiments were conducted during the light cycle. Timed pregnant mice (E14.5) were anesthetized with isoflurane (2 l per min of oxygen, 4% isoflurane during sleep and 2% isoflurane during surgery operation; Minerve). The uterine horns were exposed, and a lateral ventricle of each embryo was injected using pulled glass capillaries with Fast Green (2 μg/ml; Sigma) combined with 1 μg/μl of DNA constructs. Plasmids were further electroporated into the neuronal progenitors adjacent to the ventricle by discharging five electric pulses at 45V for 50 ms at 950 ms intervals using a CUY21EDIT electroporator (Sonidel Ltd). After electroporation, embryos were placed back in the abdominal cavity and development was allowed to continue until E16, E18 or P2. Embryos or pups brains were dissected and fixed in 4% PFA in PBS overnight.

Ex vivo electroporation of medial ganglionic eminence explants (MGE)

The heads of E13.5 NMRI embryos were harvested and the cortex removed in order to expose the ganglionic eminences. Plasmids to overexpress empty vector, wild type *KIF2A, KIF2A* mutants, control or Kif2A shRNA were used at a concentration of 1.5 μg/μl and were directly injected in the MGE. These plasmids were co-electroporated with a Tomato red plasmid used at a concentration of 0.5 μg/μl. Electroporation conditions: 50V, 5 pulses of 50ms duration spaced by 1s interval.

Culture of MGE explants

After electroporation, the MGE was microdissected from the embryo's heads and cut into pieces of approximately 1 mm^2. These explants were placed on top of a cortical feeder layer prepared at least 24 h before. The feeder layer was prepared from homochronic cortices, dissociated and plated at high density (1–2×10^6 cells on a 35 mm glass bottom dishes (MatTek Corporation) previously coated with poly-L-ornithine and laminin (SIGMA). The explants were maintained in culture in Neurobasal medium supplemented with B27 minus vitamin A (GIBCO) and penicillin/streptomycin. The feeders were maintained in at 37 °C in humidified incubators with 5% CO_2 for at least 24h before time-lapse video recording.

Immunohistochemistry

Fixed mouse brains were placed in a solution of 4% low melting agarose (Bio-Rad) and cut in coronal sections (80 μm) using a vibrating blade microtome (Leica VT1000S, Leica Microsystems). Sections were blocked in PBS with 0.3% Triton-X100 and 2% of the appropriate serum at room temperature for 30 min. All primary antibodies were incubated overnight at 4 °C with PBS, 0.3% Triton-X100 and 2% of serum. The following antibodies were used: anti-phospho Histone H3 (06–570, rabbit, 1: 500, Millipore), anti-Tbr2 (14–4875-80, rat, 1: 200, eBiosciences), anti-Pax6 (PRB-278P, rabbit, 1: 200, Covance), anti-Kif2a (ab37005, rabbit, 1: 6000, abcam), anti-GFP (A10262, chicken, 1: 6000, ThermoFisher), anti-Cux1 (sc-13024, rabbit, 1: 100, Santa Cruz), anti-Ki67 (IHC-00375, rabbit, 1: 250, Bethyl Laboratories, Inc), anti-NeuN (MAB377, mouse, 1: 100, Millipore), anti-βcatenin (610153, mouse, 1: 500, BD Transduction Laboratories), anti-Arl13b (17711–1-AP, rabbit, 1: 500, Proteintech), anti-RFP (5F8, rat, 1: 1000, Chromotek), anti-geminin (sc-13015, rabbit, 1: 200, Santa Cruz), anti-V5 (R96025, mouse, 1: 500, Invitrogen). After washing in 1X PBS, sections were incubated with corresponding Alexa Fluor conjugated secondary antibodies (Life Technologies) in a 1: 500 dilution in 1X PBS for 1h30 at room temperature. After washing, sections were mounted with DAPI Fluoromount-G mounting medium (Interchim). Microscopy was performed on a TCS SP8 or a TCS SP5 II confocal microscopes (Leica Microsystems) and positioning analysis was achieved using ImageJ software (NIH) and proliferation and primary cilium analysis with LAS AF software (Leica Microsystems). Graphs were made in GraphPad Prism 6 (GraphPad Software) and images were assembled with Adobe Photoshop 13.0.1 (Adobe Systems).

EdU incorporation

For cell-cycle exit experiments, E14.5 electroporated pregnant mice were intraperitoneally injected 24h later with EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine solution, Invitrogen) diluted in sterile normal saline at the dose of 40 mg EdU/kg of body weight and embryos were harvested and fixed at E16.5. EdU staining was conducted using Click-iT EdU Alexa Fluor 647 Imaging Kit (Invitrogen) according to manufacturer's protocol.

Expression constructs

Commercially available Human untagged *KIF2A cDNA* (NM_004520) cloned in pCMV6-XL5 vector (SC117315) were purchased from Origene. Variants (p.His321Asp and p.Ser317Asn) were introduced by site directed mutagenesis using QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). WT and mutated cDNAs encoding human *KIF2A* were then inserted in the multiple cloning site of psiSTRIKE vector under the CAG promoter and between the DCX promoter and IRES-EGFP sequences in DCX-IRES-GFP vector kindly provided by U. Mueller (TSRI, CA, USA). BLBP-GFP plasmid was kindly provided by N. Heintz (The Rockefeller university, NY, USA). pDEST40-Arl13b11 expressing V5 tagged Arl13b was purchased from Addgene (#40873). For short hairpin *Kif2a* silencing constructs, a 29-mer sequence targeting the 3'UTR of the mouse

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by IGBMC - ULP user on 22 October 2019

Kif2a transcript and a HuSH 29-mer non-effective shRNA scrambled cassette, both commercially designed and provided by Origene in the p-GFP-V-RS vector (TG505433), were then subcloned in the psiSTRIKE vector under the U6 promoter. Plasmid DNAs used in this study were prepared using the EndoFree plasmid purification kit (Macherey Nagel).

Cell culture, transfections and immunofluorescence

Control and mutant fibroblasts carrying the *KIF2A* pHis321Asp variant were maintained in DMEM supplemented with 10% foetal bovine serum at 37 °C. Cos-7 and mouse neuroblastoma N2A cell lines were cultured in DMEM supplemented with 5% foetal bovine serum and gentamicin (40 μg/ml) at 37 °C. HeLa cells stably expressing H2B-RFP were grown in DMEM supplemented with 10% foetal bovine serum, 2 mM Glutamine, 0.5mg/ml of G418 and puromycin at 0.5 μg/ml. All the cell lines were not listed in database of commonly misidentified cell lines maintained by ICLAC. Cell lines have been tested for mycoplasma but not authenticated. Transfection of plasmids was done using Lipofectamine 2000 (Life Technologies) following manufacturer's instructions. For cilia analysis, fibroblasts at 70% confluence were serum starved for 24 h before fixation.

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

Videomicroscopy

For mitotic progression studies, HeLa cells stably expressing H2B-RFP, were cultured in 35 mm diameter bottom glass petridishes (MatTek). 48h after transfection, mitosis progression was imaged using a TCS SP8 confocal microscope kept at 37 °C with 5% CO_2. Acquisitions were every 3 min for 12 h. For slice culture, E16 brains from E14 DCX-empty vector or DCX-KIF2A-WT or DCX-KIF2A p.His321Asp electroporated embryos from Swiss mice, were embedded in 3% low-melt agarose (BioRad) diluted in HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, ThermoFisher Scientific) and sliced (300 μm) with a vibratome (Leica VT1000S, Leica Microsystems). Brain slices were cultured 16 to 24 h in semi-dry conditions (Millicell inserts, Merck Millipore), in a humidified incubator at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere in wells containing Neurobasal medium supplemented with 2% B27, 1% N2, and 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Life Technologies). Slice cultures were placed in a humidified and thermoregulated chamber maintained at 37 °C on the stage of an inverted confocal microscope. Time-lapse confocal microscopy was performed with a Leica SP8 scanning confocal microscope. Images were taken with a 25X objective and 25 successive 'z' optical plans spanning 50 μm every 30 min during 10 h. Sequences were analysed using Image J.

Spindle parameters assays

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

Statistics

All statistics were calculated with GraphPad Prism 6 (GraphPad Software). One-way ANOVA was performed for multiple comparisons (Empty vector, KIF2A WT, KIF2A p.His321Asp and KIF2A p.Ser317Asn) followed by the appropriate post hoc tests, whereas unpaired two-tailed Student's *t*-test was used for dual comparisons (Scramble vs. sh-KIF2A). $P < 0.05$ was considered significant with $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$. All the statistical tests were two-sided. No statistical methods were used to predetermine sample sizes but sample sizes were estimated on the basis of previous experiments in the laboratory and are similar to those generally employed in the field. After histological examination, only brains with comparative electroporated regions and efficiencies were conserved for quantification. For cellular experiments no data points were excluded and all data collected from each individual experiment was used for the analysis. No randomization procedure was applied in this study. Data distribution was not tested but assumed to be normal. The investigator was not blinded for data collection and analysis. All the statistical details are reported in supplemental material.

Study approval

The collection of primary cultures of fibroblasts was established from affected individuals skin biopsies at the Cochin Hospital-Cochin Institute. For the MCD affected person (female, 1 year old) included in this study, signed informed consent was obtained to collect and study biological resources, and establish primary cultures of fibroblasts at the Hospital Cell Bank-Cochin Assistance Publique Hôpitaux de Paris (APHP). This collection of fibroblasts was declared to legal and ethical authorities at the Ministry of Research (number of declaration, 701, n° of the modified declaration, 701–1) via the medical hosting institution, APHP, and to the 'Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés' (CNIL) (number of declaration, 1154515).

The study has the Animal Experimentation Research Ethics Committee approval (N° 2014–059).

Supplementary Material

Supplementary Material is available at *HMG* online.

Acknowledgements

We are grateful to the patient and their parents who have accepted the establishment of cultures of fibroblasts. We thank the imaging facility of the IGBMC for help with image acquisitions. We also want to acknowledge Frédéric Saudou for

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by IGBMC - ULP user on 22 October 2019

complementary studies involving the cellular consequences of *KIF2A* variants.

Conflict of Interest statement. None declared.

Funding

Strasbourg University and grant ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State Fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame program Investissements d'Avenir ANR-10-IDEX-0002–02, the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM funding within the framework of the program Equipe FRM; J.C–DEQ20130326477), the Fondation Maladies Rares, the Fondation NRJ–Institut de France, Agence National de Recherche (ANR 15-CE16–0018-01, project E10107KP; ANR-13-BSV-0009–01) and European Union DESIRE (grant agreement 602531). RB and FF thank the French Agence National de la Recherche (ANR-13-BSV4–0008-01), JTC 2015 Neurodevelopmental Disorders, NEURON8-Full-815–006 STEM-MCD, Inserm, CNRS, UPMC, the Fondation Bettencourt Schueller, the Fédération pour la Recherche sur le cerveau (FRC), as well as the IFM animal house and imaging facilities, supported by the Ile de France region and the FRC Rotary. FF and RB are associated with the BioPsy Labex project and the Ecole des Neurosciences de Paris Ile-de-France network.

References

1. Desikan, R.S. and Barkovich, A.J. (2016) Malformations of cortical development. *Ann. Neurol.*, **80**, 797–810.
2. des Portes, V., Francis, F., Pinard, J.M., Desguerre, I., Moutard, M.L., Snoeck, I., Meiners, L.C., Capron, F., Cusmai, R. and Ricci, S. (1998) doublecortin is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia (SCLH). *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 1063–1070.
3. Reiner, O., Carrozzo, R., Shen, Y., Wehnert, M., Faustinella, F., Dobyns, W.B., Caskey, C.T. and Ledbetter, D.H. (1993) Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature*, **364**, 717–721.
4. Gleeson, J.G., Allen, K.M., Fox, J.W., Lamperti, E.D., Berkovic, S., Scheffer, I., Cooper, E.C., Dobyns, W.B., Minnerath, S.R., Ross, M.E. *et al.* (1998) Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell*, **92**, 63–72.
5. Bahi-Buisson, N., Souville, I., Fourniol, F.J., Toussaint, A., Moores, C.A., Houdusse, A., Lemaitre, J.Y., Poirier, K., Khalaf-Nazzal, R., Hully, M. *et al.* (2013) New insights into genotype-phenotype correlations for the doublecortin-related lissencephaly spectrum. *Brain*, **136**, 223–244.
6. Keays, D.A., Tian, G., Poirier, K., Huang, G.-J., Siebold, C., Cleak, J., Oliver, P.L., Fray, M., Harvey, R.J., Molnár, Z. *et al.* (2007) Mutations in alpha-tubulin cause abnormal neuronal migration in mice and lissencephaly in humans. *Cell*, **128**, 45–57.
7. Jaglin, X.H. and Chelly, J. (2009) Tubulin-related cortical dysgeneses: microtubule dysfunction underlying neuronal migration defects. *Trends Genet.*, **25**, 555–566.
8. Poirier, K., Saillour, Y., Bahi-Buisson, N., Jaglin, X.H., Fallet-Bianco, C., Nabbout, R., Castelnau-Ptakhine, L., Roubertie, A., Attie-Bitach, T., Desguerre, I. *et al.* (2010) Mutations in the neuronal ß-tubulin subunit TUBB3 result in malformation of cortical development and neuronal migration defects. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 4462–4473.
9. Breuss, M., Heng, J.I.-T., Poirier, K., Tian, G., Jaglin, X.H., Qu, Z., Braun, A., Gstrein, T., Ngo, L., Haas, M. *et al.* (2012) Mutations in the β-tubulin gene TUBB5 cause microcephaly with structural brain abnormalities. *Cell Rep.*, **2**, 1554–1562.
10. Poirier, K., Lebrun, N., Broix, L., Tian, G., Saillour, Y., Boscheron, C., Parrini, E., Valence, S., Pierre, B. Saint, Oger, M. *et al.* (2013) Mutations in TUBG1, DYNC1H1, KIF5C and KIF2A cause malformations of cortical development and microcephaly. *Nat. Genet.*, **45**, 639–647.
11. Bahi-Buisson, N., Poirier, K., Fourniol, F., Saillour, Y., Valence, S., Lebrun, N., Hully, M., Bianco, C.F., Boddaert, N., Elie, C. *et al.* (2014) The wide spectrum of tubulinopathies: what are the key features for the diagnosis?. *Brain*, **137**, 1676–1700.
12. Tischfield, M.A., Cederquist, G.Y., Gupta, M.L. and Engle, E.C. (2011) Phenotypic spectrum of the tubulin-related disorders and functional implications of disease-causing mutations. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **21**, 286–294.
13. Breuss, M., Fritz, T., Gstrein, T., Chan, K., Ushakova, L., Yu, N., Vonberg, F.W., Werner, B., Elling, U. and Keays, D.A. (2016) Mutations in the murine homologue of TUBB5 cause microcephaly by perturbing cell cycle progression and inducing p53-associated apoptosis. *Development*, **143**, 1126–1133.
14. Saillour, Y., Broix, L., Bruel-Jungerman, E., Lebrun, N., Muraca, G., Rucci, J., Poirier, K., Belvindrah, R., Francis, F. and Chelly, J. (2014) Beta tubulin isoforms are not interchangeable for rescuing impaired radial migration due to Tubb3 knockdown. *Hum. Mol. Genet.*, **23**, 1516–1526.
15. Cavallin, M., Bijlsma, E.K., El Morjani, A., Moutton, S., Peeters, E.A.J., Maillard, C., Pedespan, J.M., Guerrot, A.-M., Drouin-Garaud, V., Coubes, C. *et al.* (2017) Recurrent KIF2A mutations are responsible for classic lissencephaly. *Neurogenetics*, **18**, 73–79.
16. Tian, G., Cristancho, A.G., Dubbs, H.A., Liu, G.T., Cowan, N.J. and Goldberg, E.M. (2016) A patient with lissencephaly, developmental delay, and infantile spasms, due to de novo heterozygous mutation of *KIF2A*. *Mol. Genet. Genomic Med.*, **4**, 599–603.
17. Desai, A., Verma, S., Mitchison, T.J. and Walczak, C.E. (1999) Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes. *Cell*, **96**, 69–78.
18. Walczak, C.E., Gayek, S. and Ohi, R. (2013) Microtubule-depolymerizing kinesins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **29**, 417–441.
19. Ems-McClung, S.C. and Walczak, C.E. (2010) Kinesin-13s in mitosis: Key players in the spatial and temporal organization of spindle microtubules. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **21**, 276–282.
20. Jang, C.-Y., Wong, J., Coppinger, J.A., Seki, A., Yates, J.R. and Fang, G. (2008) DDA3 recruits microtubule depolymerase Kif2a to spindle poles and controls spindle dynamics and mitotic chromosome movement. *J. Cell Biol.*, **181**, 255–267.
21. Ganem, N.J., Upton, K. and Compton, D.A. (2005) Efficient mitosis in human cells lacking poleward microtubule flux. *Curr. Biol.*, **15**, 1827–1832.
22. Uehara, R., Tsukada, Y., Kamasaki, T., Poser, I., Yoda, K., Gerlich, D.W. and Goshima, G. (2013) Aurora B and Kif2A control microtubule length for assembly of a functional central spindle during anaphase. *J. Cell Biol.*, **202**, 623–636.
23. Kwon, H.J., Park, J.E., Song, H. and Jang, C.-Y. (2016) DDA3 and Mdp3 modulate Kif2a recruitment onto the mitotic spindle to control minus-end spindle dynamics. *J. Cell Sci.*, **129**, 2719–2725.

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by IGBMC - ULP user on 22 October 2019

24. Manning, A.L., Ganem, N.J., Bakhoum, S.F., Wagenbach, M., Wordeman, L. and Compton, D.A. (2007) The kinesin-13 proteins Kif2a, Kif2b, and Kif2c/MCAK have distinct roles during mitosis in human cells. *Mol. Biol. Cell*, **18**, 2970–2979.
25. Homma, N., Takei, Y., Tanaka, Y., Nakata, T., Terada, S., Kikkawa, M., Noda, Y. and Hirokawa, N. (2003) Kinesin superfamily protein 2A (KIF2A) functions in suppression of collateral branch extension. *Cell*, **114**, 229–239.
26. Maor-Nof, M., Homma, N., Raanan, C., Nof, A., Hirokawa, N. and Yaron, A. (2013) Axonal pruning is actively regulated by the microtubule-destabilizing protein kinesin superfamily protein 2A. *Cell Rep.*, **3**, 971–977.
27. Noda, Y., Sato-Yoshitake, R., Kondo, S., Nangaku, M. and Hirokawa, N. (1995) KIF2 is a new microtubule-based anterograde motor that transports membranous organelles distinct from those carried by kinesin heavy chain or KIF3A/B. *J. Cell Biol.*, **129**, 157–167.
28. Miyamoto, T., Hosoba, K., Ochiai, H., Royba, E., Izumi, H., Sakuma, T., Yamamoto, T., Dynlacht, B.D. and Matsuura, S. (2015) The Microtubule-Depolymerizing Activity of a Mitotic Kinesin Protein KIF2A Drives Primary Cilia Disassembly Coupled with Cell Proliferation. *Cell Rep.*, **10**, 664–673.
29. Bilgüvar, K., Öztürk, A.K., Louvi, A., Kwan, K.Y., Choi, M., Tatlı, B., Yalnızoğlu, D., Tüysüz, B., Çağlayan, A.O., Gökben, S. *et al.* (2010) Whole-exome sequencing identifies recessive WDR62 mutations in severe brain malformations. *Nature*, **467**, 207–210.
30. Santos, D.V.M. dos (2012) Regulation of neural stem cell proliferation and differentiation by apoptosis-relevant factors. **5**, 1–17.
31. Barry, D.S., Pakan, J.M.P. and McDermott, K.W. (2014) Radial glial cells: key organisers in CNS development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **46**, 76–79.
32. Marín, O., Valiente, M., Ge, X. and Tsai, L.-H. (2010) Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**, a001834.
33. Fietz, S.A. and Huttner, W.B. (2011) Cortical progenitor expansion, self-renewal and neurogenesis-a polarized perspective. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **21**, 23–35.
34. Shitamukai, A. and Matsuzaki, F. (2012) Control of asymmetric cell division of mammalian neural progenitors. *Dev. Growth Differ.*, **54**, 277–286.
35. Ganem, N.J. and Compton, D.A. (2004) The KinI kinesin Kif2a is required for bipolar spindle assembly through a functional relationship with MCAK. *J. Cell Biol.*, **166**, 473–478.
36. Valente, E.M., Rosti, R.O., Gibbs, E. and Gleeson, J.G. (2014) Primary cilia in neurodevelopmental disorders. *Nat. Rev. Neurol.*, **10**, 27–36.
37. Yang, Y.-T., Wang, C.-L. and Van Aelst, L. (2012) DOCK7 interacts with TACC3 to regulate interkinetic nuclear migration and cortical neurogenesis. *Nat. Neurosci.*, **15**, 1201–1210.
38. Schenk, J., Wilsch-Brauninger, M., Calegari, F. and Huttner, W.B. (2009) Myosin II is required for interkinetic nuclear migration of neural progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **106**, 16487–16492.
39. Jaillard, S., Andrieux, J., Plessis, G., Krepischi, A.C.V., Lucas, J., David, V., Le Brun, M., Bertola, D.R., David, A., Belaud-Rotureau, M.-A. *et al.* (2011) 5q12.1 deletion: Delineation of a phenotype including mental retardation and ocular defects. *Am. J. Med. Genet., Part A*, **155**, 725–731.
40. Moores, C.A. and Milligan, R.A. (2006) Lucky 13-microtubule depolymerisation by kinesin-13 motors. *J. Cell Sci.*, **119**, 3905–3913.
41. Jiang, X. and Nardelli, J. (2016) Cellular and molecular introduction to brain development. *Neurobiol. Dis.*, **92**, 3–17.
42. Kriegstein, A.R. and Noctor, S.C. (2004) Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci.*, **27**, 392–399.
43. Tsai, L.-H. and Gleeson, J.G. (2005) Minireview Nucleokinesis in Neuronal Migration. *Neuron*, **46**, 383–388.
44. Heng, J.I.-T., Chariot, A. and Nguyen, L. (2010) Molecular layers underlying cytoskeletal remodelling during cortical development. *Trends Neurosci.*, **33**, 38–47.
45. Bai, J., Ramos, R.L., Ackman, J.B., Thomas, A.M., Lee, R.V. and LoTurco, J.J. (2003) RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nat. Neurosci.*, **6**, 1277–1283.
46. Tsai, J.-W., Bremner, K.H. and Vallee, R.B. (2007) Dual subcellular roles for LIS1 and dynein in radial neuronal migration in live brain tissue. *Nat. Neurosci.*, **10**, 970–979.
47. Greig, L.C., Woodworth, M.B., Galazo, M.J., Padmanabhan, H. and Macklis, J.D. (2013) Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nat. Rev. Neurosci.*, **14**, 755–769.
48. Izawa, I., Goto, H., Kasahara, K., Inagaki, M., Singla, V., Reiter, J., Nigg, E., Raff, J., Goetz, S., Anderson, K. *et al.* (2015) Current topics of functional links between primary cilia and cell cycle. *Cilia*, **4**, 12.
49. Doobin, D.J., Kemal, S., Dantas, T.J. and Vallee, R.B. (2016) Severe NDE1-mediated microcephaly results from neural progenitor cell cycle arrests at multiple specific stages. *Nat. Commun.*, **7**, 1–14.
50. Li, A., Saito, M., Chuang, J.-Z., Tseng, Y.-Y., Dedesma, C., Tomizawa, K., Kaitsuka, T. and Sung, C.-H. (2011) Ciliary transition zone activation of phosphorylated Tctex-1 controls ciliary resorption, S-phase entry and fate of neural progenitors. *Nat. Cell Biol.*, **13**, 402–411.
51. Alcantara, D. and O'Driscoll, M. (2014) Congenital microcephaly. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.*, **166C**, 124–139.
52. Jayaraman, D., Kodani, A., Gonzalez, D.M., Mancias, J.D., Mochida, G.H., Vagnoni, C., Johnson, J., Krogan, N., Harper, J.W., Reiter, J.F. *et al.* (2016) Microcephaly Proteins Wdr62 and Aspm Define a Mother Centriole Complex Regulating Centriole Biogenesis, Apical Complex, and Cell Fate. *Neuron*, **92**, 813–828.
53. Gabriel, E., Wason, A., Ramani, A., Gooi, L.M., Keller, P., Pozniakovsky, A., Poser, I., Noack, F., Telugu, N.S., Calegari, F. *et al.* (2016) CPAP promotes timely cilium disassembly to maintain neural progenitor pool. *embo J.*, **35**, 803–819.
54. Mick, D.U., Rodrigues, R.B., Leib, R.D., Adams, C.M., Chien, A.S., Gygi, S.P. and Nachury, M.V. (2015) Proteomics of Primary Cilia by Proximity Labeling. *Dev. Cell*, **35**, 497–512.
55. Gupta, G.D., Coyaud, É., Gonçalves, J., Mojarad, B.A., Liu, Y., Wu, Q., Gheiratmand, L., Comartin, D., Tkach, J.M., Cheung, S.W.T. *et al.* (2015) A Dynamic Protein Interaction Landscape of the Human Centrosome-Cilium Interface. *Cell*, **163**, 1484–1499.
56. Boldt, K., van Reeuwijk, J., Lu, Q., Koutroumpas, K., Nguyen, T.-M.T., Texier, Y., van Beersum, S.E.C., Horn, N., Willer, J.R., Mans, D.A. *et al.* (2016) An organelle-specific protein landscape identifies novel diseases and molecular mechanisms. *Nat. Commun.*, **7**, 11491.

Downloaded from https://academic.oup.com/hmg/article-abstract/27/2/224/4565495 by IGBMC - ULP user on 22 October 2019

Article 2

Conditional switching of KIF2A mutation provides new insights into cortical malformations pathogeny

Johan G. Gilet, Ekaterina Ivanova, Daria Trofimova, Gabrielle Rudolf, Hamid Meziane, Loic Broix, Nathalie Drouot, Jeremie Courraud, Valerie Skory, Paul Voulleminot, Maria Osipenko, Nadia Bahi-Buisson, Binnaz Yalcin, Marie-Christine Birling, Maria-Victoria Hinckelmann, Benjamin H. Kwok, John S. Allingham, Jamel Chelly

Article en révision dans *Human Molecular Genetics* en 2019

Résumé :

En utilisant la technologie de recombinaison basée sur le système Cre-Lox, nous avons généré avec succès un modèle souris knock-in conditionnel exprimant la mutation p.His321Asp dans le gène *KIF2A* identifiée chez un patient atteint de malformation du développement cortical. Ce modèle souris présente des anomalies neuro-anatomiques et une microcéphalie, toutes deux associées à des troubles comportementaux et une susceptibilité à l'épilepsie similaires aux phénotypes cliniques présents chez le patient. Par l'utilisation des propriétés conditionnelles de ce modèle, nous l'avons croisé avec différentes souches murines exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle de promoteurs spécifiques tels que Rosa-Cre, Nestin-Cre et Nex-Cre afin de disséquer les mécanismes physiopathologiques sous-jacents aux anomalies du développement cortical. Par cette étude, nous montrons que l'expression de la mutation pathogène p.His321Asp augmente l'apoptose et provoque une anomalie de la transition multipolaire-bipolaire des neurones nouvellement formés. Nous démontrons en outre que les phénotypes cellulaires observés sont probablement liés à une déficience de la fonction de dépolymérisation des microtubules par la protéine KIF2A. L'ensemble de ces résultats fournit des pistes pour la compréhension du développement cortical et des défauts de formation du cortex cérébral qui caractérisent la pathologie humaine liée aux mutations *KIF2A*.

Conditional switching of KIF2A mutation provides new insights into cortical malformations pathogeny

Johan Gilet[1-4], Ekaterina Ivanova[1-4], Daria Trofimova[8], Gabrielle Rudolf[1-4], Hamid Meziane[7], Loic Broix[1-4], Nathalie Drouot[1-4], Jeremie Courraud[1-4], Valerie Skory[1-4], Paul Voulleminot[6], Maria Osipenko[1-4], Nadia Bahi-Buisson[9], Binnaz Yalcin[1-4] ,Marie-Christine Birling[7], Maria-Victoria Hinckelmann[1-4], Benjamin H. Kwok[10], John S. Allingham[8], Jamel Chelly[1-5*]

[1]Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch 67400, France,
[2]CNRS U7104, Illkirch 67400, France,
[3]INSERM U964, Illkirch 67400, France,
[4]Université de Strasbourg, Illkirch 67400, France,
[5]Service de Diagnostic Génétique, Hôpital Civil de Strasbourg, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg 67000, France.
[6] Département de Neurologie, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.
[7]Université de Strasbourg, CNRS, INSERM, CELPHEDIA PHENOMIN-Institut Clinique de la Souris (ICS), 1 rue Laurent Fries, F-67404 Illkirch-Graffenstaden, France.2. Centre National de la Recherche Scientifique, UMR7104, 67400 Illkirch, France,
[8]Department of Biomedical and Molecular Sciences, Queen's University, Kingston, ON K7L 3N6, Canada.
[9]Paris Descartes – Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute, Paris 75015, France,
[10]Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Département de médecine, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Station Centre-Ville, Montréal, QC H3C 3J7, Canada.

Corresponding author

Pr Jamel Chelly

IGBMC, 1 rue Laurent Fries

67400 ILLKIRCH, France.

Tel : 33 3 88 65 57 46

Email: jamel.chelly@igbmc.fr

Abstract

By using the Cre-mediated genetic switch technology, we were able to successfully generate a conditional knock-in mouse, bearing the *KIF2A* p.His321Asp missense point variant, identified in a subject with malformations of cortical development. These mice present with neuroanatomical anomalies and microcephaly associated with behavioral deficiencies and susceptibility to epilepsy, correlating with the described human phenotype. Using the flexibility of this model provides, we investigated $Rosa^{Cre}$, $Nestin^{Cre}$ and Nex^{Cre} driven expression of the

mutation to dissect the pathophysiological mechanisms underlying neurodevelopmental cortical abnormalities. We show that expression of the p.His321Asp pathogenic variant increases apoptosis and causes abnormal multipolar to bipolar transition in newborn neurons, providing therefore insights to better understand cortical organization and brain growth defects that characterize KIF2A-related human disorders. We further demonstrate that the observed cellular phenotypes are likely to be linked to deficiency in the microtubule depolymerizing function of KIF2A.

Keywords: KIF2A, microtubule dynamics, knock-in, mouse model, malformations of cortical development, cortex, hippocampus, *in-utero* electroporation, neuronal migration, apoptosis, videomicroscopy.

Introduction

Proper development of the human cerebral cortex is based on three major, highly regulated processes: progenitor's proliferation, followed by migration of post-mitotic neurons in the cortical plate and finally their differentiation. Alterations in one of these processes can lead to malformations of cortical development (MCD), often associated with intellectual disability and pharmaco-resistant epilepsy. Our team and others have previously identified mutations in the KIF2A gene in patients with MCD, diagnosed by MRI sequences with posterior pachygyria and microcephaly (1–3). *KIF2A* encodes for a kinesin from the Kinesin-13 family, implicated in the regulation of microtubule (MT) plus-end dynamics (4, 5) and individuals with missense mutations in this gene present cortical gyration abnormalities and microcephaly causing pharmaco-resistant epilepsy and intellectual disability (1–3). Using *in utero* electroporation and overexpression approaches, we have recently shown desease causing missense variants disrupt projection neurons positioning, interneuron migration and progenitor proliferation (6). Altered neuronal migration dynamics, together with defects in the coupling between cell cycle and ciliogenesis, were suggested to underlie the pathogenesis of the related cortical malformations.

In order to better understand the in vivo implications of KIF2A mutations in the pathophysiology of MCD, we have designed and engineered, a conditional knock-in (cKI) mouse model, expressing the heterozygous human p.His321Asp mutation. This variant was identified by whole exome sequencing (WES) as causative mutation in a subject with malformations of cortical development (1). Likewise, several other de novo heterozygous missense mutations in KIF2A were linked to MCD and have been shown to disrupt neurodevelopmental processes (6).

We have developed the cKI KIF2A mouse model by using an improved strategy of the Cre-dependant genetic switch (FLEx switch) previously reported by Schnütgen and colleagues (7). This system that is based on rearrangement events mediated by the Cre recombninase and two pairs of both wild type and mutant LoxP sies allows shifting genetic expression from one sequence to another of interest. The FLEx technology was shown to be efficient and functional as long as the two sequences are sufficiently different. However, in case of high degree of homology between an endogenous exonic sequence and the sequence bearing a missense mutation of interest, the system leads to the formation of unstable RNA secondary structure followed by an excision of the endogenous exon and thereby to a model expressing a deleted transcript rather than a point mutation model. Thus, generating conditional knock-in mouse models bearing single, point mutations remains futile with the FLEx switch system. To overcome this limitation, we have developed an improved conditional FLEx switch system (FLExII) with the aim to avoid RNA recombination and subsequent exonic excision. The novelty in this FLExII switch system illustrated in figure 1 resides in the degeneration of the exonic sequence in antisense orientation to reduce identity and overcome the abovementioned constraints.

In this study, we demonstrate the efficiency of the strategy through crosses with three different Cre-expressing mouse lines. Thus Cre mediated cellular-specific expression of the p.His321Asp mutation allowed us to independently study effects on radial glial cells and post-mitotic neurons. We show that knock-in *KIF2A*$^{+/H321D}$ mice present microcephaly, hippocampal

structure abnormalities and cortical layer disorganization resulting from abnormal neuronal migration and increased cell death. Furthermore, we show that the observed cellular phenotypes are likely to be linked to deficiency in the MT depolymerizing function of KIF2A.

Results

Design and validation of the strategy used to develop the conditional knock-in KIF2A mouse model.

To study the pathophysiological mechanisms of MCDs resulting from *KIF2A* mutations, we generated a *KIF2A*$^{+/H321D}$ conditional knock-in mouse. Since all identified MCD-related KIF2A variants are heterozygous missense mutations and exert their pathogenicity through a dominant mechanism, conditional knock-in mouse model emerged as the most appropriate strategy to dissect neurodevelopmental processes underlying KIF2A-related MCDl.

In order to develop the conditional knock-in Kif2a mouse model, we generated a plasmid construct (that was used for electroporation in ES cells) containing one pair of wild-type loxP sites and one pair of lox511 sites, with an alternate organization a head-to head orientation within each pair of sites. The plasmid contained the DNA encoding the mouse exon 10 sequence and mouse intronic flanking sequences in the sense orientation; and the modified "degenerated" human sequence of exon 10 bearing the mutation (c.961C>G, p.His321Asp) and its flanking intronic sequences in the antisense orientation (**Fig 1a**). Using this strategy, sequence comparison between WT and mutated exons showed that the homology was decreased from 96% homology (for the human sequence) and 100% homology (for the mouse sequence) to only 42% homology. Bioinformatics simulations predicted this "neo-exon", with significantly reduced homology with the mouse sequence, flanked by human intronic sequences could be spliced at the expected canonical splicing sites.

As illustrated in figure 1a, both loxP and lox511 sites are recognized by Cre-recombinase; however lox511 sites recombine efficiently with themselves but not with loxP sites. Thus, Cre-mediated recombination first induces inversion of the DNA at either loxP or lox511 sites

generating a repeat of either two loxP or two lox511 sites. Further Cre-mediated excision then results in the elimination of the DNA sequence contained between the two loxP or lox511 sites. As a result, the allele construct contains single loxP and lox511 sites making further inversion impossible, and the promoter drives the stable expression of the mutant Kif2a instead of wild type Kif2a.

Prior to the development of the mouse models, we first validated in in ES cell clones the FLExII switch system through an assessement of the correct splicing and expression of the allele bearing the construct before and after the Cre-mediated inversion/excision of engineered cassette . Indeed, to verify the correct cre-mediated rearrangement and RNA expression, we performed RT-PCR, qPCR and Sanger sequencing. Sequencing of cDNA showed the heterozygous presence of the c.961C<G (p.His321Asp) mutation and also presence of the human degenerated sequence (**Fig S1a**). Next, we performed, quantitative RT-PCR using two primer pairs: one between the exons 9 and 12 including the full KIF2A FLExII construction and one specific to the cDNA sequence of the WT KIF2A mouse exon 10 (**Fig S1b**). Using the first couple of primers and before action of the Cre recombinase, levels of *KIF2A* exon 9-12 comprising the *KIF2A* WT mRNA and the FLExII construct are comparable between WT and KIF2A$^{+/Flex}$ cells (**Fig S1c**). However, after the action of the Cre, two distinct melting peaks are visible, due to the presence of mismatches between transcripts produced by the WT and the mutant alleles, allowing therefore to distinguish the two isoforms. The expression of each WT and mutant allele represented about 50% of total mRNA (**Fig S1c**). Using the second pair of primers allowing to monitor levels of the WT *KIF2A* allele, we observe similar levels between WT condition and *KIF2A*$^{+/Flex}$ before action of the Cre. After action of the Cre, in *KIF2A*$^{+/H321D}$ we observe a decrease of about 50% in WT mRNA levels showing a switch in expression from the WT to the mutant allele (**Fig S1c**). Thus, having confirmed correct functioning of the construct in ES cells, we proceeded to generating *KIF2A*$^{+/Flex}$ animals. Mice heterozygous for the FLExII allele, *KIF2A*$^{+/Flex}$, were then crossed with transgenic animals expressing the Cre recombinase ubiquitously (*Rosa*^{Cre} mice) (8), under the neuronal progenitor-specific promoter

Nestin (*Nestin*^{Cre} mice) (9), or under the control of the post-mitotic neuron specific promoter Nex (*Nex*^{Cre} mice) (10). We then verified the correct Cre-mediated inversion/excision, RNA expression and presence of the c.961C<G (p.His321Asp) mutation on cortical extracts (**Fig 1b**). Additionally, using quantitative RT-PCR, we obtained results similar to those in ES cells (**Fig 1c**). After breeding with *Rosa*^{Cre} and *Nestin*^{Cre} mice, we observe a decrease of about 50% in WT mRNA levels, demonstrating a switch from WT to mutant allele (**Fig 1c**).

Altogether these observations show that in the absence of Cre recombinase the engineered allele bearing the FLExII cassette produces a normal non rearranged stable transcripts at a level that is similar to the one produced by the WT allele. While, after Cre-recombinase expression, the FLExII cassette undergo inversion/excision events resulting in the expected switching from the mouse WT Kif2a exon 10 to the mutant Kif2a degenerated exon and an expression of a non-rearranged mutant transcript.at a level that is equivalent to the one produced by the WT allele.

We further assessed KIF2A protein expression in mouse cortices by Western blot and confirmed a stable and non-truncated protein in both *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Nestin*^{Cre} and *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Rosa*^{Cre} conditions (**Fig 1d**). Finally, we performed immunohistochemistry on mouse cortices in *KIF2A*$^{+/Flex}$ and *KIF2A*$^{+/H321D}$*Rosa*^{Cre} mice, at different embryonic (E12, E15, E18) and postnatal (P2, 10 weeks) stages. KIF2A is expressed throughout the cortex in both embryonic and adult cortices, however abnormal subcellular localization is clearly visible for the mutant protein. In *KIF2A*$^{+/Flex}$ embryos, the protein presented with a homogenous cytoplasmic distribution (**Fig 1e**, left panel), while in *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Nestin*^{Cre} embryos, the signal was particularly strong at the base of radial glial cells, marked by nestin staining, in the cortical plate, stained by CTIP2 marker, and in neuronal processes, visible by TUJ1 staining (**Fig S2a,b**). This abnormal localization, that was also visible in mutant ES cells in which KIF2A localized along MTs (**Fig S2c**) was even more evident in adult cortices, where KIF2A staining was highly concentrated in axons and dendrites (**Fig S2d**),. Together these observations highlight that the recombinant allele behaves exactly as predicted and that p.His321Asp variant

strongly affects subcellular KIF2A localization, in agreement with our previous results in patient fibroblasts and in-utero electroporated mouse cortices, showing an abnormal localization of mutant KIF2A at MTs (1, 6).

KIF2A$^{+/H321D}$ mice present with global neuroanatomical defects resulting in behavioral and epileptic anomalies

We began our studies by crossing *KIF2A$^{+/Flex}$* mice with *Rosa^{Cre}* mice, to achieve ubiquitous expression of the mutation and thereby physiological conditions, mimicking the ones in which the variant was identified. Obtained *KIF2A$^{+/H321D}$ Rosa^{Cre}* animals were viable and born within the expected Mendelian ratios. However, when *KIF2A$^{+/H321D}$ Rosa^{Cre}* mice were further crossed with C57Bl6/N WT mice to eliminate the presence of the Cre, litters with unexpected Mendelian ratios were obtained. When male KIF2A$^{+/H321D}$*Rosa^{Cre}* animals were bred with C57Bl6/N WT females, the litters were normally-sized (8-10 pups), nonetheless contained only WT pups. When female *KIF2A$^{+/H321D}$ Rosa^{Cre}* mice were bred with WT males, litters were abnormally reduced in size (4-5 pups) and pups' mortality was elevated due to insufficient care from the mother. Due to these constraints we carried on our investigations by systematically crossing *KIF2A$^{+/Flex}$ with Rosa^{Cre}* mice.

KIF2A$^{+/H321D}$Rosa^{Cre} and *KIF2A$^{+/H321D}$Nestin^{Cre}* animals presented underdeveloped appearance with overall smaller size and lower weight compared to WT littermates (**Fig 2a**). Moreover, a reduction in brain size for both lines was already visible at early post-natal stages (P2) (**Fig 2b**). We confirmed presence of microcephaly in adult *KIF2A$^{+/H321D}$Rosa^{Cre}* mice by a comprehensive neuroanatomical studies using a recently developed approach for the assessment of 166 brain parameters across 22 distinct brain regions (**Supplementary Table 1**) (11). This consisted of a systematic quantification of the same sagittal brain region of male mice at exactly 16 weeks of age. Results revealed several major anomalies in *KIF2A$^{+/H321D}$ Rosa^{Cre}* mice with an overall trend of reduced size of multiple areas when compared to WT (**Fig 2c,d**). The cerebellum was the most severely affected brain structure exhibiting a decrease in size of 25.9% associated to a reduction of its internal granular layer (-30.1%) (**Fig**

2e). The hippocampus showed a wide array of neuroanatomical defects: reduced area and length of the pyramidal layers (-31% and -19% respectively), reduced height of the lacunosum molecular and radiatum layers (-25% and -26% respectively) and abnormal CA1 layer organization (**Fig 2f**).

Next, we asked whether the aforedescribed neuroanatomical defects affect the behavior of mice. We tested for behavioral abnormalities by performing a battery of tests evaluating locomotor activity, learning and memory and motor coordination of *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Rosa*^{Cre} mice. We began by investigating the global activity in the Open Field assay for 30 minutes. *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Rosa*^{Cre} mice travelled significantly longer distances in total and at all individual time points, compared to WT littermates (**Fig 2g**). Additionally, mutant animals presented a trend (p=0.0706) of increased number of rearings. Combined, these observations suggest that *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Rosa*^{Cre} mice are hyperactive. We continued our exploration by evaluating learning and memory, which are often affected in mouse models bearing mutations involved in human intellectual disability (12). In the object recognition task, we observed an impaired novel object recognition performance in *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Rosa*^{Cre} mice compared to WT littermates. When animals were allowed to explore an object during the acquisition phase, exploration duration was comparable between WT and knock-in mice (**Fig 2h**). During the retention phase, knock-in mice explored equally the familiar and the new object and their recognition index was around 50%, while WT mice displayed recognition performance significantly above the chance level, presenting clear preference for exploring the new object than the familiar one. Additionally, in the Y-maze paradigm, mutant mice showed lower percentage of spontaneous alternations as compared to WT (**Fig 2i**), suggesting deficient working memory and supporting results obtained in the object recognition task. We then assessed specific motor abilities in knock-in mice, which could be affected by the previously observed reduction in the size of the cerebellum, with the grip test, rotarod and notched-bar paradigms. The grip test, which measures muscular strength independently of coordination, revealed reduced absolute force in *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Rosa*^{Cre} mice (**Fig S3a**). It should however be noted that these animals also presented a significantly decreased body weight correlating with the decrease in their muscular

force. No alterations in motor coordination were observed with the notched-bar and rotarod test (**Fig S3b,c**).

Finally, we analyzed epileptic activity in *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Rosa*^{Cre} animals, by recording superficial cortical electroencephalograms (EEG). No abnormal spontaneous activity was detected for either WT or mutant mice (**Fig 2j**). However, when in *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Rosa*^{Cre} animals were injected with a pro-convulsive dose (10mg/kg) of the seizure provoking agent PTZ, an inhibitor of the γ-aminobutyric acid type 1 (GABAA) receptor widely used for inducing acute seizures (13), a generalized tonicoclonic seizure was recorded one minute following the injection, while no seizure activity was recorded in WT mice. Altogether our behavioral analysis indicated that *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Rosa*^{Cre} mice exhibit memory deficits and hyperactivity, which are a common trait in mouse models of intellectual disability. These features, combined with their increased susceptibility to epilepsy, correlate with the phenotype described in human subjects with mutations in KIF2A (2).

KIF2A p.His321Asp mutation causes hippocampal CA1 heterotopia

We next sought to better characterize the defective organization of the hippocampal structure revealed by our neuroanatomical examination of *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Rosa*^{Cre} mouse brains. To this aim we crossed *KIF2A*$^{+/Flex}$ with *Nestin*^{Cre} mice, thereby limiting the expression of the mutation to the brain and compared results to those obtained in *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Rosa*^{Cre} animals. Immunohistological analysis revealed hippocampal heterotopia in the CA1 region with an additional layer of cells present in the stratum oriens of both *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Nestin*^{Cre} mice (**Fig 3a**) and *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Rosa*^{Cre} mice (**Fig S3d**). Moreover, staining with NeuN showed that heterotopic cells are differentiated neurons and staining with KIF2A confirmed the distinctive abnormal subcellular localization of the protein in both normally and abnormally positioned neurons (**Fig S3e, f**). To define the time at which the heterotopia appears, and since layering in the hippocampus begins during late developmental stages and continues on at early post-natal stages (14), we chose two time-points for further analysis – E18.5 and P2. At E18.5, no

visible difference could be detected between WT and *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Nestin*^{Cre} embryos (**Fig 3b**). In P2 KIF2A$^{+/H321D}$ Nestin^{Cre} pups, staining revealed an already split organization of the pyramidal layer in the CA1 region (**Fig 3c**). To study specifically neuronal migration, independently of proliferation , we used *Nex*^{cre} mice (10) to express the mutation exclusively in post-mitotic brain cells. First, we verified that the crossing with *Nex*^{cre} works properly by verifying the KIF2A phenotype between E16.5 and adult stages in cortical plate. At E16.5, we observed that the KIF2A phenotype are present only in TUJ1 positive cells in the cortical plate (CP) and absent in intermediary progenitor TBR2 positive (**Fig S4a**). At E18.5 the KIF2A phenotype are located only in the Cortical plate (**Fig S4b**) and at adult stages we can observed the same KIF2A mislocalization observed previously in *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Nestin*^{Cre} and *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Rosa*^{Cre} mice in the cortical plate (**Fig S4c**). Under these conditions, when the mutation is only expressed in post-mitotic neurons, P2 and adult *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Nex*^{Cre} mice still present hippocampal CA1 heterotopia (**Fig3d**), pointing to a defective neuronal migration. Together, our data suggest that the hippocampal heterotopia observed in adult mice appears to be predominantly linked to post-mitotic pathophysiological mechanisms.

KIF2A$^{+/H321D}$ mice show cortical layering and neuronal positioning abnormalities

We then asked whether abnormalities can be found in the developing cortex of the *KIF2A* mouse model. To investigate cortical layering, we performed immunohistochemistry analysis on E18.5 *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nestin*^{Cre} and *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Rosa*^{Cre} embryos by using SATB2, CTIP2 and TRB1 antibodies, labelling respectively the upper II-IV cortical layers, layer V and layer VI. We observed no differences in the total thickness of the cortical plate between *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nestin*^{Cre}, *KIF2A*$^{+/H321D}$*Rosa*^{Cre} and WT E18.5 embryos. However, analysis of individual layers revealed significant anomalies in cortical organization. SATB2 staining showed the presence of cells destined to the II-IV cortical layers positioned at the interface between the intermediate zone and the cortical plate in both *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Nestin*^{Cre} and *KIF2A*$^{+/H321D}$*Rosa*^{Cre} mice, which is absent in the WT mice. However, the total thickness of these upper cortical layers was only slightly increased in *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Nestin*^{Cre}, but not in

KIF2A$^{+/H321D}$*Rosa*^{Cre} embryos compared to controls (**Fig 4 a**, **Fig S5a**). Furthermore, CTIP2 staining revealed that layer V presents with disorganized structure, with an increase in thickness and a decreased in the cell density compared to the WT (**Fig 4a,b**, **Fig S5a,b**). Finally, TBR1 staining highlighted reduced thickness of layer VI in mutant *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Nestin*^{Cre} but not in *KIF2A*$^{+/H321D}$*Rosa*^{Cre} embryos. We further carried the same immunohistochemistry analysis in *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nestin*^{Cre} P2 mice. Even though, overall phenotype was milder for mutant pups, disorganization in layer V and heterotopic cells in the IZ destined for the II-IV cortical layers were still visible (**Fig 4c, d**). To confirm alterations in positioning of pyramidal neurons in the neocortex, suggested by the abnormal layering, we injected pregnant mice with a pulse of EDU at E14.5, to stain specifically layer II-IV cells which are proliferating at this stage **(Fig S5c**). Analysis at E18.5 showed an accumulation of cells in the intermediate zone of both *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nestin*^{Cre} and *KIF2A*$^{+/H321D}$*Rosa*^{Cre} embryos**,** correlating with a decrease in the number of cells in the upper cortical plate (**Fig 4e**, **Fig S5d**). To unravel the underlying causes, we examined neuronal migration by time-lapse recordings and verified the integrity of radial glial fibers. Our videomicroscopy studies showed no major differences in the migration velocity or pausing of neurons between *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Nestin*^{Cre} and WT embryos (**Fig S5e, f, supplementary video 1,2**). However, there was a trend of decrease in the number of multipolar cells transiting to a bipolar morphology and increase in the number of multipolar cells persisting multipolar (**Fig S5g**), suggesting a possible defect in the morphology transition step preceding locomotion. To further evaluate this anomaly, we performed in utero electroporation on E14.5 *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Nestin*^{Cre} embryos to label cells with a fluorescent reporter and then studied their morphology in the intermediate zone three days later. In control brains, the majority of new-born neurons displayed bipolar morphology (63% on average), around 25% were round and around 10% multipolar (**Fig 4f**). In *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Nestin*^{Cre} embryos the populations of round and multipolar cells in the IZ were significantly increased while the number of bipolar cells was reduced, confirming our hypothesis of defective multipolar to bipolar transition.

Finally, we assessed the glial scaffold in the cortical plate at E15.5 by in-utero electroporating GFP under the control of a BLBP promoter (15). We observed no major anomalies in radial glial fibers (**Fig S5 h**). Given these results, it is possible to propose that anomalies in neuronal positioning in the neocortex are linked to a defective multipolar to bipolar morphology transition. Next, again we took advantage of our mouse model performed the same analyses of layering and migration on *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Nex*^{cre} mice, focusing exclusively on post-mitotic effects of the mutation. At E18.5, anomalies were again visible in the organization of cortical layer V, with an increase in thickness and a decrease in cell density (**Fig 4 g,h**). Similarly, a small population of EdU positive cells labelled at E14.5, were detected in the intermediate zone of E18.5 embryonic cortices (**Fig 4 i**). These observations confirm that abnormal cortical layering in *KIF2A*$^{+/H321D}$ embryos is mainly caused by post-mitotic mechanisms of neuronal positioning

Increased cell death but no anomalies in proliferation

To investigate developmental processes underlying microcephaly observed in *KIF2A*$^{+/H321D}$ mice, we studied proliferation of neural progenitors and cell survival rates at different developmental stages. First we analyzed the presence of PH3 (Phosphorylation of histone 3), a marker of highly condensed chromatin during mitosis, especially prophase and metaphase (16) in proliferative cell in the ventricular zone in order to determine their mitotic index. No difference in the population of mitotic progenitors was observed between *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Nestin*^{cre} and WT embryos, at neither of the studied embryonic stages (E12.5, E13.5, E14.5, E16.5) (**Fig S6a**). Next, to investigate whether the *KIF2A* mutation affects the balance between proliferative and neurogenic divisions of progenitors, we performed Pax6/Tbr2/Tuj1 immunolabelling at different developmental stages. We observed no alteration in the relative percentage of apical ($Pax6^+/Tbr2^-$) and basal ($Pax6^-/Tbr2^+$) progenitors. The proportion of newly generated neurons ($Pax6^-/Tbr2^-/Tuj1^+$) also remained the same between mutant and WT mice (**Fig S6b**). Regarding our previous observation with overexpression of p.His321Asp mutation by in-utero electroporation (6), we additionally quantified the length of primary cilia and the percentage of ciliated cells, however we observed no modifications in those parameters (**Fig S6c**).

Combined, these observations show no major effect of the KIF2A p.His321Asp variant on progenitor proliferation or primary cilia in knock-in embryos.

We then assessed cell death by cleaved-caspase 3 immunolabelling. In *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Nestin*^{cre} embryos, cleaved-caspase 3 levels were strikingly upregulated, especially at E12.5 and E13.5 (**Fig 5a,b**). At these early developmental stages, cleaved-caspase 3 positive cells were located mainly in the IZ and the developing cortical plate within layers labelled by TBR2 and TUJ1 (**Fig 5d,e**), suggesting cell death affects both progenitors and newborn neurons. The number of stained cells then progressively decreased at E14.5 and E16.5 (**Fig 5c,d**) and no apoptosis was observed after birth at P2 (**Fig S6d**). Interestingly, protein extracts from *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Nestin*^{cre} embryos at E12 revealed an increase in p53 levels compared to the control embryos (**Fig 5g**) indicating a link between cell death and the p53 pathway.

In *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Nex*^{cre} embryos, increased cell death was still detectable at E14.5 and E16.5 (**Fig 5h,i**), however the extent of the phenotype was significantly lower in comparison to *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Nestin*^{cre} embryos. Additionally, no visible reduction in brain size was detected in P2 pups (**Fig 5j**). Therefore, it is possible to deduce that extensive cell death during early embryonic stages (E12.5-E13.5) is likely the main contributing factor for the microcephaly in *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Nestin*^{cre} mice. In *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Nex*^{cre} animals, slightly increased apoptotic levels appear insufficient to cause a significant reduction in brain size.

KIF2A p.His321Asp mutation affects microtubule dynamics and depolymerization rates

Finally, we aimed to investigate the intracellular mechanisms at the origin of neurodevelopmental disorders in *KIF2A*$^{+/H321D}$ mice. Since KIF2A is described as a MT depolymerizing kinesin (4, 5) we focused our studies on MT dynamics. We conducted a MT depolymerisation assay in fibroblasts derived from the subject in which the mutation was identified. By incubating the cells with the MT depolymerizing agent nocodazole and visualizing MTs at different time points, we show that the KIF2A pathogenic variant causes MT

overstability. For all three unrelated controls, around 50% of the cells present with completely depolymerized MTs after 20 minutes of incubation with nocodazole, while for fibroblasts carrying the *KIF2A* p.His321Asp variant this population is reduced to 25% (**Fig 6a**). We confirmed this result by monitoring live nocodazole-induced MT depolymerization in transfected HeLa cells Tubulin GFP stable line. Even after 30 minutes of incubation with nocodazole, a complex MT network was observed in HeLa cells transfected with the p.His321Asp variant, while almost no MTs were detected in cells expressing an empty vector or KIF2A-WT (**Fig S7a, supplementary video 3,4,5**). We further assessed MT plus end dynamics in fibroblasts by videomicroscopy after transfection with the plus-end binding protein EB3 fused to GFP. A significant increase in plus-end dynamics was observed for fibroblasts carrying the p.His321Asp variant, compared to all three unrelated controls (**Fig 6b, supplementary video 6,7,8,9**). Together these data show that the *KIF2A* mutation modifies the polymerization-depolymerization rates and prevents KIF2A from depolymerizing MTs. To gain insight into the activity difference of wild type Kif2A and the His321Asp mutant, we expressed both proteins as monomeric motor domain constructs that include the kinesin-13-specific neck (Kif2A-NM; amino acids 153–553) (**Fig 6c**) , which is required to catalytically depolymerize MTs in vitro (17–19). Both proteins were purified to homogeneity from E. coli and exhibited the same secondary structure content and stability by circular dichroism (**Fig S7 a,b,c**). According to the distribution of tubulin between supernatant and pellet fractions obtained by centrifugation of reactions in which each protein was mixed with taxol-stabilized MTs, the His321Asp mutant has severely diminished ability to depolymerize MTs in comparison to wild type Kif2A (**Fig 6d,e**). This is to be expected considering the proximity of histidine 321 to the adenine moiety of the nucleotide, and the strict requirement of ATP turnover for catalytic MT depolymerization (**Fig 6f**).

Discussion

Spatial- and temporal-restricted knock-out mouse models can be generated using Cre/lox recombination system. However, expression of a point mutation, irrespective of its position in a given gene, in a tissue- and time-restricted manner is still a challenging issue and efficient strategies remain lacking.

Here, we have used the FLExII switch technology to generate and characterize a conditional knock-in mouse model for malformations of cortical development related to KIF2A mutations. Our objective was to better understand the pathophysiological mechanisms of the p.His321Asp variant which leads to neurodevelopmental disorders associated with epilepsy. We have previously investigated pathogenic KIF2A mutations by the means of in-utero electroporation and in-vitro cellular studies (6), and have now aimed to complete our previous study with an in vivo model that mimics physiological conditions in subjects with Kif2A-related MCD.

We have crossed the conditional model with three different types of Cre: *Rosa*^{Cre} mice to constitutively express the mutation, *Nestin*^{Cre} mice to express the mutation in neuronal progenitors and *Nex*^{Cre} mice to exclusively express the mutation in post mitotic neurons. We used *KIF2A*$^{+/H321D}$*ROSA*^{Cre} mice to mimic the patient condition and showed indeed, that this model recapitulates several phenotypes identified in human patients with *KIF2A* mutations. Namely, *KIF2A*$^{+/H321D}$*ROSA*^{Cre} mice present with neuroanatomical defects and significant reduction in brain size, correlating with the microcephaly and subcortical heterotopia described in subjects (1, 2). Additionally, these mice displayed hyperactivity and memory deficit, which are a hallmark of mouse models of intellectual disability (20). Finally, *KIF2A*$^{+/H321D}$*ROSA*^{Cre} mice have an increased susceptibility to PTZ-induced epileptic seizures. Together, these traits make the *KIF2A*$^{+/H321D}$ mice a model, highly representative of the human disease and a powerful tool for future studies on therapeutic strategies.

We then used *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Nestin*^{Cre} and *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Nex*^{Cre} mice to further decipher the developmental processes contributing to the phenotype. We demonstrate that abnormal

cortical layering and neuronal positioning are mainly caused by anomalies in post-mitotic mechanisms, since these phenotypes were detected in both KIF2A$^{+/H321D}$ Nestin^{Cre} and KIF2A+/H321D NexCre mice. No significant differences were observed between the migration dynamics of Wt and mutant embryos, however, we detected alterations in the multipolar-to-bipolar morphology transition, which could be at the origin of the aforementioned abnormalities. In fact, neurons, unable to adopt a bipolar morphology, would not succeed in initiating glial-guided locomotion and would remain in the intermediate zone of the cortex or hippocampus (23–25). Similar results were obtained in our previous study based on the in-utero electroporation assay, where we showed that introducing the pathogenic variant during cortical development disrupts multipolar to bipolar transition in migrating neurons leading to their accumulation in the IZ. (21, 22). It is possible to hypothesize a link between an aberrant multipolar-to-bipolar transition and the described function of KIF2A in microtubules (MTs) depolymerization (23, 24). This morphological transition is highly dependent on MTs dynamics and MTs-dependent intracellular transport to specific site, mechanical forces and local signaling (25).

We further show that the microcephaly in *KIF2A*$^{+/H321D}$*ROSA*^{Cre} and *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Nestin*^{cre} mice is related to a major increase in cell death during early stages of brain development (E12.5-E13.5). Very high levels of apoptotic cells were detected during these early stages in the entire cortex of *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Nestin*^{cre} but not in *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Nex*^{cre} embryos, which do not present with reduced brain size. We also demonstrate that high cell death correlates with an increased p53 levels. So far, several studies have linked KIF2A inactivation to cell death in cancer tissue (26, 27). They show that apoptosis is linked to a decrease of AKT and PI3K levels after inactivation of KIF2A by si-RNA which subsequently leads to a downregulation of the PI3K-AKT pathway and activation of apoptosis. There is no evidence that KIF2A is a direct upstream regulator of the PI3K/Akt pathway but it is possible to imagine that this alteration is indirectly linked to a defect in MT dynamics. KIF2A also plays a major role during mitosis and chromosome segregation. Perturbation during this processes can lead to an aberrant number

of chromosomes linked to centrosome defect in cell after division and finally a p53 mediated apoptosis without proliferation defects (28, 29).

Interestingly, we found no proliferation defects or primary cilium abnormalities. This is in contrast with our previously published in-utero investigations (6). Indeed, by overexpressing mutant KIF2A during development we have shown defective cell cycle and ciliogenesis. Since in the *KIF2A*$^{+/H321D}$ mouse model, the variant is at physiological concentrations, while with the in-utero electroporation approach the variant is intensely overexpressed and can lead to aberrant dose-dependent effects and the observed difference.

KIF2A plays a major role in MTs dynamics and a disruption of MT depolymerization can interfere with multiple processes requiring MT during cortical development and in particular morphology changes accompanying newborn neurons locomotion. In this line of thoughts, our study raises the possibility that the p.His321Asp variant prevents the KIF2A protein from promoting MTs depolymerization. We have shown that overexpression of mutant KIF2A induces MT stability and halts MT depolymerization. Additionally, we showed by EB3 comets study that KIF2A mutation is associated with an accelerated MTs polymerization rate possibly due to an imbalance in polymerization/depolymerization dynamics. All these results converge toward a MT depolymerizing defect linked to an inability of KIF2A to depolymerize MTs. Several studies have shown that KIF2A needs to bind and hydrolyze ATP in order to be able to depolymerize MT and release the tubulin dimer (19, 23, 30). All mutations in patient with MCD linked to KIF2A are located in ATP binding domain and lead to a sequestration of KIF2A to the MTs (1, 3). Convergent evidence indicates that mutant KIF2A proteins are not able to bind or hydrolyze ATP and to depolymerize MT.

Finally, it should be pointed out that our work additionally demonstrates the functionality of the FLExII Cre-dependent genetic switch technique and confirms it is now possible to generate a conditional knock-in regardless of the position of the point mutation in a given gene. So far and with the exceptions of cKI mouse models targeting last exons and the study reported by Obeng et al (31) most attempts to generate cKI mouse models remained unsuccessful (32). By

degenerating the mutated exon while conserving the same protein sequence except for the mutation, it is possible to significantly reduce the homology between the WT and mutated exons and ensure successful inversion/excision of the recombination allele, as well as stability and bona fide splicing of transcripts bearing the construct.

In view of the findings, we can conclude that by using this new generation of KIF2A conditional knock-in mouse model we were able to modelize the patient phenotypes and dissect spatially the impact of the p.His321Asp mutation on each developmental process. As a perspective, it would be interesting to take advantage of the conditional property of this model to study consequences of post-natal expression of the mutation in mice expected to be free of major neuroanatomical abnormalities and assess whether such late expression contribute to the pathophysiological mechanisms underlying the above highlighted susceptibility to epilepsy.

Author Contributions

J.G.J. and E.L.I. wrote the manuscript.

J.G.J. conceived and designed the experiments, performed experiments and analyzed the data of immunohistochemistry studies in mice, mouse model validation, EB3 studies, qPCR studies, WB.

E.L.I performed experiments and analyzed the data of IUE, Time-lapse, cellular studies in fibroblasts.

D.T. performed and analyzed in vitro experiments

H.M. performed and analyzed behavioral studies.

G.R. performed and analyzed EEG studies.

L.B. provided assistance with validation in ES cells and reviewed the manuscript.

N.D. and V.S. provided technical assistance and prepared reagents.

Jer.C. performed qPCR studies.

P.V. provided assistance with WB experiments.

N.B.B. provided patient fibroblasts

B.Y. designed experiments related to neuroanatomical studies.

M.C.B participated in the development of the mouse model.

M.V.H provided assistance, contributed with suggestions and reviewed the manuscript.

B.H.K and J.S.A. designed experiments related to in vitro studies, provided assistance, contributed with suggestions and reviewed the manuscript.

Jam. C. coordinated and supervised the study.

Funding/ Acknowledgements

This work was supported by grants from the EU Seventh Framework Programme FP7 under the projects GENCODYS (COLLABORATION PROJECT-2009-2.1.1-1/241995 to J.C) and DESIRE (grant agreement no. 602531 to J.C), the French state funds through the “Agence Nationale de la Recherche” under the projects ANR-15-CE16-0018-01, and the programme Investissements d’Avenir labelled [ANR-10-IDEX-0002-02, ANR-10-LABX-0030-INRT, to B.Y. and J.C.. BHK acknowledges the funding support from Canadian Institutes of Health Research (CIHR Project Grant) and the Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish or manuscript preparation. We are grateful to the patient and their parents who have accepted the establishment of cultures of fibroblasts. We thank the Imaging Center of IGBMC (ici.igbmc.fr), in particular Elvire Guiot and Erwan Grandgirard for their assistance in the microscope imaging experiments. We are grateful to Julien Couchet for providing us pSilencer-CAG-Venus-2 plasmids. We are grateful to the staff of the mouse facilities of the Institut Clinique de la souris in particular Chadia Toubari and Nadine Banquart-Ott (ICS) and the Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) for their kind help. We thank Christophe Mittelhauser for is implication in behavioural studies. We would like to thank Dr. Juliette Godin for her careful reading of previous versions of the manuscript and constructive comments.

Declaration of Interests:

The authors declare no competing financial interests.

Figure legends:

Figure 1. Generation of KIF2A Flex II mice.

a, Schematic representation of the plasmid construct used for the generation of the KIF2A Flex II mouse model. Mouse exons 9, 10 and 11 are represented as black rectangles. Human

degenerated exon 10 carrying the His321Asp variant is presented as a yellow rectangle. LoxP and Lox511 sites are represented as red and purple triangles respectively. Upper panel depicts the construct before action of the Cre recombinase. Middle panel shows the two constructs resulting from the Cre-induced inversion. Lower panel shows the final construct after excision.

b, Sequencing of cDNA obtained by RT-PCR on cortical extracts from *KIF2A* $^{+/Flex}$, *KIF2A*$^{+/H321D}$*Rosa*^{Cre} and *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nestin*^{Cre} mice showing the presence in *KIF2A*$^{+/H321D}$*Rosa*^{Cre} and *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nestin*^{Cre} mice of the variant at a heterozygous state.

c, Quantitative PCR analysis of KIF2A levels in cortical extracts from KIF2A $^{+/Flex}$, *KIF2A*$^{+/H321D}$*Rosa*^{Cre} and *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nestin*^{Cre} mice, normalized to actin and represented as a percentage of control (n=3 mice per group).

d, KIF2A protein levels in cortical extracts from *KIF2A* $^{+/Flex}$, *KIF2A*$^{+/H321D}$*Rosa*^{Cre} and *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nestin*^{Cre} mice detected by immunoblotting. Relative quantification of KIF2A protein expression normalized by actin and represented as percentage of control. Data are represented as mean ± s.e.m., n≥3 mice per group.

e, Coronal sections of embryonic mouse cortices (E12, E15, E18), P2 pups and adult animals stained for KIF2A (red). Images on the left show control animals while images on the right present mice carrying the His321Asp variant.

Figure 2. Adult KIF2A$^{+/H321D}$ mice present with neuroanatomical and behavioral anomalies.

a, Weight and appearance of *KIF2A*$^{+/H321D}$*Rosa*^{Cre} mice and corresponding controls (left panel) and *KIF2A*$^{+/H321D}$*Rosa*^{Cre} mice and corresponding controls (right panel). Histograms represent mean ± s.e.m, from at least 5 animals per group.

b-d, Sagittal sections from *KIF2A*$^{+/H321D}$*Rosa*^{Cre} and control mice stained with cresyl violet/luxol blue illustrating brain microcephaly (**b,** scalebar 0.1 cm); cerebellum atrophy (**c**, scalebar 0.1 cm) and abnormal organization of the hippocampal pyramidal layer (**d**, scalebar 200 µm) with insets showing the CA1 region (scale bar 50 µm).

e, Neuroanatomical features of *KIF2A*$^{+/H321D}$*Rosa*^{Cre} mice. **e**, Upper panel: schematic representation of a brain section at Lateral +0.60 mm colored according to p-values. Colored regions indicated the presence of at least one significant parameter within the brain region. White coloring indicates a p-value higher than 0.05 and grey shows not enough data to calculate a p-value. Lower panel: histogram showing variation (decreased-minus scale or increased-positive scale) in areas and lengths expressed as percentage of WT together with

a color map indicating the significance level. n= 4 mice per group, unpaired two-tailed t-test. Numbers indicate assessed brain regions listed on the right.

f, Brains from *KIF2A*$^{+/H321D}$*Rosa*^{Cre} (left panel) and KIF2A$^{+/H321D}$Rosa^{Cre} (right panel) P2 pups and corresponding controls.

g-i, Behavioral tests. **g**, Open field assay. Locomotor activity is presented by the distance travelled (upper panel) and the rearing activity (lower panel). Graphical representations on the left show activity per 5 min intervals. Histograms on the right show total activity during the 30 min session.

h, Novel object recognition test. Histograms represent the time spent exploring the objects during the acquisition (two identical objects) and the retention (one familiar and one novel object) phases. **i**, Y maze test. Histograms show the latency to exit the start arm (sec) and the working memory index corresponding to the spontaneous alteration (SPA) Data are represented as mean ± s.e.m., n=10 *KIF2A*$^{+/H321D}$*Rosa*^{Cre} and n=9 control mice.

j, Representative EEG traces from superficial cortical recordings in *KIF2A*$^{+/H321D}$*Rosa*^{Cre} and WT mice. Left: EEG recordings before PTZ injection without discharge activity. Right: EEG recordings after 10mg/kg of PTZ showing a generalized tonicoclonic seizure for *KIF2A*$^{+/H321D}$*Rosa*^{Cre} animals. L-C: left cortex; R-C: right cortex, n = 3 adult mice per group.

Figure 3. KIF2A$^{+/H321D}$ mice present with hippocampal heterotopia.

a, Coronal sections of the hippocampus in adult *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nestin*^{Cre} and control mice, stained with CTIP2 (magenta), TBR1 (green) and counterstained with DAPI (blue), scale bar 0.2 cm. Insets delimited with a dotted square show higher magnification of the CA1 region, scale bar 0.1 mm.

b-c, Coronal sections of the hippocampus in E18 *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nestin*^{Cre} and control embryos (**b**, scale bar 0.1 cm) and P2 pups (**c**, scale bar 0.2 cm), stained with CTIP2 (red) and counterstained with DAPI (blue).

d, Immunofluorescence staining of CTIP2(green), and DAPI (blue) on hippocampal slices from adult *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Nex*^{cre} mice. Scale bar 0.2 cm. Insets delimited with a dotted square show higher magnification of the CA1 region, scale bar 0.1 cm.

Figure 4. KIF2A$^{+/H321D}$ mice present cortical layering anomalies.

a, Coronal sections of E18 embryonic cortices from *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nestin*^{Cre} and control mice, stained with SATB2 (green), CTIP2 (magenta), TBR1 (gray) and counterstained with DAPI

(blue), scale bar 60 µm. White arrow shows SATB2$^+$ cells in the intermediate zone, white lines delimit layer V. **b**, Histograms showing relative thickness of layers II-IV, V and VI as percentage if the cortical plate (left), total thickness of the cortical plate (right) and cell density of layer V (lower panel). Data are represented as mean ± s.e.m., n≥3 mice per group.

c, Coronal sections of P2 cortices from *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nestin*^{Cre} and control mice, stained with SATB2 (green), CTIP2 (magenta), TBR1 (gray) and counterstained with DAPI (blue), scale bar 60 µm. White arrow shows SATB2$^+$ or CTIP2$^+$ cells in the intermediate zone, white lines delimit layer V. **d**, Histograms showing relative thickness of cortical layers (left) and total thickness of the cortical plate (right). Data are represented as mean ± s.e.m., n≥3 mice per group.

e, Coronal sections of E18 embryonic cortices from *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nestin*^{Cre} and control mice, after EdU staining (yellow) counterstained with DAPI (blue), scale bar 30 µm. The cortex was divided into ten equal bins. White arrows show EdU$^+$ cells accumulation in the intermediate zone. Graphical representation shows the percentage the EDU$^+$ cells in each bin. Data are represented as mean ± s.e.m., n≥3 mice per group. scale bar 60 µm and 30 µm for insets.

f, Coronal sections of E17 embryonic cortices from *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nestin*^{Cre} and control mice, electroporated at E14 with Venus-GFP. Histograms showing percentage of multipolar, round and bipolar cells. Data are represented as mean ± s.e.m., n≥3 mice per group.

g, Coronal sections of E18 embryonic cortices from *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nex*^{Cre} and control mice, stained with SATB2 (green), CTIP2 (magenta), TBR1 (gray) and counterstained with DAPI (blue), scale bar 60 µm. White arrow shows SATB2$^+$ cells in the intermediate zone, white lines delimit layer V. **h,** Histograms showing relative thickness of cortical layers, total thickness of the cortical plate and cell density of layer V (respectively right, middle and left panels) in E18.5 KIF2A$^{+/H321D}$Nex^{Cre} embryos. Data are represented as mean ± s.e.m., n≥3 mice per group.

i, Coronal sections of E18 embryonic cortices from *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nex*^{Cre} and control mice, after EdU staining (yellow) counterstained with DAPI (blue), scale bar 30 µm. The cortex was divided into ten equal bins. White arrows show EdU$^+$ cells accumulation in the intermediate zone. Graphical representation shows the percentage the EDU$^+$ cells in each bin. Data are represented as mean ± s.e.m., n≥3 mice per group.

Figure 5. KIF2A His321Asp variant causes p53 related cell death.

a-d, Immunofluorescence staining of Cleaved Caspase 3 (red) on embryonic cortices at E12, E13, E14 and E16 (respectively **a,b,c,d**) from *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nestin*^{Cre} and control mice, scale bars **a**-40 µm, **b**-**c**-40 µm, **d**-80 µm. Histograms show the number of Caspase 3$^+$ cells per

100µm. Data from at least 3 embryos per group are presented as mean ± s.e.m., two-tailed t-test.

e-f. Immunofluorescence staining of SOX2 (green), TBR2 (cyan) and Caspase 3 (magenta) (**e**); and TUJ1 (green) and Caspase 3 (magenta) (**f**) on E12 embryonic cortices from *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nestin*^{Cre} and control mice, scale bar 30µm and 5µm for insets.

g p53 protein levels in brainl extracts from *KIF2A* $^{+/Flex}$ and *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nestin*^{Cre} embryos a E12 detected by immunoblotting.

h,i, Cell death studies in *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nex mice*^{Cre}. Images show coronal sections of E14 (**g**) and E16 (**h**) embryonic cortices from *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nestin*^{Cre} and control mice, stained for Caspase 3 (green), TUJ1 (magenta) and counterstained with DAPI (blue), scale bar **h**-60 µm, **i**-60µm. Histograms show the number of Caspase 3^{+} cells per 100µm. Data from at least 3 embryos per group are presented as mean ± s.e.m., two-tailed t-test.

j Brains from *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nex*^{Cre} and corresponding controls at P2

Figure 6. KIF2A His321Asp variant effects on microtubule stability and dynamics

a, Depolymerization assay in fibroblasts derived from a subject bearing the KIF2A His321Asp variant and three controls. Left panel: graph represents the percentage of cells with polymerized microtubules over 20 min time after nocodazole treatment. Data are presented as mean ± s.e.m., n=3 biologically independent experiments, Two way ANOVA with Tukey's post-hoc test, *p < 0.05, ** p< 0.01, ** p< 0.001, compared to controls. Right: representative images of cells at 5 and 20 min of nocodazole treatment, after immunofluorescence staining of tubulin (grey), scale bar 20 µm.

b, Microtubule dynamics in fibroblasts derived from a subject bearing the heterozygous KIF2A p.His321Asp variant and three controls. Left panel: Representative kymographs of dynamic EB3 comets in different controls and mutant fibroblasts. Kymographs are calibrated in time (y, sec) and space (x, µm). Scale bar Y= 10 s, X = 5 µm. Right panel: Quantification of EB3 mean velocity, data are presented as mean ± s.e.m., n=4 biologically independent experiments, one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test, *p < 0.05 compared to controls.

c,Biochemical analysis of wt and p.His321Asp mutant of Kif2A.**c,** Schematic representation of domain composition of human Kif2A and its constructs used in this study. Location of the H321D mutation is shown.

d, MT depolymerization activity of wt and H321D Kif2A. Taxol-stabilized MTs (1.5 µM) were incubated with wt, H321D (0.075 µM), and no kinesin for 10 min at 25°C. Soluble tubulin

and MT polymers were separated into supernatant (S) and pellet (P) by sedimentation. Equal volume of fractions was analyzed on SDS-PAGE gel. **e,** Percentage of soluble tubulin in each depolymerization reactions was calculated by densitometry of the bands using ImageJ software.

f,View of the nucleotide binding site of Kif2A (PDB ID 2GRY). H321 residue (red, sticks) and its pi-interaction with the adenosine moiety of the nucleotide (dash line) is shown. Figure was generated with PyMOL.

Methods:

Mice generation

Knock-in KIF2A mice with conditional expression of the point mutation were generated in the Institut Clinique de la Souris (Celphedia, Phenomin, ICS, Illkirch). The KIF2A locus was engineered as follows. A 688 bp wild type mouse genomic fragment comprising exon 10 and surrounding intronic sequences was PCR amplified and subcloned between LoxP and Lox511 sites in an ICS proprietary vector. The basic vector already contains all lox sites in the correct orientation as well as a NeoR cassette surrounded by FRT sites. In a second cloning step, a 529 bps synthetic fragment (String DNA fragment ordered from GeneArt) comprising the degenerated human exon 10 and surrounding human intronic sequences was cloned in an inversed orientation. Both 5' (4.3 kb) and 3' (3.2 kb) homology arms were cloned successively. The final construct was linearized and electroporated in proprietary derived C57Bl/6N ES cells. Positive clones were selected by Long-Range PCR and further validated by Southern blot using both a Neo probe and a 3' external probe. The fully validated ES cell clone 28 which did not show any abnormalities by ddPCR and karyotype spreading was microinjected in BALB/cN blastocysts, chimeras were obtained and germline transmission of the recombinant allele was achieved in a C57BL/6N pure genetic background. Mice were handled according to national and international guidelines (authorization number 2017022316297963, French MESR) and the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible

committee on mouse experimentation (Comité d'éthique pour l'expérimentation animale (Strasbourg, France)).

KIF2A$^{Flex/Flex}$ mice were crossed with Rosa26Deleter-Cre$^{+/-}$ (Soriano et al., 1999) to express ubiquitously the KIF2A mutation. KIF2A$^{+/Flex}$ mice were crossed with Nestin-Cre$^{+/-}$ (Graus-Porta et al., 2001; Tronche et al., 1999) to express KIF2A mutation specifically in neuronal progenitors. KIF2A$^{+/Flex}$ mice were crossed with Nex-Cre$^{+/-}$ mice (Goebbels et al., 2006) to express KIF2A mutation only in post-mitotic neuronal cells. For staging of embryos, the day of vaginal plug was considered as E0.5 and embryos used for comparative analyses are littermates.

Genotyping

To verify the correct recombination and excision step of the KIF2A FLEx II construction we have performed PCR on tail fragment with FastStart PCR Master (Roche) and the following primers: Lf: 5'CAGGAAGGGCCCAGTTGTCTATTATACC3'; Mr: 5'CCCTTGCTTTGGGATTATACAAATGCC3'; Mf: 5'CGTGTGTTTGTGAATGTAGAGGCCAGTC3'; Lxr: 5'CGGGGATCCTCTAGAGCTTATAACTTCG3'; Er: 5'GCTCCCTATAGAGATGTCCTTCTCGAAG3'; Ef: 5'GCTCGAAGATGGTCTCGACCAACG3'. The position of the different primers used are represented in Supplementary Figure 1 d.

To determine the genotype, the presence or absence and size of PCR fragments were analyzed to detect: the presence of exon 10 (Lf/Mr); the presence of distal LoxP (Lf/Mr), LoxP specific PCR (Mf/Lxr), the presence of distal Lox511 (Mf/Er) and the excision of the floxed exon (Lf/Ef). The presence of the point mutation was confirmed by Sanger sequencing on the first F1 animals. For each crosses with different types of Cre, the presence or absence of the Cre was genotyped by a qPCR with internal primers at Cre recombinase (82bp): Forward 5'CGCAAGAACCTGATGGACATG3', Reverse: 5' ACCGGCAAACGGACAGAA3'.The PCR cycling conditions were 1 cycle at 95°C for 4 min, 34 cycles at 94°C for 30 sec, 62°C for 30

sec, 72°C during 1 min, 1 cycle at 72°C for 7min and 1 cycle at 20°C for 5min. After PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis.

RT-qPCR

Brain cortices of 10 weeks old mice were grinded using Precellys Lysing Kit (Bertin Technologies) and total RNA were extracted using TRI Reagent (Molecular Research center, Inc.) following manufacturer's instructions. The purity and the quality of RNA were confirmed by defining the ratio of absorbance at 260 and 280 nm wavelengths (NanoDrop® ND1000, ThermoScientific) cDNA samples were synthetized with Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) and following the manufacturer's instructions. qRT-PCR was performed in a LightCycler PCR instrument (Roche) using SYBR Green Master Mix (Qiagen) and the following primers for full KIF2A exon 9-11: 5'-ccttcgatgactcagctcct-3'(Forward) and 5'-agtggaaaggtgtttgacttact-3' (Reverse); KIF2A exon 10 5'-aatatttgaaaggggccatgg-3' (Forward) and 5'-gcagactggaagtgggaaaa-3' (Reverse); Reaction conditions were carried out for 50 cycles (10 min initial denaturation 95°C, 15s at 95°C, 20s at 59° and 25s at 72°C), each qRT-PCR reaction was performed in triplicates and relative mRNA expression of KIF2A was normalized to Actin mRNA expression for the mouse model and to RPLPO for ES cells. The relative transcript expression of mRNA levels was calculated by the Ct method and the area of the peak for KIF2A exon 9-11 primers. The correct rearrangement of the construction was verified by PCR on cDNA samples using Taq DNA Polymerase (Roche) using the same primers as those used for qPCR. PCR products were sent to GATC biotech for Sanger sequencing.

Western blotting

Brain cortices were grinded using Precellys Lysing Kit (Bertin Technologies) and lysed in RIPA buffer (Tris HCl 1M, pH 7,7; NaCl 5M; EDTA 0.5M; Triton X-100) supplemented with protease inhibitors (Roche) and phosphatase inhibitors (Sigma Aldrich). Protein concentration was measured with Bio-Rad protein assay reagent (Biorad Laboratories,CA). Samples were denatured at 95°C for 10 minutes in loading buffer then resolved in SDS-PAGE and transferred

onto nitrocellulose membrane. Membranes were blocked in 5% nonfat milk in TBS buffer; 0.1% Tween and then immunoblotted using anti-KIF2A (Ab37005, rabbit, Abcam, 1:10000) or Anti-p53 (ab26, mouse, 1:1000, abcam) and anti-beta actin coupled HRP (A3854, Sigma-Aldrich, 1:50000) antibodies.

KIF2A$^{+/Flex}$ ES cells generation and validation

In order to generate KIF2A$^{+/H321D}$ ES cell clone, KIF2A$^{+/Flex}$ ES cell clone was incubated with HTN-Cre (6µM; Excellgen Ref EG-1001). RT-qPCR was performed as previously described in the "RT-qPCR" part and the correct rearrangement of the construction was verified as previously with Sanger sequencing. For immunofluorescence, ES cells were plated on glass coverslips, fixed with 4% paraformaldehyde solution for 20 minutes. Coverslips were then blocked by a 30 minutes incubation with 0.3% Triton-X100 and 2% newborn calf serum in PBS. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C. Slides were then incubated with the corresponding Alexa Fluor conjugated secondary antibodies (Life Technologies) in a 1/500 dilution in 1X PBS for 30 minutes at room temperature. Slides were mounted with a DAPI containing fluoromount-G mounting medium (Interchim). Images were acquired using TCS SP8 confocal microscope (Leica Microsystems).

Neuroanatomical study

Neuroanatomical study was carried out using 6 male mice at precisely 16-week old (n=3 per group). Mice were euthanized in a CO2 chamber and brains were dissected and fixed in 4% buffered formalin for 48 hours, then transferred to 70% ethanol.

Samples were embedded in paraffin using an automated embedding machine (Sakura Tissue-Tek VIP) and cut at a thickness of 5µm with a microtome in order to obtain sagittal brain region at Lateral + 0.60mm. The sections were then stained with 0.1% Luxol Fast Blue (Solvent Blue 38; Sigma-Aldrich) and 0.1% Cresyl violet acetate (Sigma-Aldrich) and scanned using Nano-zommer 2.0HT, C9600 series at 20x resolution. 166 brain parameters, made of area and length measurements as well as cell level features, were taken blind to the genotype across one

sagittal section. Data were analyzed using a two-tailed Student t-test assuming equal variance to determine whether a brain region is associated with neuroanatomical defect or not.

Behavioral tests

Rotarod test: This test measures the ability of an animal to maintain balance on a rotating rod (Bioseb, Chaville, France). Mice were given three testing trials during which the rotation speed accelerated from 4 to 40 rpm in 5 min. Trials were separated by 5-10 min interval. The average latency was used as index of motor coordination performance.

Grip test: This test measures the maximal muscle strength (g) using an isometric dynamometer connected to a grid (Bioseb). Mice were allowed to grip the grid with all its paws, then they were pulled backwards until they released it. Each mouse was submitted to 3 consecutive trials immediately after the modified SHIRPA procedure. The maximal strength developed by the mouse before releasing the grid was recorded and the average value of the three trials adjusted to body weight.

Crenelated beam: This tests allows gait analysis which is relatively specific for evaluation of proprioceptive sensitivity. The performance in this test depends also on the integrity of motor coordination and vestibular function. Animals require an accurate paw placement to succeed in this test. The apparatus is a 1.7 cm wide and 63 cm long crenelated wooden beam, elevated 18 cm above the bench surface. Crenels are 2 cm long and 2 cm deep. The two extremities of the beam are not crenelated and used as starting and goal points during testing. A home cage is placed at the goal point to allow mice being motivated to perform the task. Animals were submitted to 3 testing trials during which they were placed at the starting extremity and allowed to walk the beam distance. The latency to cross the beam and the number of hind paws fails (when one or both hind paws misses the merlon and slip in the crenellated parts of the beam) were measured.

Object recognition task: Mice were tested in automated open fields (Panlab, Barcelona, Spain), each virtually divided into central and peripheral regions. The open-fields were placed in a room homogeneously illuminated at 70 Lux at the level of each open field. The objects to be discriminated were a glass marble (2,5 cm diameter) and a plastic dice (2 cm). Animals were first habituated to the open-field for 30 min. Each mouse was placed in the periphery of the open field and allowed to explore freely the apparatus for 30 min. The distance traveled, the number of rears, and time spent in the central and peripheral regions were recorded over the test session. The number of entries and the percentage of time spent in center area are used as index of emotionality/anxiety. The next day, mice were tested for object recognition in the same openfield arenas under 70 Lux illumination. They were submitted to a 10-minutes acquisition trial during which they were placed in the open-field in presence of a sample objects (A and A') (2.5 cm diameter marble or 2 cm edge plastic dice). The time the animal took to explore the samples (when the animal's snout was directed towards the object) was manually recorded. A 10-minutes retention trial was performed 3 h later. During this trial, one of the samples A and another object B were placed in the open-field, and the times tA and tB the animal takes to explore the two objects were recorded. A recognition index (RI) is defined as (tB / (tA + tB)) x100.

Y-maze spontaneous alternation: The apparatus is a Y-maze made of Plexiglas and has 3 identical arms (40x9x16 cm) placed at 120° from each other. Each arm has walls with specific motifs allowing distinguish it from the others. Each mouse was placed at the end of one arm, the head directed to the walls and allowed to explore freely the apparatus for 5min, with the experimenter out of the animal's sight. The percentage of spontaneous alternations was used as index of working memory performance. The number of arms visited and the latency to exit the starting arm were also scored as an index of ambulatory activity and emotionality in the Y-maze, respectively.

Immunohistochemistry

Adult mice were anaesthetized with a mix of Ketamine (130 mg/kg), Xylazine (13 mg/kg) and NaCl 0.9% then perfused intracardially with paraformaldehyde 4% in 0.1M phosphate buffer using a peristaltic pump. Brains were dissected and post-fixed in paraformaldehyde 4% in 0.1M phosphate buffer overnight at 4°C. Embryo or pup brains were dissected and fixed in paraformaldehyde 4% in 0.1M phosphate buffer overnight at 4°C. Brains were placed in a solution of 4% low-melting agarose (Bio-Rad) and cut into coronal sections (80µm) using a vibrating-blade microtome (Leica VT1000S, Leica microsystems). Sections were blocked in PBS with 0.3% Triton-X100 and 2% of newborn calf serum (Life Technologies) at room temperature for 1 h. All primary antibodies were incubated overnight at 4°C in PBS with 0.3% Triton-X100 and 2% of newborn calf serum. After washing in 1X PBS, sections were incubated with corresponding Alexa Fluor conjugated secondary antibodies in a 1:500 dilution in 1X PBS for 1h30 at room temperature. After washing in 1X PBS, sections were incubated with Hoechst 33342 trihydrochloride trihydrate (Life Technologies) in a 1:2000 dilution for 30 minutes at room temperature. After washing sections were mounted with Fluoromount-G mounting medium (Interchim). Microscopy was performed on a TCS SP8 confocal microscope (Leica Microsystems) and image stitching was made by the LAS X core software (Leica Microsystems). Image analyses were achieved using ImageJ software (NIH) and images were assembled with Adobe Illustrator CS6 16.0.5 (Adobe Systems). All experiments are carried on littermate mice and all analyzed brain slices are selected with brain atlas to be comparable.

Antibodies

The following antibodies were used for immunohistochemistry: anti-phospho Histone H3 (06–570, rabbit, 1: 500, Millipore), anti-Tbr2 (14–4875-80, rat, 1: 200, eBiosciences), anti-Pax6 (PRB- 278P, rabbit, 1: 200, Covance), anti-Kif2a (ab37005, rabbit, 1: 6000, abcam), anti-NeuN (MAB377, mouse, 1: 100, Millipore),anti-Ctip2 (ab18465, rat, 1:500, abcam), anti-Tbr1 (ab31940, rabbit, 1:500, abcam), anti-Tbr1 (Ab183032, rabbit, 1:1000, abcam), anti-Satb2 (ab51502,mouse, 1:400, abcam), anti-nestin (ab6142, mouse, 1:500, abcam), anti-Tuj1 (MMS-

435p,mouse,1:500, Eurogentec), anti-Sox-2 (sc-365823, mouse, 1:200, Santa Cruz Biotechnology), anti-cleaved caspase 3 (AF835, rabbit, 1:500, R&D System), anti-V5 (R96025, mouse, 1:500, Invitrogen), anti-RFP (5F8, rat, 1:1000, Cromotech), Anti Arl13B (17711-1-AP, rabbit, 1:500, ProteinTech), Anti-tubulin [YL1/2] (ab6160,rat, 1:1000,abcam), anti-GFP (ThermoFisher, chicken, A10262), Anti-p53 (ab26, mouse, 1:1000, abcam).

EDU

For neuronal positioning experiments, E14.5 pregnant mice were intraperitoneally injected with EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine solution, Invitrogen) diluted in NaCl 0.9% at the dose of 40mg EdU/kg of body weight and embryos were harvested and fixed at E18.5. EdU staining was done using Click-iT EdU Alexa Fluor 647 Imaging Kit (Invitrogen) according to manufacturer's protocol.

DNA constructs

Commercially available Human untagged KIF2A cDNA (NM_004520) cloned in pCMV6-XL5 vector (SC117315) were purchased from Origene. Variants p.His321Asp was introduced by site directed mutagenesis using QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). pDEST40-Arl13b11 expressing V5 tagged Arl13b was purchased from Addgene (#40873). BLBP-GFP plasmid was kindly provided by N. Heintz (The Rockefeller University, NY, USA). NeuroD-GFP vector, kindly provided by J. Godin (IGBMC, Strasbourg, France), pSilencer-CAG-Venus-2 vectors, kindly provided by J. Courchet (Institut NeuroMyoGene, Lyon). All plasmid DNAs were prepared using the EndoFree plasmid purification kit (Macherey Nagel).

In utero electroporation

In utero electroporation was performed as described previously (33) using timed pregnant mice at E14.5. Animal experimentations were performed at the IGBMC animal facilities. The study was conducted according to national and international guidelines (authorization number 2017062811273521, French MESR) and the procedures followed were in

accordance with the ethical standards of the responsible committee on mouse experimentation (Comité d'éthique pour l'expérimentation animale (Strasbourg, France)). At E14.5 the pregnant mice were anaesthetized with isolflurane (2 l/min of oxygen, 3% isoflurane during induction and 2.5% during surgery). The uterine horns were exposed, and a lateral ventricle of each embryo was injected using pulled glass capillaries (Harvard Apparatus) with Fast Green (2 µg/ml; Sigma) combined with the DNA constructs prepared with EndoFree plasmid purification kit (Macherey Nagel) and a reporter vector at 1 µg/µl each. Plasmids were further electroporated into the neuronal progenitors adjacent to the ventricle by delivering five electric pulses at 35 V for 50 ms at 950-ms intervals using a CUY21EDIT electroporator (Sonidel). After electroporation, embryos were placed back in the abdominal cavity and development was allowed to continue until E15 or E18. Embryo brains were dissected and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS (Prosphate buffered saline) overnight and then sectioned at 80 µm slices using a VT1000S vibratome (Leica biosystems).

EEG

Implantation of electrodes was done under general anesthesia (Propofol, Fentanyl, Domitor mixture 100µL/10g). $KIF2A^{+/H321D}$ (n=3) and $KIF2A^{+/Flex}$ wild-type littermate mice (n=3) aged postnatal 12 weeks were implanted with stainless steel wire electrodes (Phymep, France). For each mouse, five single-contact electrodes were placed over the left and right frontoparietal cortex. The electrodes were secured into the skull and soldered to a micro-connector that was fixed to the skull by acrylic cement. An electrode over the surface of the cerebellum served as ground for all derivations. All mice were allowed to recover for a period of 1 week before EEG recordings. Freely moving mice were then recorded in their housing transparent cage and were connected to a recording system. EEG signals were amplified with a band-pass filter setting of 0.1-70 Hz with a 64-channel system (Coherence, Natus) and sampled at 256 Hz. Recordings were performed during 1 hour for evidence of spontaneous convulsive seizure. At the end of the recording period, animals were injected intraperitoneally with a convulsive dose of 10mg/kg of pentylenetetrazole (PTZ; Sigma-Aldrich, Co), a $GABA_A$ receptor antagonist, to evaluate

seizure threshold. EEG was recorded during 30min after PTZ. Video-EEGs were reviewed offline for electrographic seizures.

Cell culture

HeLa Tubulin GFP kindly provided by Patrick Schultz were cultured in DMEM (Gibco) supplemented with 1 g Lˆ-1 of glucose, 5% foetal calf serum and gentamycine (DMEM-1 g Lˆ-1 glucose-5% FCS-gentamycine). Subject's human fibroblast were culture in DMEM (Gibco) supplemented with 1 g Lˆ-1 of glucose, 10% foetal calf serum and gentamycine (DMEM-1 g Lˆ-1 glucose-10% FCS-gentamycine). All cell lines were grown at 37°C in 5% CO2.

EB3 Tracking analyses

Patient's fibroblasts were cultured in fluorodish™ FD35-100 (World Precision Instruments) and transfected with EB3-GFP plasmid using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) following manufacturer instructions. Live video-microscopy recording was performed using a Confocal Spinning disk - NikonTi - Roper iLas FRAP system equipped with a PLAN APO VC 60x objective (Nikon Instrument, Inc., Melville, USA) and driven by Metamorph 7.0 (Molecular Devices, LLC). Samples were maintained at 37°C and 5% CO2 during acquisition. Images were collected with Photometrics Prime 95B™ Scientific CMOS Camera (PHOTOMETRICS) every 200ms during 2 minutes. Movie assembly and time projections were done using ImageJ software (http://rsb.info. nih.gov/ij/, NIH). For generation and analyses of kymographs Image J plug-in kymotoolbox (Available on demand on http://www.bic.u-bordeaux.fr) was used. Kymographs were calibrated in time (y in sec) and space (x in µm) and analyses were performed manually by following EB3 comet trajectories. Mean speed was extracted by the plug-in.

Microtubule depolymerization kinetics

For microtubule depolymerization kinetics, fibroblasts were grown on glass coverslips. At t=0 medium was replaced with pre-warmed medium containing 10 µM of Nocodazole (Sigma-

Aldrich, Co). Cells were then maintained at 37°C. At the indicated time points (0, 5, 10, 15 and 20min) cells were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1M PBS for 20 minutes at room temperature. Cells were then blocked in 5% donkey serum in PBS-0.3% Triton-X and then incubated for 1 h with the primary antibody. Alexa-coupled secondary antibody (Thermo Fischer) was used at 1/500. Coverslips were mounted with Fluoromount-G mounting medium with DAPI (Interchim). Images were acquired using a confocal microscope TCS SP8 X (Leica microsystems) and analyzed using ImageJ software (NIH).

Timelapse microtubule depolymerisation

HeLa Tubulin GFP were cultured in fluorodish™ FD35-100 (World Precision Instruments) and transfected with pCMV6 empty, pCMV6 KIF2A WT or pCMV6 KIF2A p.his321Asp plasmids using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) following manufacturer instructions. Live video-microscopy recording was performed 24 hours after transfection using a Confocal Spinning disk Inverted Leica DMI8 system equipped with a HC PL APO 100x objective (Leica Biosystems) and driven by Metamorph 7.0 (Molecular Devices, LLC). At t=0 medium was removed and replaced with fresh medium with 10 µM of Nocodazole (Sigma-Aldrich, Co). Samples were maintained at 37°C and 5% CO2 during acquisition. Images were collected with Orca Flash 4.0 (Hamamatsu) every 10 s during 30 minutes. Movie assembly was done using ImageJ software (http://rsb.info. nih.gov/ij/, NIH).

Time-lapse videomicroscopy

Time-lapse videomicroscopy of migrating neurons was performed as described previously (34). At E16.5, embryo brains electroporated two days earlier, were dissected, embedded in 3% low-melt agarose (BioRad) diluted in HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, ThermoFisher Scientific) and sliced (300 µm) with a vibratome (Leica VT1000S, Leica Microsystems). Brain slices were cultured 16 to 24 h in semi-dry conditions (Millicell inserts, Merck Millipore), in a humidified incubator at 37 C in a 5% CO2 atmosphere in wells containing Neurobasal medium supplemented with 2% B27, 1% N2, and 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Life Technologies). Slice cultures were placed in a humidified

and thermoregulated chamber maintained at 37 °C on the stage of an inverted confocal microscope. Time-lapse imaging was performed with a Leica SP8 X scanning confocal microscope equipped with a 25X objective. 40-50 successive 'z' optical planes were acquired every 1.5 µm and every 30 min during 10 h. Sequences were analyzed using Image J and the 'Manual Tracking' Plugin.

Protein expression and purification

The wild type human Kif2A protein construct containing the neck and the motor domain (Kif2A-NM; residues 153-553) was expressed and purified as described previously (Trofimova 2018, Nat. Comm). Kif2A p.His321Asp mutation (residues 153-553) were introduced by site directed mutagenesis using QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) and primers 5'-gtcaccacccatagtatcagtttttccacttccag-3' and 5'-ctggaagtggaaaaactgatactatgggtggtgac-3' and was cloned into the pET28a vector to incorporate a C-terminal 6xHis tag. The plasmid was transformed into BL21 (DE3) Rosetta®(DE3) E. coli cells (Novagene) and recombinant protein expression was induced by addition of 0.5 mM IPTG to the LB culture media, in which cells were grown at 16°C overnight. Cells were lysed in buffer A (20 mM Potassium phosphate, pH 7.2, 300 mM NaCl, 1 mM MgCl2, 1 mM EGTA, 5 mM β-mercaptoethanol) supplemented with 0.2 mg/ml Lysozyme, 0.2 mM ATP and protease inhibitors (Roche) for 30 min on ice and then sonicated. The lysate was centrifuged and the supernatant fraction was loaded on pre-equilibrated Ni-NTA resin (Qiagen) for affinity-based protein purification. Unbounded proteins were washed away with buffer A supplemented with 20 mM imidazole. Kif2A H321D protein was eluted with an increasing linear gradient of buffer B (buffer A supplemented with 300 mM imidazole) and eluted fractions containing Kif2A H321D protein were pooled and dialyzed against HEPES buffer (20 mM HEPES, 1 mM MgCl2, 150 mM NaCl, 0.2 mM ATP, 1 mM DTT, pH 7.2). Proper folding of the Kif2A H321D mutant protein was confirmed by Circular Dichroism using a Chirascan CD spectrometer (Applied Photophysics Ltd). No significant changes in secondary structure were observed in comparison to wild type Kif2A (**Fig S9 c**). The Kif2A H321D mutant

protein solution was concentrated to 1 mg/ml using an Amicon® Ultra-4 filter (Millipore) and then flash-frozen in liquid N2.

Tubulin was isolated from bovine brain and purified by two cycles of polymerization-depolymerization in a high-molarity PIPES buffer as described by Castoldi (35). Purified tubulin was flash-frozen in liquid N2 and stored at -80°C until use.

MT depolymerization assay

MT preparation and sedimentation-based MT depolymerization assays are essentially the same as described previously(19). Briefly, 0.75 µM of Kif2A wt or Kif2A H321D were mixed with 20 µM taxol-stabilized MT in BRB80-based depolymerization buffer (80 mM PIPES pH 6.8, 1 mM MgCl2, 1 mM EGTA, 20 µM taxol, 75 mM KCl, 1 mM DTT, 0.02% Tween), supplemented with 1 mM ATP. Reactions were incubated at room temperature for 10 min. Free tubulin in solution was separated from remaining MTs pellet by centrifugation at 120000 g for 10 min at 25°C. The supernatant fraction was retrieved from the sedimentation mixture and added to 1/2 volume of 2×SDS loading buffer (Laemmli buffer). The remaining pellet was resuspended in equal volume of BRB80-based buffer and incubated on ice for 10 min, vortexed, and then mixed with equal volume of 2×SDS loading buffer. Equal portions of the supernatant and pellet samples were resolved on 10% SDS-PAGE. The gel was stained with Coomassie blue for comparison of tubulin quantities. ImageJ software was used for quantification of intensity of the tubulin bands.

Statistics

All experiments were done in at least three independent replicates and analysis were performed blinded to genotype or condition. All statistics were calculated with GraphPad Prism 6. Data are presented as mean±sem. The experimental n, the test used and the statistical significance is indicated in the figure legends. Time-lapse recordings were performed in a minimum of 3 electroporated embryos per group. All histological quantifications were performed on 3 brain sections per brain of at least 3 different animals per condition. For

morphometric analysis of the mice, a minimum of 3 animals were studied and analyzed in a single specific brain section. Experiments performed in HeLa tubulin GFP cells were done independently repeated at least 3 times. For EB3 comets, in each experiment 10 cells were analyzed and in each cell 15-30 comets were quantified. For depolymerization, around 100 cells were analyzed per condition in three independent experiments. For behavioral analysis, 10 WT male mice and 8 mutant mice were used. The behavioral data were analyzed using unpaired Student t-test or repeated measures analysis of variance (ANOVA) with one between factor (genotype) and one within factor (time). A one group t-test was also used to compare the object recognition index of each group to the chance level, and paired t-test was used to compare the duration of exploration between the novel and familiar objects for each group during the retention trial. Qualitative parameters (e.g. clinical observations) were analyzed using $\chi 2$ test. The level of significance was set at $p < 0.05$. 3 mice of each genotype were used for EEG recordings and challenged with PTZ.

References:

1. Poirier,K., Lebrun,N., Broix,L., Tian,G., Saillour,Y., Boscheron,C., Parrini,E., Valence,S., Saint Pierre,B., Oger,M., *et al.* (2013) Mutations in TUBG1, DYNC1H1, KIF5C and KIF2A cause malformations of cortical development and microcephaly. *Nat. Publ. Gr.*, **45**, 639–647.

2. Cavallin,M., Bijlsma,E.K., El Morjani,A., Moutton,S., Peeters,E.A.J., Maillard,C., Pedespan,J.M., Guerrot,A.-M., Drouin-Garaud,V., Coubes,C., *et al.* (2016) Recurrent KIF2A mutations are responsible for classic lissencephaly. *Neurogenetics*, 10.1007/s10048-016-0499-8.

3. Tian,G., Cristancho,A.G., Dubbs,H.A., Liu,G.T., Cowan,N.J. and Goldberg,E.M. (2016) A patient with lissencephaly, developmental delay, and infantile spasms, due to de novo heterozygous mutation of *KIF2A*. *Mol. Genet. Genomic Med.*, **4**, 599–603.

4. Desai,A., Verma,S., Mitchison,T.J. and Walczak,C.E. (1999) Kin I Kinesins Are Microtubule-Destabilizing Enzymes. *Cell*, **96**, 69–78.

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

6. Broix,L., Asselin,L., Silva,C.G., Ivanova,E.L., Tilly,P., Gilet,J.G., Lebrun,N., Jagline,H., Muraca,G., Saillour,Y., *et al.* (2017) Ciliogenesis and cell cycle alterations contribute to KIF2A-related malformations of cortical development. *Hum. Mol. Genet.*, **27**, 224–238.

7. Schnütgen,F., Doerflinger,N., Calléja,C., Wendling,O., Chambon,P. and Ghyselinck,N.B. (2003) A directional strategy for monitoring Cre-mediated recombination at the cellular level in the mouse. *Nat. Biotechnol.*, **21**, 562–565.

8. Friedrich,G. and Soriano,P. (1991) Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev.*, **5**, 1513–1523.

9. Dubois,N.C., Hofmann,D., Kaloulis,K., Bishop,J.M. and Trumpp,A. (2006) Nestin-Cre transgenic mouse line Nes-Cre1 mediates highly efficient Cre/loxP mediated recombination in the nervous system, kidney, and somite-derived tissues. *genesis*, **44**, 355–360.

10. Goebbels,S., Bormuth,I., Bode,U., Hermanson,O., Schwab,M.H. and Nave,K.-A. (2006) Genetic targeting of principal neurons in neocortex and hippocampus of NEX-Cre mice. *genesis*, **44**, 611–621.

11. Collins,S.C., Wagner,C., Gagliardi,L., Kretz,P.F., Fischer,M.-C., Kessler,P., Kannan,M. and Yalcin,B. (2018) A Method for Parasagittal Sectioning for Neuroanatomical Quantification of Brain Structures in the Adult Mouse. *Curr. Protoc. Mouse Biol.*, **8**, e48.

12. Sukoff Rizzo,S.J. and Crawley,J.N. (2017) Behavioral Phenotyping Assays for Genetic Mouse Models of Neurodevelopmental, Neurodegenerative, and Psychiatric Disorders. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, **5**, 371–389.

13. Loscher,W. (2011) Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*, **20**, 359–368.

14. Kitazawa,A., Kubo,K., Hayashi,K., Matsunaga,Y., Ishii,K. and Nakajima,K. (2014) Hippocampal pyramidal neurons switch from a multipolar migration mode to a novel "climbing" migration mode during development. *J. Neurosci.*, **34**, 1115–26.

15. Docampo-Seara,A., Santos-Durán,G.N., Candal,E. and Rodríguez Díaz,M.Á. (2019) Expression of radial glial markers (GFAP, BLBP and GS) during telencephalic development in the catshark (Scyliorhinus canicula). *Brain Struct. Funct.*, **224**, 33–56.

16. Sawicka,A. and Seiser,C. (2012) Histone H3 phosphorylation – A versatile chromatin modification for different occasions. *Biochimie*, **94**, 2193–2201.

17. Maney,T., Wagenbach,M. and Wordeman,L. (2001) Molecular Dissection of the Microtubule Depolymerizing Activity of Mitotic Centromere-associated Kinesin. *J. Biol. Chem.*, **276**, 34753–34758.

18. Hertzer,K.M., Ems-McClung,S.C., Kline-Smith,S.L., Lipkin,T.G., Gilbert,S.P. and Walczak,C.E. (2006) Full-length dimeric MCAK is a more efficient microtubule depolymerase than minimal domain monomeric MCAK. *Mol. Biol. Cell*, **17**, 700–10.

19. Trofimova,D., Paydar,M., Zara,A., Talje,L., Kwok,B.H. and Allingham,J.S. (2018) Ternary complex of Kif2A-bound tandem tubulin heterodimers represents a kinesin-13-mediated microtubule depolymerization reaction intermediate. *Nat. Commun.*, **9**, 2628.

20. Verma,V., Paul,A., Amrapali Vishwanath,A., Vaidya,B. and Clement,J.P. (2019) Understanding intellectual disability and autism spectrum disorders from common mouse models: synapses to behaviour. *Open Biol.*, **9**, 180265.

21. Ohshima,T., Hirasawa,M., Tabata,H., Mutoh,T., Adachi,T., Suzuki,H., Saruta,K., Iwasato,T., Itohara,S., Hashimoto,M., *et al.* (2007) Cdk5 is required for multipolar-to-bipolar transition during radial neuronal migration and proper dendrite development of

pyramidal neurons in the cerebral cortex. *Development*, **134**, 2273–2282.

22. Falnikar,A., Tole,S., Liu,M., Liu,J.S. and Baas,P.W. (2013) Polarity in Migrating Neurons Is Related to a Mechanism Analogous to Cytokinesis. *Curr. Biol.*, **23**, 1215–1220.

23. Ogawa,T., Saijo,S., Shimizu,N., Jiang,X. and Hirokawa,N. (2017) Mechanism of Catalytic Microtubule Depolymerization via KIF2-Tubulin Transitional Conformation. *Cell Rep.*, **20**, 2626–2638.

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

25. Cooper,J.A. (2014) Molecules and mechanisms that regulate multipolar migration in the intermediate zone. *Front. Cell. Neurosci.*, **8**, 386.

26. WANG,K., LIN,C., WANG,C., SHAO,Q., GAO,W., SONG,B., WANG,L., SONG,X., QU,X. and WEI,F. (2014) Silencing Kif2a induces apoptosis in squamous cell carcinoma of the oral tongue through inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway. *Mol. Med. Rep.*, **9**, 273–278.

27. Zhang,Y., You,X., Liu,H., Xu,M., Dang,Q., Yang,L., Huang,J. and Shi,W. (2017) High KIF2A expression predicts unfavorable prognosis in diffuse large B cell lymphoma. *Ann. Hematol.*, **96**, 1485–1491.

28. Lizarraga,S.B., Margossian,S.P., Harris,M.H., Campagna,D.R., Han,A.P., Blevins,S., Mudbhary,R., Barker,J.E., Walsh,C.A. and Fleming,M.D. (2010) Cdk5rap2 regulates centrosome function and chromosome segregation in neuronal progenitors. *Development*, **137**, 1907–1917.

29. Marthiens,V., Rujano,M.A., Pennetier,C., Tessier,S., Paul-Gilloteaux,P. and Basto,R. (2013) Centrosome amplification causes microcephaly. *Nat. Cell Biol.*, **15**, 731–740.

30. Asenjo,A.B., Chatterjee,C., Tan,D., DePaoli,V., Rice,W.J., Diaz-Avalos,R., Silvestry,M.

and Sosa,H. (2013) Structural Model for Tubulin Recognition and Deformation by Kinesin-13 Microtubule Depolymerases. *Cell Rep.*, **3**, 759–768.

31. Obeng,E.A., Chappell,R.J., Seiler,M., Chen,M.C., Campagna,D.R., Schmidt,P.J., Schneider,R.K., Lord,A.M., Wang,L., Gambe,R.G., *et al.* (2016) Physiologic Expression of Sf3b1(K700E) Causes Impaired Erythropoiesis, Aberrant Splicing, and Sensitivity to Therapeutic Spliceosome Modulation. *Cancer Cell*, **30**, 404–417.

32. Capulli,M., Costantini,R., Sonntag,S., Maurizi,A., Paganini,C., Monti,L., Forlino,A., Shmerling,D., Teti,A. and Rossi,A. (2019) Testing the Cre-mediated genetic switch for the generation of conditional knock-in mice. *PLoS One*, **14**, e0213660.

33. Tabata,H. and Nakajima,K. (2001) Efficient in utero gene transfer system to the developing mouse brain using electroporation: Visualization of neuronal migration in the developing cortex. *Neuroscience*, **103**, 865–872.

34. Tielens,S., Godin,J.D. and Nguyen,L. (2016) Real-time Recordings of Migrating Cortical Neurons from GFP and Cre Recombinase Expressing Mice. *Curr. Protoc. Neurosci.*, **74**, 3.29.1-23.

35. Castoldi,M. and Popov,A. V. (2003) Purification of brain tubulin through two cycles of polymerization–depolymerization in a high-molarity buffer. *Protein Expr. Purif.*, **32**, 83–88.

Figure 1

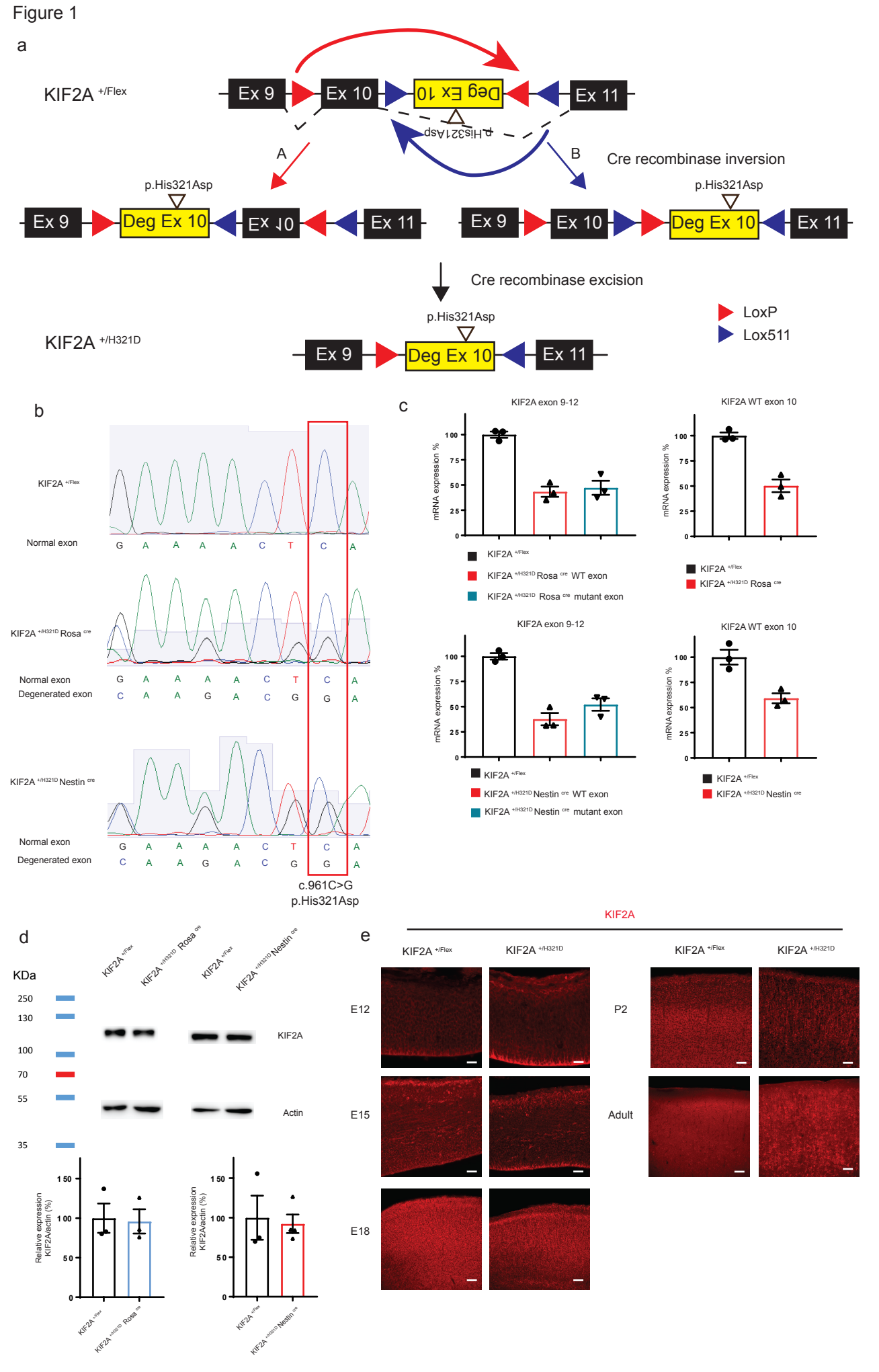

a
KIF2A +/Flex
Ex 9
Ex 10
Deg Ex 10
Ex 11
p.His321Asp
A
B
Cre recombinase inversion
p.His321Asp
Ex 9
Deg Ex 10
Ex 10
Ex 11
Ex 9
Ex 10
Deg Ex 10
Ex 11
Cre recombinase excision
KIF2A +/H321D
p.His321Asp
Ex 9
Deg Ex 10
Ex 11
LoxP
Lox511
b
KIF2A +/Flex
Normal exon
G A A A A C T C A
KIF2A +/H321D Rosa cre
Normal exon
Degenerated exon
G A A A A C T C A
C A A G A C G G A
KIF2A +/H321D Nestin cre
Normal exon
Degenerated exon
G A A A A C T C A
C A A G A C G G A
c.961C>G
p.His321Asp
c
KIF2A exon 9-12
mRNA expression %
100
75
50
25
0
KIF2A +/Flex
KIF2A +/H321D Rosa cre WT exon
KIF2A +/H321D Rosa cre mutant exon
KIF2A WT exon 10
mRNA expression %
KIF2A +/Flex
KIF2A +/H321D Rosa cre
KIF2A exon 9-12
mRNA expression %
KIF2A +/Flex
KIF2A +/H321D Nestin cre WT exon
KIF2A +/H321D Nestin cre mutant exon
KIF2A WT exon 10
mRNA expression %
KIF2A +/Flex
KIF2A +/H321D Nestin cre
d
KDa
KIF2A +/Flex
KIF2A +/H321D Rosa cre
KIF2A +/Flex
KIF2A +/H321D Nestin cre
250
130
100
70
55
35
KIF2A
Actin
Relative expression KIF2A/actin (%)
150
100
50
0
KIF2A +/Flex
KIF2A +/H321D Rosa cre
Relative expression KIF2A/actin (%)
150
100
50
0
KIF2A +/Flex
KIF2A +/H321D Nestin cre
e
KIF2A
KIF2A +/Flex
KIF2A +/H321D
KIF2A +/Flex
KIF2A +/H321D
E12
P2
E15
Adult
E18

Figure 2

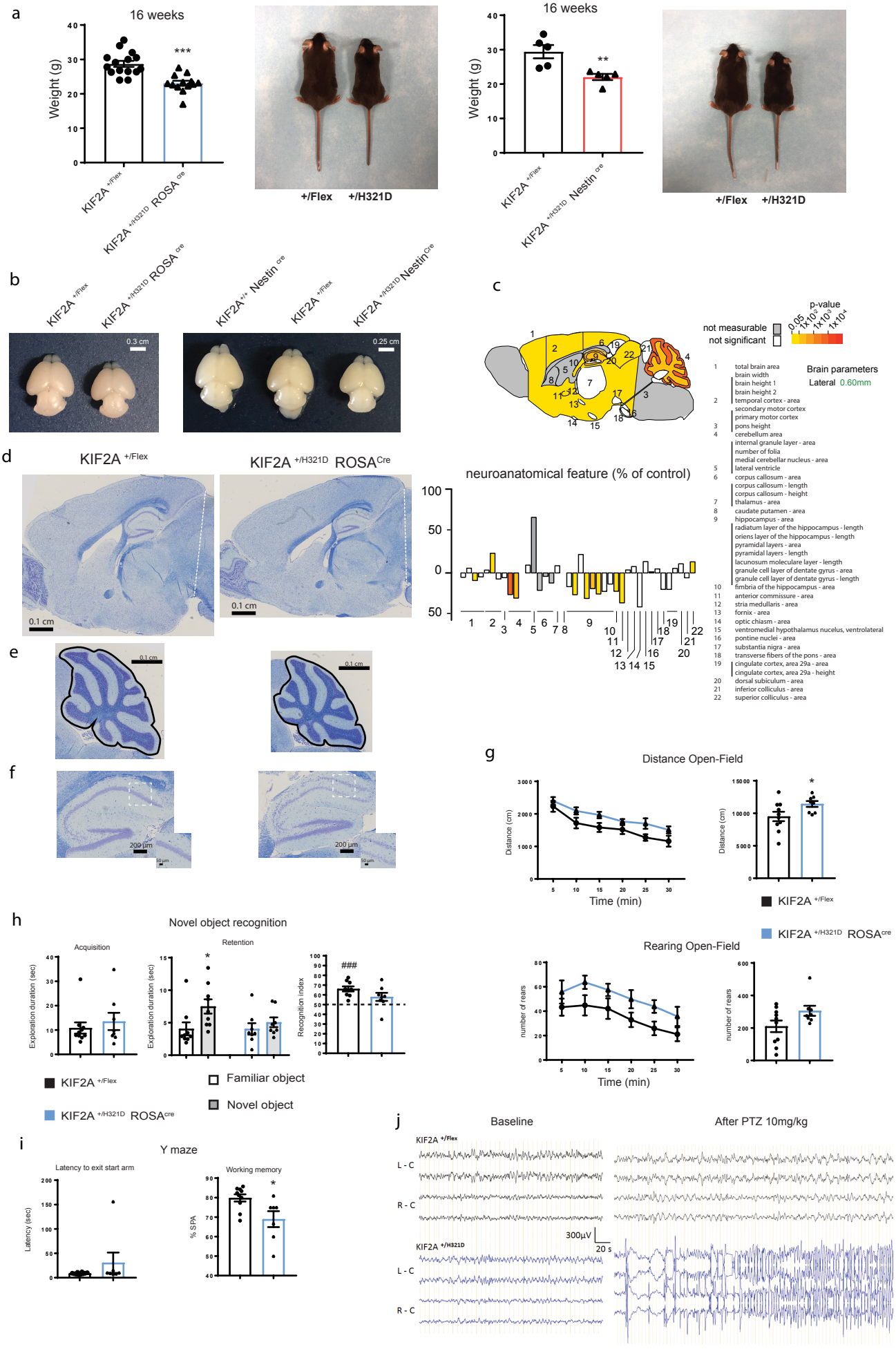

a
16 weeks
Weight (g)
***
KIF2A +/Flex
KIF2A +/H321D ROSA cre
+/Flex +/H321D
16 weeks
Weight (g)
**
KIF2A +/Flex
KIF2A +/H321D Nestin cre
+/Flex +/H321D
b
KIF2A +/Flex
KIF2A +/H321D ROSA cre
KIF2A +/+ Nestin cre
KIF2A +/Flex
KIF2A +/H321D Nestin Cre
0.3 cm
0.25 cm
c
p-value
not measurable
not significant
0.05
1x10-2
1x10-3
1x10-4
Brain parameters
Lateral 0.60mm
1 total brain area
brain width
brain height 1
brain height 2
2 temporal cortex - area
secondary motor cortex
primary motor cortex
3 pons height
4 cerebellum area
internal granule layer - area
number of folia
medial cerebellar nucleus - area
5 lateral ventricle
6 corpus callosum - area
corpus callosum - length
corpus callosum - height
7 thalamus - area
8 caudate putamen - area
9 hippocampus - area
radiatum layer of the hippocampus - length
oriens layer of the hippocampus - length
pyramidal layers - area
pyramidal layers - length
lacunosum moleculare layer - length
granule cell layer of dentate gyrus - area
granule cell layer of dentate gyrus - length
10 fimbria of the hippocampus - area
11 anterior commissure - area
12 stria medullaris - area
13 fornix - area
14 optic chiasm - area
15 ventromedial hypothalamus nucelus, ventrolateral
16 pontine nuclei - area
17 substantia nigra - area
18 transverse fibers of the pons - area
19 cingulate cortex, area 29a - area
cingulate cortex, area 29a - height
20 dorsal subiculum - area
21 inferior colliculus - area
22 superior colliculus - area
d
KIF2A +/Flex
KIF2A +/H321D ROSACre
0.1 cm
neuroanatomical feature (% of control)
100
50
0
50
e
0.1 cm
f
200 µm
g
Distance Open-Field
Distance (cm)
Time (min)
KIF2A +/Flex
KIF2A +/H321D ROSAcre
Rearing Open-Field
number of rears
Time (min)
h
Novel object recognition
Acquisition
Retention
Exploration duration (sec)
Recognition index
###
KIF2A +/Flex
KIF2A +/H321D ROSAcre
Familiar object
Novel object
i
Y maze
Latency to exit start arm
Latency (sec)
Working memory
% SPA
j
Baseline
After PTZ 10mg/kg
KIF2A +/Flex
KIF2A +/H321D
L - C
R - C
300µV
20 s

Figure 3

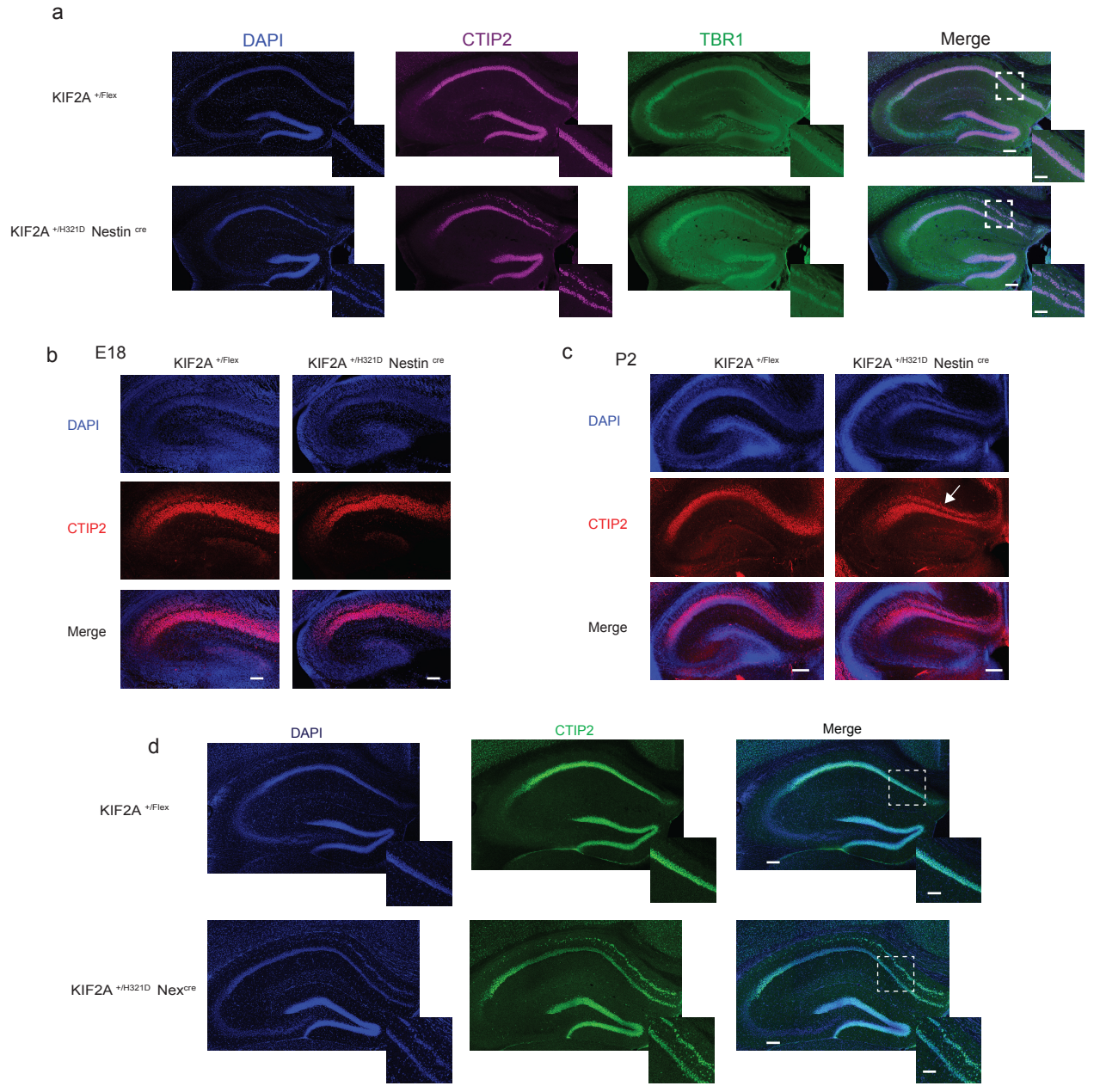

a
DAPI
CTIP2
TBR1
Merge
KIF2A +/Flex
KIF2A +/H321D Nestin cre
b
E18
KIF2A +/Flex
KIF2A +/H321D Nestin cre
DAPI
CTIP2
Merge
c
P2
KIF2A +/Flex
KIF2A +/H321D Nestin cre
DAPI
CTIP2
Merge
d
DAPI
CTIP2
Merge
KIF2A +/Flex
KIF2A +/H321D Nex cre

Figure 4

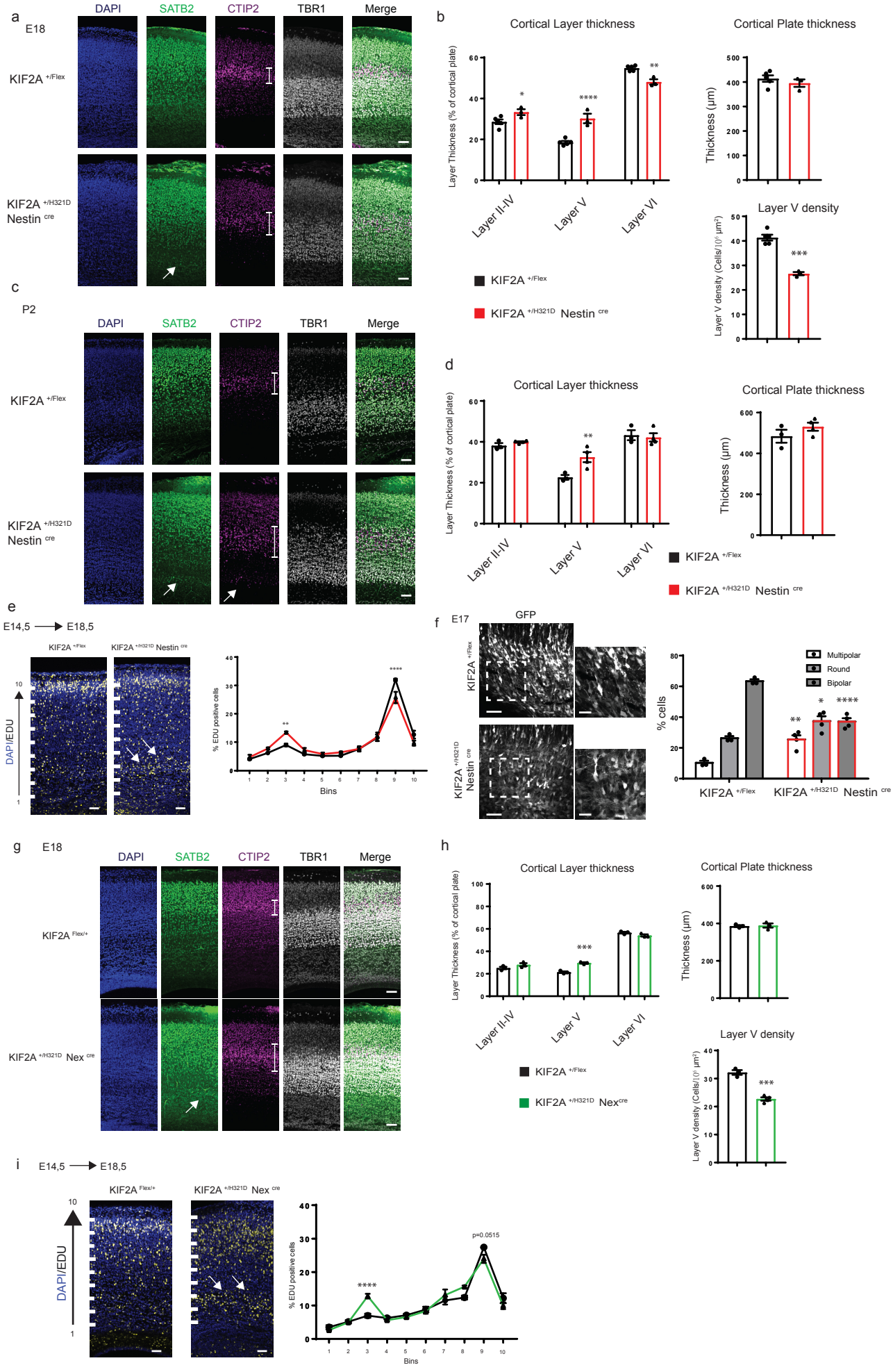

a
E18
DAPI
SATB2
CTIP2
TBR1
Merge
KIF2A +/Flex
KIF2A +/H321D Nestin cre
b
Cortical Layer thickness
Layer Thickness (% of cortical plate)
Layer II-IV
Layer V
Layer VI
KIF2A +/Flex
KIF2A +/H321D Nestin cre
Cortical Plate thickness
Thickness (µm)
Layer V density
Layer V density (Cells/10⁵ µm²)
c
P2
d
e
E14,5 → E18,5
DAPI/EDU
% EDU positive cells
Bins
f
E17
GFP
% cells
Multipolar
Round
Bipolar
g
KIF2A Flex/+
KIF2A +/H321D Nex cre
h
KIF2A +/Flex
KIF2A +/H321D Nexcre
i
p=0.0515

Figure 5

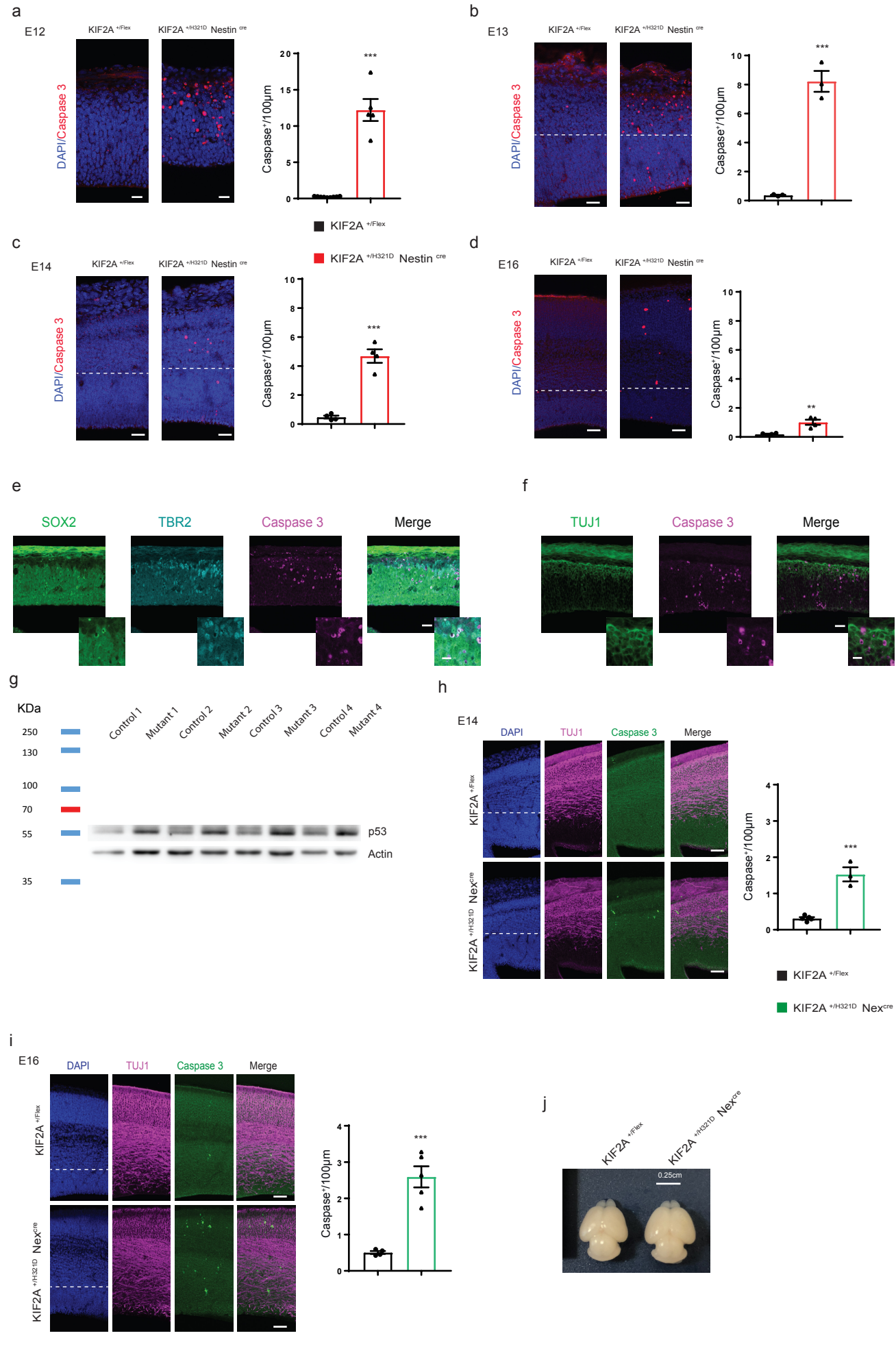
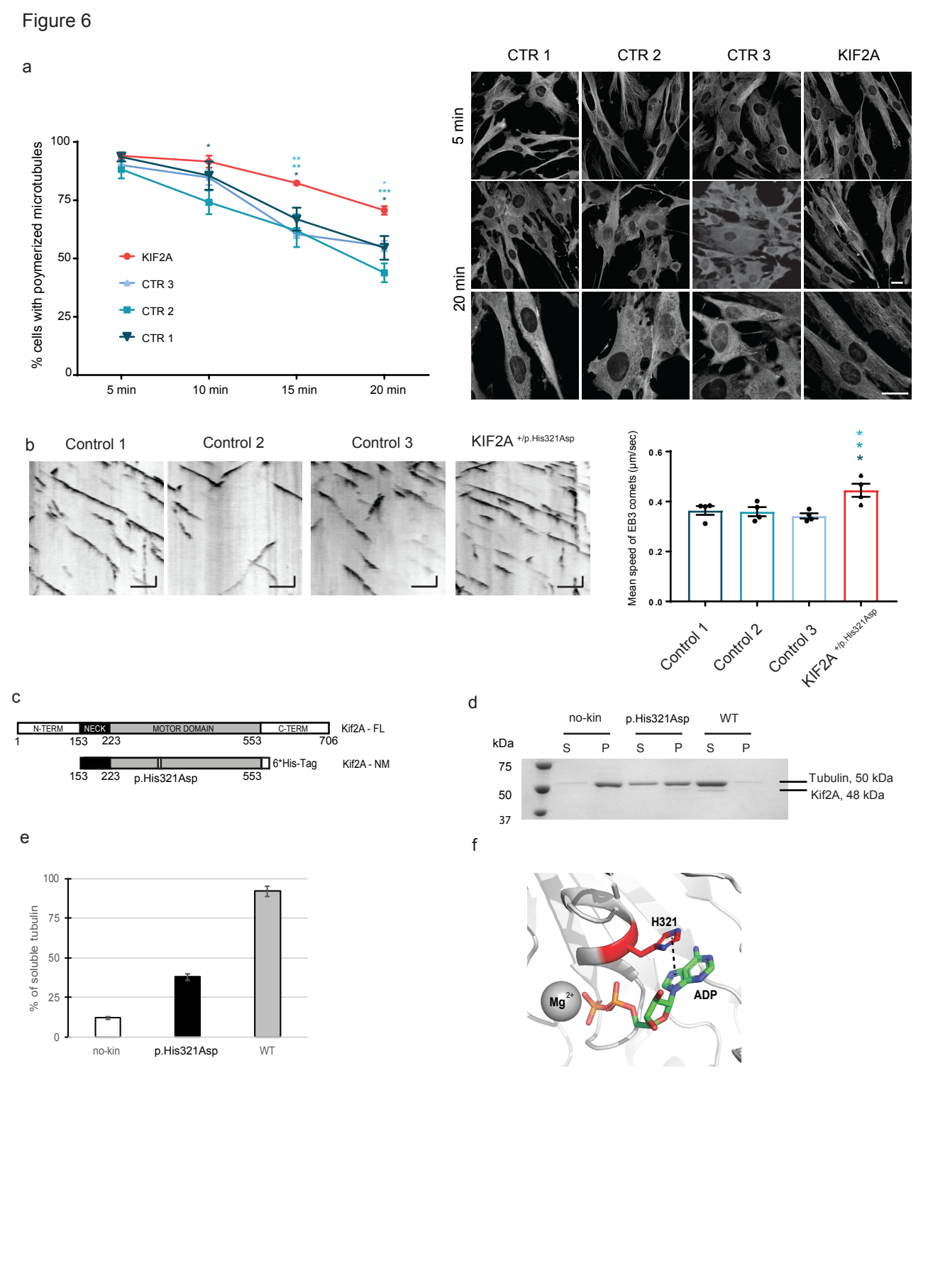

a
E12
KIF2A +/Flex
KIF2A +/H321D Nestin cre
DAPI/Caspase 3
Caspase+/100μm
***
b
E13
c
E14
d
E16
**
KIF2A +/Flex
KIF2A +/H321D Nestin cre
e
SOX2
TBR2
Caspase 3
Merge
f
TUJ1
g
KDa
250
130
100
70
55
35
Control 1
Mutant 1
Control 2
Mutant 2
Control 3
Mutant 3
Control 4
Mutant 4
p53
Actin
h
DAPI
TUJ1
Caspase 3
Merge
KIF2A +/Flex
KIF2A +/H321D Nexcre
i
j
0.25cm

Figure 6


a
CTR 1
CTR 2
CTR 3
KIF2A
5 min
20 min
% cells with poymerized microtubules
100
75
50
25
0
KIF2A
CTR 3
CTR 2
CTR 1
5 min
10 min
15 min
20 min
b
Control 1
Control 2
Control 3
KIF2A +/p.His321Asp
Mean speed of EB3 comets (µm/sec)
0.6
0.4
0.2
0.0
Control 1
Control 2
Control 3
KIF2A +/p.His321Asp
c
N-TERM
NECK
MOTOR DOMAIN
C-TERM
Kif2A - FL
1
153
223
553
706
6*His-Tag
Kif2A - NM
153
223
p.His321Asp
553
d
no-kin
p.His321Asp
WT
kDa
S
P
S
P
S
P
75
50
37
Tubulin, 50 kDa
Kif2A, 48 kDa
e
% of soluble tubulin
100
75
50
25
0
no-kin
p.His321Asp
WT
f
H321
ADP
Mg2+

Supplementary information

Supplementary Figure 1. KIF2A Flex II mice RT-PCR and validation in ES cells.

a, Sequencing of cDNA obtained by RT-PCR on ES cells.

b, Quantitative PCR strategy. Two couples of primers were designed for quantitative PCR of KIF2A Flex II mice. The schematic representation on the left shows the length of the fragments amplified by the primers. The table on the right indicates the primers sequences.

c, Quantitative PCR analysis of KIF2A levels in ES cells, normalized to actin.

d, Position of primer pairs and strategy used for genotyping represented in each allele. Each pairs of primers used to determine the genotype are precise in a table

Supplementary Figure 2. KIF2A expression and mislocalization phenotype

a, Immunofluorescence staining of Nestin (green), CTIP2 (cyan), KIF2A(magenta) and DAPI (blue) on embryonic cortices at E12. Scale bar 50µm.

b, Immunofluorescence staining of TUJ1 (green), KIF2A(magenta) and DAPI (blue) on embryonic cortices at E15. Scale bar 25µm.

c, Immunofluorescence staining of KIF2A (red) and DAPI (blue) on ES cells, before and after CRE recombination, scale bar 5µm.

d, Immunofluorescence staining of KIF2A(red) and DAPI (blue) on projection neurons in adult KIF2 cortices from adult *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Nestin*^{cre} mice. Scale bar 10 µm.

Supplementary Figure 3. Behavioral test link to cerebellum atrophy and CA1 hippocampal heterotopia in KIF2A mutant mice.

Behavioral tests. **a,** grip test. Grip strengh is presented in g (left panel) and normalize by the weight of the mice (right panel).**b**, **c**renelated beam, histograms represent the latency of mice to cross the crenelated beam and the number of slips. **c,** Rotarod, histograms represent the latency of mice to fall. Data are represented as mean ± s.e.m., n=10 KIF2A$^{+/H321D}$ROSA^{Cre} and n=9 control mice.

d, Immunofluorescence staining of CTIP2(green), and DAPI (blue) on hippocampal slices from adult *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Rosa*^{cre} mice. Scale bar 0.2 cm. Insets delimited with a dotted square show higher magnification of the CA1 region, scale bar 0.1 mm.

e, Immunofluorescence staining of NeuN(magenta), KIF2A(green) and DAPI (blue) on hippocampal slices from adult *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Nestin*^{cre} mice. Scale bar 0.2 cm. Insets delimited with a dotted square show higher magnification of the CA1 region, scale bar 0.1 cm.

f, Immunofluorescence staining of KIF2A(green) and DAPI (blue) on hippocampal slices from adult *KIF2A*$^{+/H321D}$ *Rosa*^{cre} mice. Scale bar 0.2 cm. Insets delimited with a dotted square show higher magnification of the CA1 region, scale bar 0.1 cm.

Supplementary Figure 4. KIF2A expression and mislocalization phenotype in KIF2A$^{+/H321D}$ Nex^{Cre} mice

a, Coronal sections of E16,5 embryonic cortices from *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nex*^{Cre} and control mice, stained with TUJ1 (green), TBR2 (gray), KIF2A (magenta) and counterstained with DAPI (blue), scale bar 80 µm. Insets delimited with a dotted square show higher magnification of the cortical plate, scale bar: 20µm. Dotted line delimit the cortical plate (CP).

b, Coronal sections of E18,5 embryonic cortices from *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nex*^{Cre} and control mice, stained KIF2A (magenta) and counterstained with DAPI (blue), scale bar 80 µm. Insets delimited with a dotted square show higher magnification of the cortical plate, scale bar: 20µm. Dotted line delimit the cortical plate (CP).

c, Coronal sections of adult cortices from *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nex*^{Cre} and control mice, stained KIF2A (magenta) and counterstained with DAPI (blue), scale bar 120 µm.

Supplementary Figure 5. Abnormal cortical layering in KIF2A$^{+/H321D}$ ROSA^{cre} mice.

a, Coronal sections of E18 embryonic cortices from *KIF2A*$^{+/H321D}$*Rosa*^{Cre} and control mice, stained with SATB2 (green), CTIP2 (magenta), TBR1 (gray) and counterstained with DAPI (blue), scale bar 80 µm. White arrow shows SATB2^{+} cells in the intermediate zone, white lines delimit layer V.

b, Histograms showing relative thickness of layers II-IV, V and VI as percentage if the cortical plate (upper panel), total thickness of the cortical plate (lower panel, left) and cell density of layer V (lower panel, right). Data are represented as mean ± s.e.m., n≥4 mice per group.

c, coronal sections stained with SATB2 (green) and EdU (magenta), scalebar 60 µm and 30 µm for insets.

d, Coronal sections of E18 embryonic cortices from *KIF2A*$^{+/H321D}$*Rosa*^{Cre} and control mice, after EdU staining (yellow) counterstained with DAPI (blue), scale bar 50 µm. The cortex was divided

into ten equal bins. White arrows show EdU^+ cells accumulation in the intermediate zone. Graphical representation shows the percentage the EDU^+ cells in each bin. Data are represented as mean ± s.e.m., n≥4 mice per group.

Analysis of electroporated neurons during time-lapse imaging. n = 3 WT and n = 5 K*IF2A*$^{+/H321D}$ *Nestin*^{Cre}; **e** average migration velocity, **f** average number of pauses, and total time spent in pause, during the 10 h of recording, **g,** percentage of bipolar cells and multipolar cells at t0, n = 4 independent experiments per group. Unpaired t-test, **p < 0.01, ***p < 0.001 compared to wild type mice.

d, Coronal sections of E15 embryonic cortices from *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nestin*^{Cre} and control mice, electroporated at E14 with BLBP-GFP, counterstained with DAPI (blue). Radial glial fibers marked by GFP are shown in grey, scale bar 20µm.

Supplementary Figure 6. Studies of neural progenitors and primary cilia in KIF2A$^{+/H321D}$ Nestin^{Cre} mice.

a, Coronal sections of E12, E13, E14 and E16 cortices from WT or *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nestin*^{Cre} mice were immunolabeled for the mitotic marker PH3 (red) and counterstained with DAPI (blue). Representative images are shown on the left, Scale bar 50µm. Histograms on the right show the number of PH3 cells in the ventricular zone (apical) and the developing cortical plate (basal). Data are represented as mean ± s.e.m., n≥4 embryos per group, unpaired t-test.

b, Coronal sections of E12, E13, E14 and E16 cortices from WT or *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nestin*^{Cre} mice were immunolabeled for the apical progenitor marker PAX6 (magenta), the basal progenitor marker TBR2 (green) and the newborn neuron marker TUJ1 (grey). Representative images are shown on the left, Scale bar 50µm. Histograms on the right show relative percentages of apical progenitors ($Pax6^+Trb2^-$), new-born intermediate progenitors ($Pax6^+Tbr2^+$), basal progenitors ($Pax6^-Tbr2^+$) and new-born neurons ($Tuj1^+$). Data are represented as mean ± s.e.m., n≥4 embryos per group, unpaired t-test.

c, Coronal section of E15 embryonic cortices from *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nestin*^{Cre} and control mice, electroporated at E14 with Arl13b-V5 (green) and tomato (magenta), counterstained with DAPI (Blue) scale bar 10 µm and zoom on ciliated cells, scale bar 2µm. Histograms on the right show length of primary cilia and relative percentage of ciliated cells. Data are represented as mean ± s.e.m., n=4 embryos per group, unpaired t-test.

d, Immunofluorescence staining of Cleaved Caspase 3 (red) on pups cortices at P2 from *KIF2A*$^{+/H321D}$*Nestin*^{Cre} and control mice, scale bars 80 µm.

Supplementary Figure 7. KIF2A p.His321Asp overexpression leads to an absence of MTs depolymerisation and purification and characterization of Kif2A p.His321Asp

a, Sequence of images during time-lapse recordings of tubulin-GFP HeLa cells transfected with a control empty vector, KIF2A-WT or KIF2A-His321Asp. At t=0, nocodazole was added to the medium and cells were recorder for 30 min. Scale bar: 10µm

Purification and characterization of p.His321Asp Kif2A. **b**, SDS-PAGE gel of total cell lysate (TCL), supernatant of the TCL (sup), and fractions of Ni affinity chromatography (fr 3, 5 and so on). **c**, SDS-PAGE gel of purified and concentrated p.His321Asp protein. **d,** Overlay of the CD spectra for wt (grey dash line) and p.His321Asp (red solid line) showing no significant difference in their secondary structures.

Supplementary video 1,2. Electroporated neuron time-lapse

Video of migrating electroporated neurons during 10 hours of time-lapse imaging in $KIF2A^{+/Flex}$ and $KIF2A^{+/H321D}$ $Nestin^{cre}$ mice.

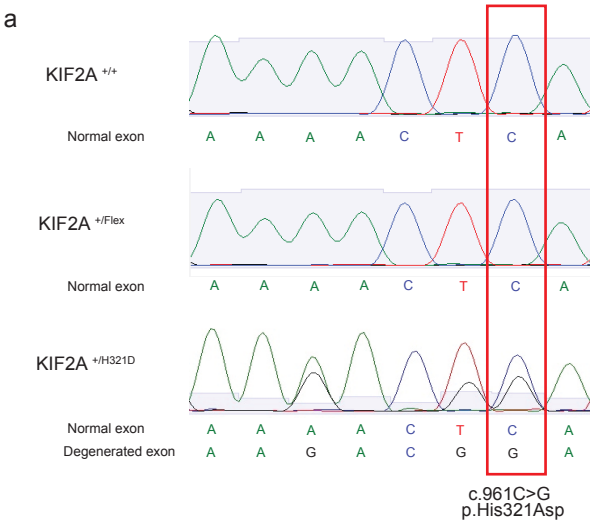
Supplementary video 3,4,5. Microtubules depolymerization time-lapse in tubulin-GFP HeLa cells.

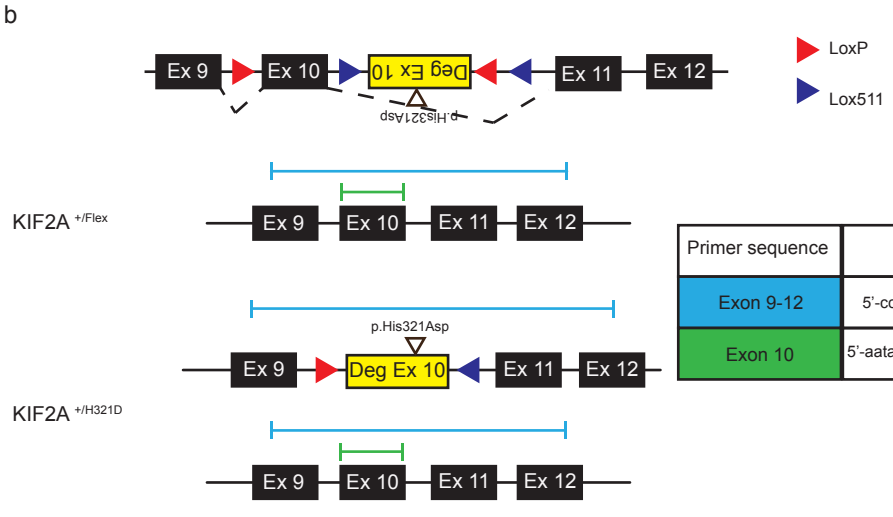
Time-lapse recordings of tubulin-GFP HeLa cells transfected with a control empty vector, KIF2A-WT or KIF2A-His321Asp. At t=0, nocodazole was added to the medium and cells were recorder for 30 min.

Supplementary video 6,7,8,9. Microtubules dynamics in fibroblast by EB3 comets tracking.

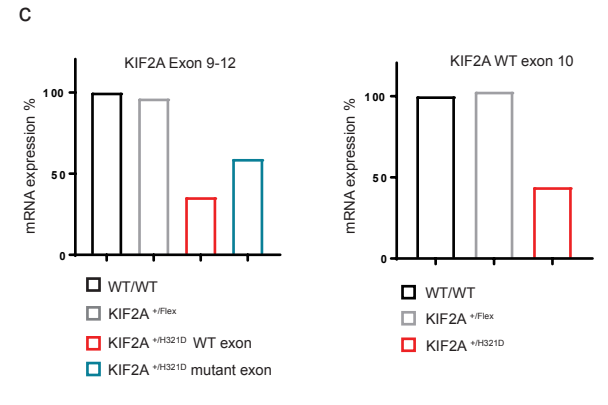
Microtubule dynamics in fibroblasts derived from a subject bearing the heterozygous KIF2A p.His321Asp variant and three controls. Time-lapse of fibroblasts transfected with EB3-GFP and recorded for 2 minutes.

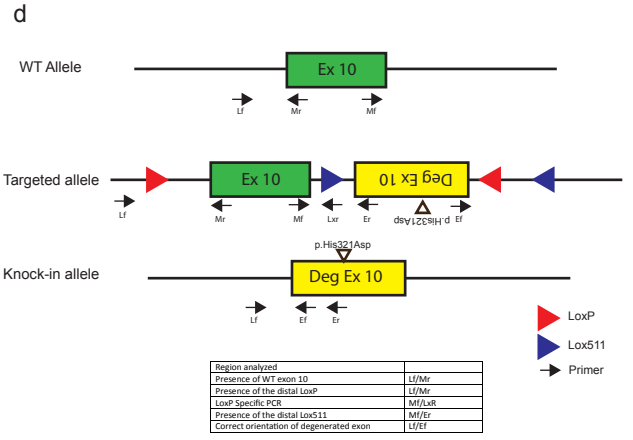
Supplementary figure 1





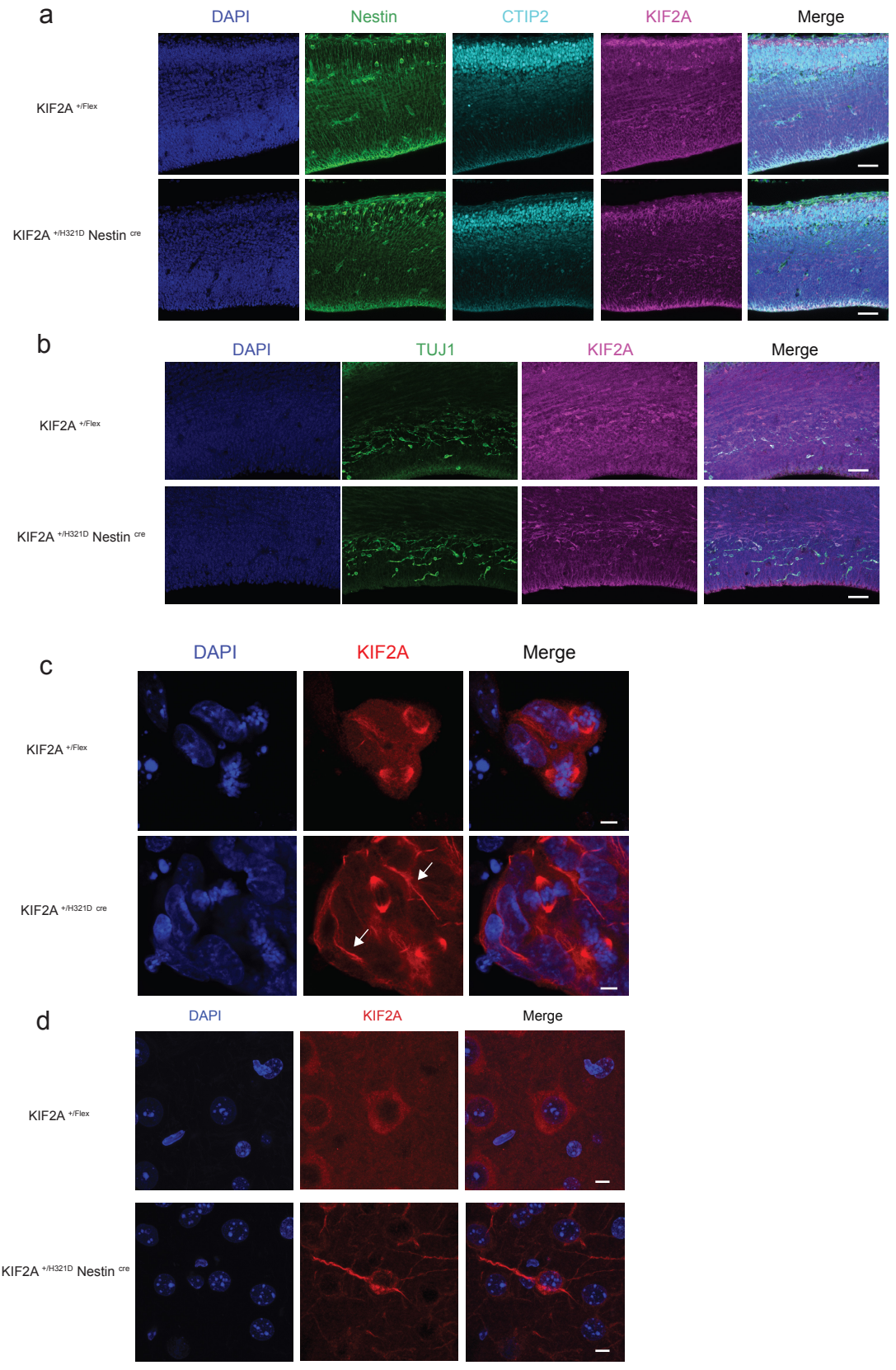
Primer sequence	Forward	Reverse
Exon 9-12	5'-ccttcgatgactcagctcct-3'	5'-agtggaaaggtgtttgacttact-3'
Exon 10	5'-aatatttgaaaggggccatgg-3'	5'-gcagactggaagtgggaaaa-3'



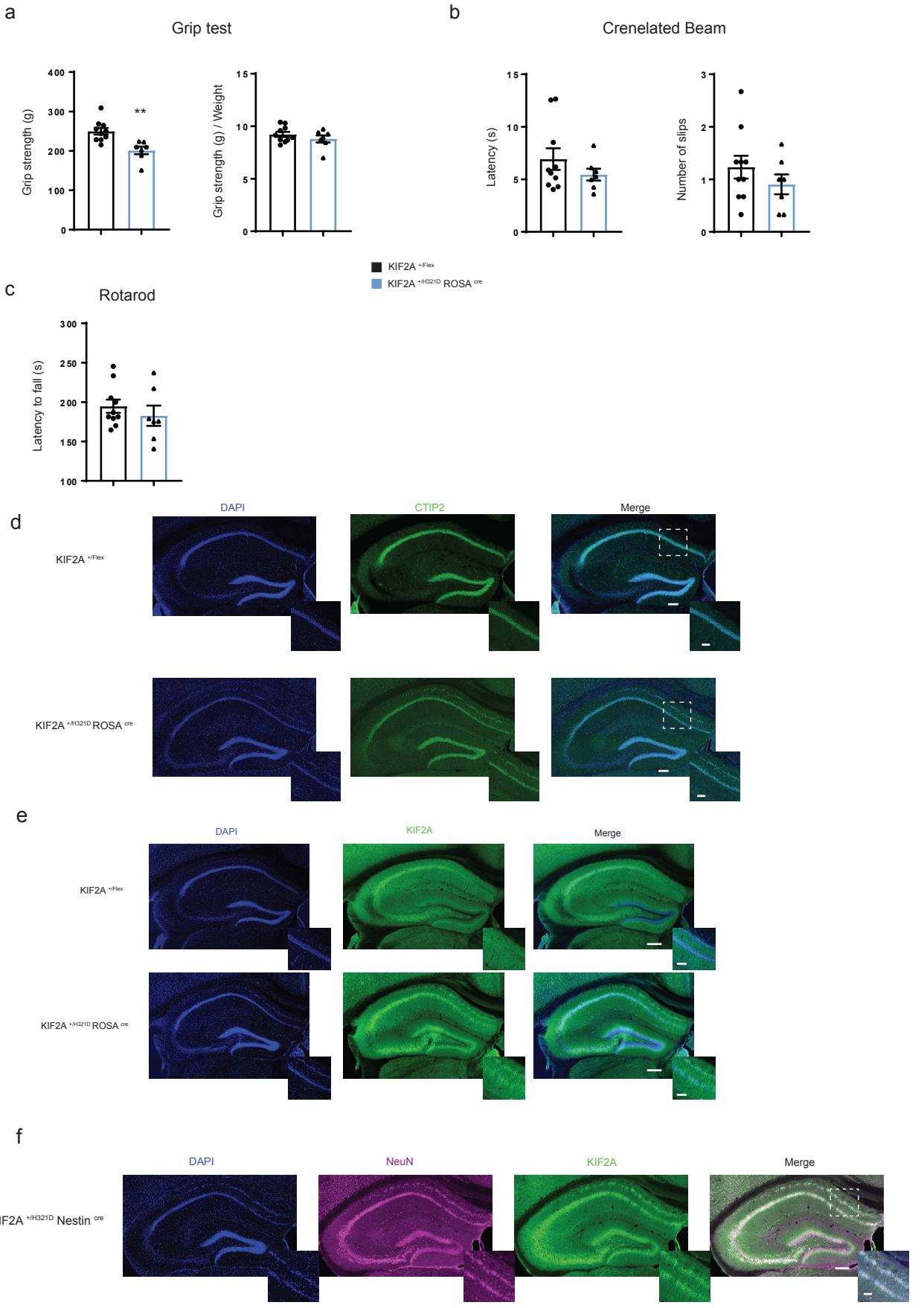


Region analyzed	
Presence of WT exon 10	Lf/Mr
Presence of the distal LoxP	Lf/Mr
LoxP Specific PCR	Mf/LxR
Presence of the distal Lox511	Mf/Er
Correct orientation of degenerated exon	Lf/Ef

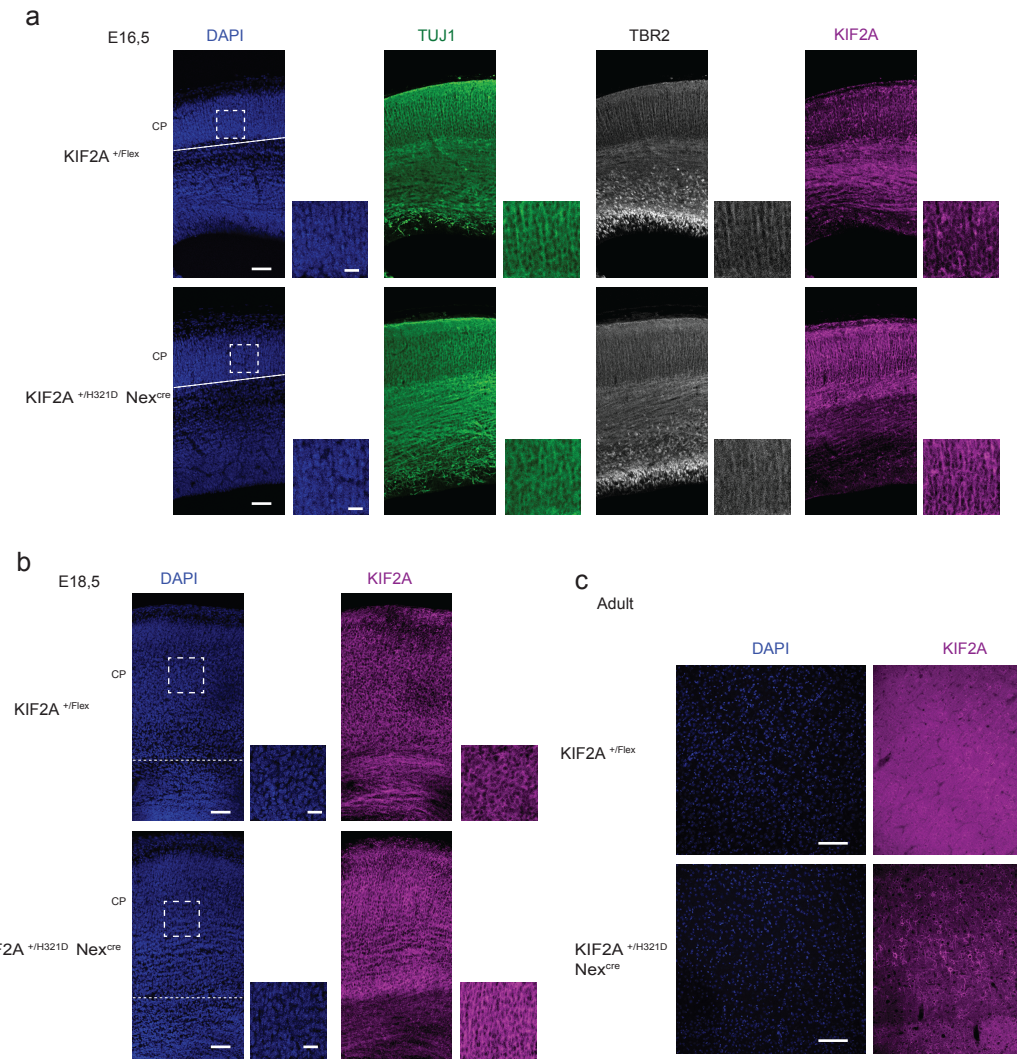
Supplementary figure 2



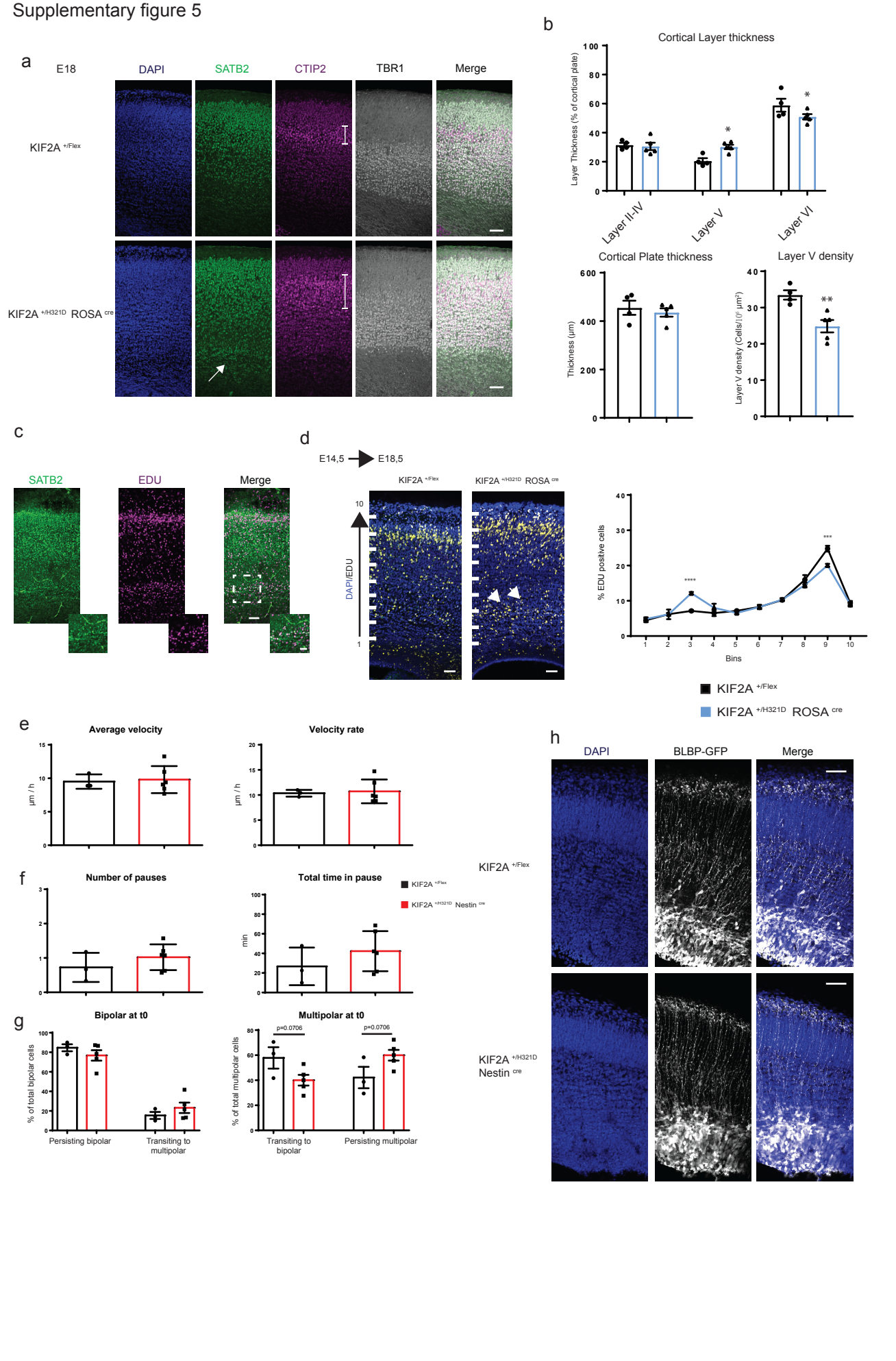
Supplementary figure 3



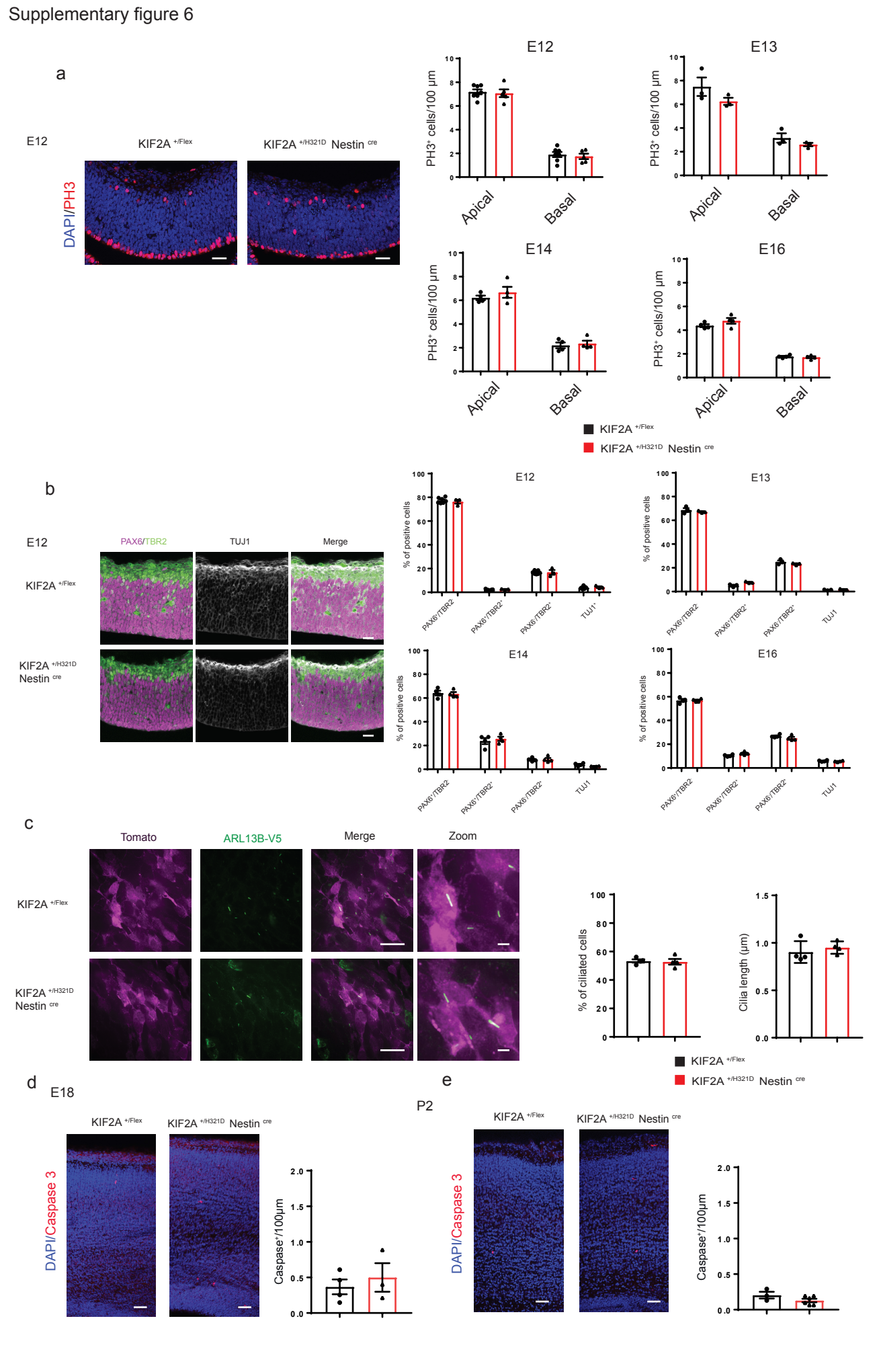
Supplementary figure 4



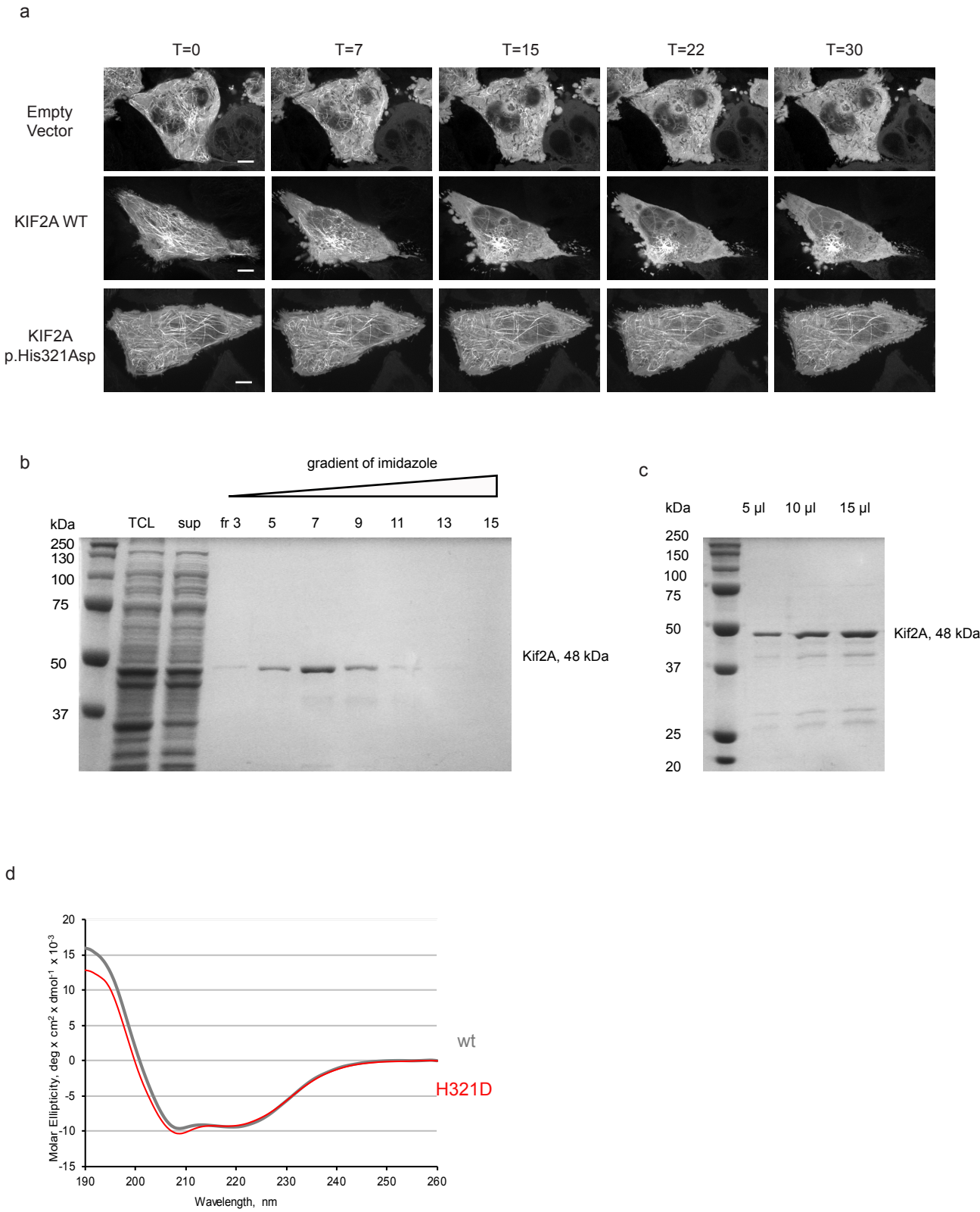
Supplementary figure 5



Supplementary figure 6



Supplementary figure 7



Supplementary Table 1 Description of the 166 neuroanatomical parameters

Parameter	Description	Unit
4_TB_area	Total brain area	cm2
4_TC_area	Total cerebellar area	cm2
4_LV_area	Lateral ventricle area	cm2
4_cc_area	Corpus callosum area	cm2
4_cc_cellcount	Cell count of the corpus callosum	digit
4_cc_cellarea	Total cell area of the corpus callosum	cm2
4_cc_celldens	Cell density of the corpus callosum	digit
4_cc_avgcellarea	Average cell area of the corpus callosum	cm2
4_cc_cellcirc	Cell circularity of the corpus callosum	digit
4_cc_cellsol	Cell solidity of the corpus callosum	digit
4_TCTX_area	Total cortical area	cm2
4_TCTX_cellcount	Cell count of the cortex	digit
4_TCTX_cellarea	Total cell area of the cortex	cm2
4_TCTX_celldens	Cell density of the cortex	digit
4_TCTX_avgcellarea	Average cell area of the cortex	cm2
4_TCTX_cellcirc	Cell circularity of the cortex	digit
4_TCTX_cellsol	Cell solidity of the cortex	digit
4_TTh_area	Total thalamic area	cm2
4_TTh_cellcount	Cell count of the thalamus	digit
4_TTh_cellarea	Total cell area of the thalamus	cm2
4_TTh_celldens	Cell density of the thalamus	digit
4_TTh_avgcellarea	Average cell area of the thalamus	cm2
4_TTh_cellcirc	Cell circularity of the thalamus	digit
4_TTh_cellsol	Cell solidity of the thalamus	digit
4_CPu_area	Caudate putamen area	cm2
4_CPu_cellcount	Cell count of the caudate putamen	digit
4_CPu_cellarea	Total cell area of the caudate putamen	cm2
4_CPu_celldens	Cell density of the caudate putamen	digit
4_CPu_avgcellarea	Average cell area of the caudate putamen	cm2
4_CPu_cellcirc	Cell circularity of the caudate putamen	digit
4_CPu_cellsol	Cell solidity of the caudate putamen	digit
4_HP_area	Hippocampus area	cm2
4_HP_cellcount	Cell count of the hippocampus	digit
4_HP_cellarea	Total cell area of the hippocampus	cm2
4_HP_celldens	Cell density of the hippocampus	digit
4_HP_avgcellarea	Average cell area of the hippocampus	cm2
4_HP_cellcirc	Cell circularity of the hippocampus	digit
4_HP_cellsol	Cell solidity of the hippocampus	digit
4_TILpy_area	Area of pyramidal cells of the hippocampus	cm2
4_TILpy_cellcount	Cell count of the pyramidal cells of the hippocampus	digit
4_TILpy_cellarea	Total cell area of the pyramidal cells of the hippocampus	cm2

4_TILpy_celldens	Cell density of the pyramidal cells of the hippocampus	digit
4_TILpy_avgcellarea	Average cell area of the pyramidal cells of the hippocampus	cm2
4_TILpy_cellcirc	Cell circularity of the pyramidal cells of the hippocampus	digit
4_TILpy_cellsol	Cell solidity of the pyramidal cells of the hippocampus	digit
4_DG_area	Dentate gyrus area	cm2
4_DG_cellcount	Cell count of the dentate gyrus	digit
4_DG_cellarea	Total cell area of the dentate gyrus	cm2
4_DG_celldens	Cell density of the dentate gyrus	digit
4_DG_avgcellarea	Average cell area of the dentate gyrus	cm2
4_DG_cellcirc	Cell circularity of the dentate gyrus	digit
4_DG_cellsol	Cell solidity of the dentate gyrus	digit
4_fi_area	Area of the fimbria of the hippocampus	cm2
4_fi_cellcount	Cell count of the fimbria of the hippocampus	digit
4_fi_cellarea	Total cell area of the fimbria of the hippocampus	cm2
4_fi_celldens	Cell density of the fimbria of the hippocampus	digit
4_fi_avgcellarea	Average cell area of the fimbria of the hippocampus	cm2
4_fi_cellcirc	Cell circularity of the fimbria of the hippocampus	digit
4_fi_cellsol	Cell solidity of the fimbria of the hippocampus	digit
4_aca_area	Anterior commissure area	cm2
4_aca_cellcount	Cell count of the anterior commissure	digit
4_aca_cellarea	Total cell area of the anterior commissure	cm2
4_aca_celldens	Cell density of the anterior commissure	digit
4_aca_avgcellarea	Average cell area of the anterior commissure	cm2
4_aca_cellcirc	Cell circularity of the anterior commissure	digit
4_aca_cellsol	Cell solidity of the anterior commissure	digit
4_sm_area	Stria medullaris area	cm2
4_sm_cellcount	Cell count of the stria medullaris	digit
4_sm_cellarea	Total cell area of the stria medullaris	cm2
4_sm_celldens	Cell density of the stria medullaris	digit
4_sm_avgcellarea	Average cell area of the stria medullaris	cm2
4_sm_cellcirc	Cell circularity of the stria medullaris	digit
4_sm_cellsol	Cell solidity of the stria medullaris	digit
4_f_area	Fornix area	cm2
4_f_cellcount	Cell count of the fornix	digit
4_f_cellarea	Total cell area of the fornix	cm2
4_f_celldens	Cell density of the fornix	digit
4_f_avgcellarea	Average cell area of the fornix	cm2
4_f_cellcirc	Cell circularity of the fornix	digit
4_f_cellsol	Cell solidity of the fornix	digit
4_och_area	Optic chiasm area	cm2
4_och_cellcount	Cell count of the optic chiasm	digit
4_och_cellarea	Total cell area of the optic chiasm	cm2

4_och_celldens	Cell density of the optic chiasm	digit
4_och_avgcellarea	Average cell area of the optic chiasm	cm2
4_och_cellcirc	Cell circularity of the optic chiasm	digit
4_och_cellsol	Cell solidity of the optic chiasm	digit
4_VMHvl_area	Area of ventromedial nucleus of the hypothalamus	cm2
4_VMHvl_cellcount	Cell count of the ventromedial nucleus of the hypothalamus	digit
4_VMHvl_cellarea	Total cell area of the ventromedial nucleus of the hypothalamus	cm2
4_VMHvl_celldens	Cell density of the ventromedial nucleus of the hypothalamus	digit
4_VMHvl_avgcellarea	Average cell area of the ventromedial nucleus of the hypothalamus	cm2
4_VMHvl_cellcirc	Cell circularity of the ventromedial nucleus of the hypothalamus	digit
4_VMHvl_cellsol	Cell solidity of the ventromedial nucleus of the hypothalamus	digit
4_Pn_area	Pontine nuclei area	cm2
4_Pn_cellcount	Cell count of the pontine nuclei	digit
4_Pn_cellarea	Total cell area of the pontine nuclei	cm2
4_Pn_celldens	Cell density of the pontine nuclei	digit
4_Pn_avgcellarea	Average cell area of the pontine nuclei	cm2
4_Pn_cellcirc	Cell circularity of the pontine nuclei	digit
4_Pn_cellsol	Cell solidity of the pontine nuclei	digit
4_SN_area	Substantia nigra area	cm2
4_SN_cellcount	Cell count of the substantia nigra	digit
4_SN_cellarea	Total cell area of the substantia nigra	cm2
4_SN_celldens	Cell density of the substantia nigra	digit
4_SN_avgcellarea	Average cell area of the substantia nigra	cm2
4_SN_cellcirc	Cell circularity of the substantia nigra	digit
4_SN_cellsol	Cell solidity of the substantia nigra	digit
4_fp_area	Area of fibre of pons	cm2
4_fp_cellcount	Cell count of the fibre of pons	digit
4_fp_cellarea	Total cell area of the fibre of pons	cm2
4_fp_celldens	Cell density of the fibre of pons	digit
4_fp_avgcellarea	Average cell area of the fibre of pons	cm2
4_fp_cellcirc	Cell circularity of the fibre of pons	digit
4_fp_cellsol	Cell solidity of the fibre of pons	digit
4_Cg_area	Cingulate cortex area	cm2
4_Cg_cellcount	Cell count of the cingulate cortex	digit
4_Cg_cellarea	Total cell area of the cingulate cortex	cm2
4_Cg_celldens	Cell density of the cingulate cortex	digit
4_Cg_avgcellarea	Average cell area of the cingulate cortex	cm2
4_Cg_cellcirc	Cell circularity of the cingulate cortex	digit
4_Cg_cellsol	Cell solidity of the cingulate cortex	digit
4_DS_area	Dorsal subiculum area	cm2

4_DS_cellcount	Cell count of the dorsal subiculum	digit
4_DS_cellarea	Total cell area of the dorsal subiculum	cm2
4_DS_celldens	Cell density of the dorsal subiculum	digit
4_DS_avgcellarea	Average cell area of the dorsal subiculum	cm2
4_DS_cellcirc	Cell circularity of the dorsal subiculum	digit
4_DS_cellsol	Cell solidity of the dorsal subiculum	digit
4_InfC_area	Inferior colliculus area	cm2
4_InfC_cellcount	Cell count of the inferior colliculus	digit
4_InfC_cellarea	Total cell area of the inferior colliculus	cm2
4_InfC_celldens	Cell density of the inferior colliculus	digit
4_InfC_avgcellarea	Average cell area of the inferior colliculus	cm2
4_InfC_cellcirc	Cell circularity of the inferior colliculus	digit
4_InfC_cellsol	Cell solidity of the inferior colliculus	digit
4_SupC_area	Superior colliculus area	cm2
4_SupC_cellcount	Cell count of the superior colliculus	digit
4_SupC_cellarea	Total cell area of the superior colliculus	cm2
4_SupC_celldens	Cell density of the superior colliculus	digit
4_SupC_avgcellarea	Average cell area of the superior colliculus	cm2
4_SupC_cellcirc	Cell circularity of the superior colliculus	digit
4_SupC_cellsol	Cell solidity of the superior colliculus	digit
4_Med_area	Area of the medial cerebellar nucleus	cm2
4_Med_cellcount	Cell count of the medial cerebellar nucleus	digit
4_Med_cellarea	Total cell area of the medial cerebellar nucleus	cm2
4_Med_celldens	Cell density of the medial cerebellar nucleus	digit
4_Med_avgcellarea	Average cell area of the medial cerebellar nucleus	cm2
4_Med_cellcirc	Cell circularity of the medial cerebellar nucleus	digit
4_Med_cellsol	Cell solidity of the medial cerebellar nucleus	digit
4_TILpy_length	Total internal length of pyramidal cell layer of the hippocampus	cm
4_DG_length	Dentate gyrus length	cm
4_cc_length	Total outer length of the corpus callosum	cm
4_Mol_length	Length of the molecular layer of the hippocampus	cm
4_Rad_length	Length of the radiatum layer of the hippocampus	cm
4_Or_length	Length of the oriens layer of the hippocampus	cm
4_cc_height	Corpus callosum thickness	cm
4_M2_length	Length of the secondary motor cortex	cm
4_M1_length	Length of the primary motor cortex	cm
4_Cg_height	Height of the cingulate cortex	cm
4_TB_width	Width of the total brain	cm
4_TB_height_CS1	Height of the total brain at CS1 (coronal critical section 1)	cm
4_TB_height_CS2	Height of the total brain at CS2 (coronal critical section 2)	cm
4_Pons_height	Height of the pons	cm

4_IGL_area	Area of the internal granular layer of the cerebellum	cm2
4_Folia	Number of folia	digit

Supplementary Table 2: Neuromorphological analysis Statistics

Sex	Male	Male	Male	Male	Male	Male	%change	p-val		
Barcode	A00006707	A00006708	A00006709	A00006710	A00006711	A00006712				
Gene	Kif2A	Kif2A	Kif2A	Kif2A	Kif2A	Kif2A				
Genotype	WT	WT	WT	KI	KI	KI				
X4_TB_area	0,37457504	0,36757105	0,33065367	0,36312841	0,31799408	0,33518171	-5,26617953	0,37627797	-5,26617953	0,37627797
X4_TB_width	0,63367432	0,63380932	0,6176	0,72878292	0,62009014	0,6407	5,54295865	0,36054599	5,54295865	0,36054599
X4_TB_height_CS1	0,52775808	0,50705309	0,48184768	0,45280468	0,44878439	0,47658896	-9,13065071	0,04364309	-9,13065071	0,04364309
X4_TB_height_CS2	0,62512892	0,58389769	0,55793441	0,565207	0,54822328	0,56927012	-4,76867446	0,24440368	-4,76867446	0,24440368
X4_TCTX_area	0,03614096	0,03589261	0,03414	0,03802858	0,03605532	0,03555307	3,26201433	0,30558653	3,26201433	0,30558653
X4_TCTX_avgcellarea	1,0944E-06	1,2184E-06	1,0814E-06	6,4827E-07	9,6613E-07	1,0141E-06	-22,5578512	0,10623424	-22,5578512	0,10623424
X4_TCTX_cellarea	0,00615709	0,00704087	0,00635334	0,00354801	0,00641318	0,0057196	-19,7966702	0,22654792	-19,7966702	0,22654792
X4_TCTX_cellcount	5626	5779	5875	5473	6638	5640	2,72569444	0,69382159	2,72569444	0,69382159
X4_TCTX_celldens	155668,246	161008,087	172085,53	143918,082	184105,995	158636,09	-0,43000431	0,95863952	-0,43000431	0,95863952
X4_TCTX_cellcirc	0,75426473	0,78390656	0,79555241	0,72575871	0,79548383	0,7907198	-0,9324732	0,79119649	-0,9324732	0,79119649
X4_TCTX_cellsol	0,88179251	0,89971006	0,90337423	0,85355721	0,89889356	0,89658746	-1,33483082	0,50130025	-1,33483082	0,50130025
X4_M2_length	0,14130485	0,12194983	0,1292	0,16849751	0,15290234	0,16297872	23,422802	0,01347563	23,422802	0,01347563
X4_M1_length	0,14524849	0,14487231	0,13899646	0,10958779	0,13664313	0,15192703	-7,21465034	0,45687388	-7,21465034	0,45687388
X4_Pons_height	0,24446681	0,23416025	0,2486736	0,23342498	0,21016914	0,2418544	-5,75444798	0,25124193	-5,75444798	0,25124193
X4_TC_area	0,08287164	0,08177382	0,07811207	0,05803366	0,06221026	0,05979661	-25,8352476	0,0003724	-25,8352476	0,0003724
X4_IGL_area	0,03909549	0,03927971	0,03876508	0,0288503	0,03051246	0,02249834	-30,1170365	0,00860671	-30,1170365	0,00860671
X4_Folia	8	8	8	7	9	8	0	1	0	1
X4_Med_area	0,00091177	0,00159404	0,00112815	0,00192419		0,00072319	9,27661559	0,84204773	9,27661559	0,84204773

X4_Med_avgcellarea	4,7176E-07	5,4367E-07	5,7978E-07	3,4715E-07		2,2815E-07	-45,9045766	0,02725118	-45,9045766	0,02725118
X4_Med_cellarea	4,5761E-05	0,00010547	6,9574E-05	4,2699E-05		9,354E-06	-64,6390287	0,16030982	-64,6390287	0,16030982
X4_Med_cellcount	97	194	120	123		41	-40,1459854	0,33997621	-40,1459854	0,33997621
X4_Med_celldens	106386,829	121703,269	106368,645	63922,8685		56693,6538	-45,9052014	0,00555806	-45,9052014	0,00555806
X4_Med_cellcirc	0,73970677	0,77988195	0,78295042	0,81368872		0,83042334	7,10645705	0,06429874	7,10645705	0,06429874
X4_Med_cellsol	0,8523264	0,87476196	0,88018098	0,8744829		0,87240203	0,5008322	0,71961826	0,5008322	0,71961826
X4_LV_area	0,00683652	0,0034292	0,00611424		0,01004	0,00811932	66,2946102	0,09717051	66,2946102	0,09717051
X4_cc_area	0,01122	0,01075839	0,01103			0,00871536	-20,7896071	#DIV/0!	-20,7896071	1,1
X4_cc_length	0,56638209	0,55395425	0,56218802	0,59068821	0,52821694	0,49289781	-4,20329102	0,45933249	-4,20329102	0,45933249
X4_cc_height	0,01964052	0,01751782	0,01738109			0,01599367	-12,0251053	#DIV/0!	-12,0251053	1,1
X4_cc_avgcellarea	4,322E-07	3,9843E-07	3,9374E-07			3,2679E-07	-19,928855	#DIV/0!	-19,928855	1,1
X4_cc_cellarea	0,000663	0,00062036	0,00066897			0,00039607	-39,1386547	#DIV/0!	-39,1386547	1,1
X4_cc_cellcount	1534	1557	1699			1212	-24,091858	#DIV/0!	-24,091858	1,1
X4_cc_celldens	136720,143	144724,23	154034,451			139064,839	-4,19866706	#DIV/0!	-4,19866706	1,1
X4_cc_cellcirc	0,78421472	0,81314556	0,7410171			0,8454248	8,46300679	#DIV/0!	8,46300679	1,1
X4_cc_cellsol	0,87114488	0,88181723	0,8601826			0,89195754	2,40047544	#DIV/0!	2,40047544	1,1
X4_TTh_area	0,03518686	0,0371743	0,02938	0,04105579	0,03287743	0,03648189	8,52550498	0,43383584	8,52550498	0,43383584
X4_TTh_avgcellarea	7,3453E-07	9,0226E-07	6,945E-07	9,9708E-07	9,2858E-07	8,0497E-07	17,1293072	0,19202991	17,1293072	0,19202991
X4_TTh_cellarea	0,00390038	0,00557689	0,00302037	0,00569332	0,00426495	0,0043533	14,5142489	0,53013957	14,5142489	0,53013957
X4_TTh_cellcount	5310	6181	4349	5710	4593	5408	-0,81439394	0,94848829	-0,81439394	0,94848829
X4_TTh_celldens	150908,602	166270,77	148025,868	139079,03	139700,713	148237,93	-8,20875692	0,11706007	-8,20875692	0,11706007

X4_TTh_cellcirc	0,70194117	0,7260548	0,76057041	0,74022772	0,76555887	0,75781299	3,42841793	0,24971889	3,42841793	0,24971889
X4_TTh_cellsol	0,84606975	0,86442406	0,8830738	0,87645247	0,88650771	0,87823157	1,8362405	0,22667406	1,8362405	0,22667406
X4_CPu_area									0	1,1
X4_CPu_avgcellarea									0	1,1
X4_CPu_cellarea									0	1,1
X4_CPu_cellcount									0	1,1
X4_CPu_celldens									0	1,1
X4_CPu_cellcirc									0	1,1
X4_CPu_cellsol									0	1,1
X4_HP_area	0,01820831	0,01681858	0,01678815	0,01660227	0,01300979	0,01368705	-16,435247	0,07678159	-16,435247	0,07678159
X4_Rad_length	0,02814849	0,02514234	0,02350262	0,02022318	0,01949442	0,01712594	-25,9786493	0,01575045	-25,9786493	0,01575045
X4_Or_length	0,01263307	0,01178058	0,01074019	0,01872161	0,01390877	0,01021732	21,8862639	0,36673789	21,8862639	0,36673789
X4_HP_avgcellarea	8,8391E-07	8,6081E-07	8,0457E-07	1,0503E-06	7,9737E-07	7,2607E-07	0,95807912	0,9397105	0,95807912	0,9397105
X4_HP_cellarea	0,00080877	0,00079194	0,0008263	0,00118995	0,00071843	0,00080085	11,6286151	0,55374764	11,6286151	0,55374764
X4_HP_cellcount	915	920	1027	1133	901	1103	9,60866527	0,32359748	9,60866527	0,32359748
X4_HP_celldens	50251,7889	54701,4076	61174,1093	68243,6882	69255,5322	80587,142	31,2766504	0,02688455	31,2766504	0,02688455
X4_HP_cellcirc	0,74723036	0,74871183	0,77793615	0,74916512	0,76782655	0,74280811	-0,61914298	0,72645642	-0,61914298	0,72645642
X4_HP_cellsol	0,87407297	0,87577548	0,88658441	0,87981954	0,88094581	0,8670658	-0,32626334	0,65397714	-0,32626334	0,65397714
X4_TILpy_area	0,00142631	0,00121084	0,00117401	0,00091895	0,00081906	0,00090858	-30,5568806	0,01021407	-30,5568806	0,01021407
X4_TILpy_length	0,18672553	0,1839976	0,19420466	0,16435076	0,14706736	0,14823345	-18,6353425	0,005258	-18,6353425	0,005258
X4_Mol_length	0,01147802	0,01074926	0,0129811	0,0079253	0,00910954	0,00929352	-25,2213188	0,01955697	-25,2213188	0,01955697
X4_TILpy_avgcellarea									0	1,1
X4_TILpy_cellarea									0	1,1
X4_TILpy_cellcount									0	1,1
X4_TILpy_celldens									0	1,1

X4_TILpy_cellcirc									0	1,1
X4_TILpy_cellsol									0	1,1
X4_DG_area	0,00175944	0,00159195	0,00160464	0,00160776	0,00104269	0,00121074	-22,0909816	0,10674997	-22,0909816	0,10674997
X4_DG_length	0,17681485	0,1536405	0,17856709	0,18935223	0,11733637	0,1347637	-13,274491	0,38534035	-13,274491	0,38534035
X4_DG_avgcellarea									0	1,1
X4_DG_cellarea									0	1,1
X4_DG_cellcount									0	1,1
X4_DG_celldens									0	1,1
X4_DG_cellcirc									0	1,1
X4_DG_cellsol									0	1,1
X4_fi_area	0,00504197	0,00511175	0,00456561	0,00378753	0,00439998	0,00330056	-21,9525617	0,04072693	-21,9525617	0,04072693
X4_fi_avgcellarea	6,6208E-07	6,046E-07	4,5897E-07	6,7526E-07	6,4137E-07	4,6787E-07	3,41033354	0,83489121	3,41033354	0,83489121
X4_fi_cellarea	0,00049523	0,00058949	0,00026391	0,00045715	0,00039637	0,00022317	-20,164004	0,49020211	-20,164004	0,49020211
X4_fi_cellcount	748	975	575	677	618	477	-22,8894691	0,24913094	-22,8894691	0,24913094
X4_fi_celldens	148354,74	190737,027	125941,522	178744,648	140455,216	144521,149	-0,28219006	0,98545092	-0,28219006	0,98545092
X4_fi_cellcirc	0,70865473	0,66982309	0,81071861	0,67024699	0,74638069	0,8131899	1,85552801	0,82948755	1,85552801	0,82948755
X4_fi_cellsol	0,85047304	0,8271097	0,88679194	0,83211392	0,86719814	0,88773518	0,88413613	0,76646796	0,88413613	0,76646796
X4_aca_area	0,00138674	0,00127214	0,00131076	0,00084108	0,00065751	0,00104874	-35,8294493	0,01585553	-35,8294493	0,01585553
X4_aca_avgcellarea	6,3977E-07	2,8173E-07	4,3254E-07	4,6329E-07	3,9965E-07	3,8195E-07	-8,0611249	0,75022557	-8,0611249	0,75022557
X4_aca_cellarea	0,00016442	4,5641E-05	9,3861E-05	6,0228E-05	4,7958E-05	7,2188E-05	-40,6512197	0,30687725	-40,6512197	0,30687725
X4_aca_cellcount	257	162	217	130	120	189	-30,9748428	0,13348734	-30,9748428	0,13348734
X4_aca_celldens	185327,406	127344,375	165553,062	154562,813	182505,62	180216,26	8,16767489	0,53552472	8,16767489	0,53552472
X4_aca_cellcirc	0,72373903	0,81729069	0,80160718	0,75727022	0,77847963	0,82502608	0,77429994	0,87186059	0,77429994	0,87186059

X4_aca_cellsol	0,8556 6713	0,8697 3935	0,8779 5375	0,8644 2005	0,8676 7444	0,8857 905	0,55792 398	0,6302 2427	0,55792 398	0,6302 2427
X4_sm_area	0,0040 859	0,0012 3633	0,0031 2149	0,0026 48	0,0026 72	0,0034 1275	3,42299 406	0,9174 9988	3,42299 406	0,9174 9988
X4_sm_avgcell area	8,1082 E-07	3,473E-07	4,0669 E-07	8,178E-07	6,9598 E-07	5,156E-07	29,6880 068	0,4139 5223	29,6880 068	0,4139 5223
X4_sm_cellare a	0,0005 0838	4,3413 E-05	0,0001 7081	0,0004 6533	0,0003 3059	0,0002 6657	47,0346 219	0,4936 8432	47,0346 219	0,4936 8432
X4_sm_cellco unt	627	125	420	569	475	517	33,1911 263	0,4309 1213	33,1911 263	0,4309 1213
X4_sm_celldе ns	153454 ,563	101105 ,774	134551 ,128	214879 ,154	177769 ,594	151490 ,778	39,8415 558	0,0968 8451	39,8415 558	0,0968 8451
X4_sm_cellcirc	0,6905 1206	0,7592 1153	0,8059 107	0,6389 3494	0,7314 2793	0,7928 6981	- 4,09647 972	0,6109 5572	- 4,09647 972	0,6109 5572
X4_sm_cellsol	0,8486 1891	0,8687 3994	0,8848 1177	0,8225 6883	0,8685 5807	0,8905 5379	- 0,78741 643	0,7775 5548	- 0,78741 643	0,7775 5548
X4_f_area	0,0010 3081	0,0009 1876	0,0006 0565	0,0010 2099	0,0009 2257	0,0008 0364	7,51312 41	0,6753 7523	7,51312 41	0,6753 7523
X4_f_avgcellar ea	8,1188 E-07	4,9649 E-07	3,7035 E-07	7,7484 E-07	3,9329 E-07	7,6805 E-07	15,3363 268	0,6618 7811	15,3363 268	0,6618 7811
X4_f_cellarea	9,4178 E-05	3,4754 E-05	1,9999 E-05	8,2133 E-05	4,4048 E-05	8,5253 E-05	41,9677 569	0,4719 0815	41,9677 569	0,4719 0815
X4_f_cellcount	116	70	54	106	112	111	37,0833 333	0,1873 6511	37,0833 333	0,1873 6511
X4_f_celldens	112532 ,426	76189, 7298	89160, 5534	103820 ,7	121400 ,265	138121 ,547	30,7539 117	0,1214 9034	30,7539 117	0,1214 9034
X4_f_cellcirc	0,7472 4321	0,8172 0818	0,7904 7111	0,7564 7338	0,8005 736	0,7556 32	- 1,79383 904	0,6063 1635	- 1,79383 904	0,6063 1635
X4_f_cellsol	0,8761 7192	0,8918 9629	0,8710 5482	0,8809 0326	0,8770 6751	0,8796 8295	- 0,05567 448	0,9424 2367	- 0,05567 448	0,9424 2367
X4_och_area		0,0008 7354	0,0007 9779	0,0005 1213	0,0003 0703	0,0006 7214	- 40,5145 603	0,0932 9076	- 40,5145 603	0,0932 9076
X4_och_avgcel larea		2,4893 E-07	2,3983 E-07	2,308E-07	2,5831 E-07	2,2532 E-07	- 2,55198 629	0,6779 2927	- 2,55198 629	0,6779 2927
X4_och_cellar ea		2,8627 E-05	3,1897 E-05	1,1309 E-05	1,3174 E-05	1,8476 E-05	- 52,6810 301	0,0133 4752	- 52,6810 301	0,0133 4752
X4_och_cellco unt		115	133	49	51	82	- 51,0752 688	0,0257 5442	- 51,0752 688	0,0257 5442
X4_och_celldе ns		131648 ,688	166709 ,911	95679, 2052	166105 ,382	121999 ,301	- 14,2454 997	0,5242 2696	- 14,2454 997	0,5242 2696
X4_och_cellcir c		0,8366 5858	0,8051 9686	0,8912 6048	0,7992 9123	0,8993 9305	5,16332 962	0,3975 6153	5,16332 962	0,3975 6153
X4_och_cellsol		0,8848 9161	0,8731 2111	0,9030 0052	0,8701 7932	0,9078 9661	1,67072 633	0,4238 9452	1,67072 633	0,4238 9452
X4_VMHvl_ar ea	0,0026 2672	0,0015 5	0,0025 5632	0,0029 3	0,0029 22	0,0017 9	13,5000 446	0,5873 2578	13,5000 446	0,5873 2578

X4_VMHvl_avgcellarea	1067910,89	1227230,68	1157182,48	949714,323	903449,689	1781395,47	5,2786304	0,84376592	5,2786304	0,84376592
X4_VMHvl_cellarea	596	337	655	560	692	411	4,72292191	0,85352966	4,72292191	0,85352966
X4_VMHvl_cellcount	0,0005581	0,0002746	0,00056603	0,00058965	0,00076595	0,00023072	13,4115137	0,75152905	13,4115137	0,75152905
X4_VMHvl_celldens	0,21247025	0,17716258	0,22142368	0,20124608	0,26213313	0,12889274	-3,0741129	0,88549302	-3,0741129	0,88549302
X4_VMHvl_cellcirc	0,75453318	0,78422481	0,79870686	0,73337671	0,77117452	0,7903368	-1,8214955	0,53970334	-1,8214955	0,53970334
X4_VMHvl_cellsol	0,88444736	0,89453361	0,89718541	0,87205991	0,89282156	0,89152663	-0,7383052	0,44360538	-0,7383052	0,44360538
X4_Pn_area	0,00366119	0,0034923	0,0030453	0,00324633	0,003979	0,00310012	1,24193164	0,90383427	1,24193164	0,90383427
X4_Pn_avgcellarea	8,012E-07	6,5931E-07	5,9673E-07	8,8136E-07	7,7995E-07	9,1615E-07	25,2874607	0,07634219	25,2874607	0,07634219
X4_Pn_cellarea	0,00068503	0,0004813	0,00040518	0,00054292	0,00062162	0,00059642	12,0555213	0,5067279	12,0555213	0,5067279
X4_Pn_cellcount	855	730	679	616	797	651	-8,8339226	0,43099746	-8,8339226	0,43099746
X4_Pn_celldens	233530,628	209031,238	222966,612	189752,678	200301,432	209992,007	-9,8391523	0,07643303	-9,8391523	0,07643303
X4_Pn_cellcirc	0,73389392	0,75798986	0,76289604	0,73952424	0,74879316	0,76974395	0,14553647	0,9352875	0,14553647	0,9352875
X4_Pn_cellsol	0,86664597	0,87862223	0,87702211	0,86907683	0,87114443	0,88569665	0,13833686	0,86014584	0,13833686	0,86014584
X4_SN_area	0,00156777	0,0019625	0,00172755	0,00121898	0,00264991	0,00164026	4,78029281	0,85818528	4,78029281	0,85818528
X4_SN_avgcellarea	5,729E-07	4,3822E-07	5,4605E-07	4,6477E-07	5,8544E-07	5,8201E-07	4,82029005	0,68416803	4,82029005	0,68416803
X4_SN_cellarea	0,00011172	6,7924E-05	9,5012E-05	4,5083E-05	0,00019202	0,00011291	27,4406429	0,60124584	27,4406429	0,60124584
X4_SN_cellcount	195	155	174	97	328	194	18,129771	0,66547469	18,129771	0,66547469
X4_SN_celldens	124380,41	78981,0929	100720,674	79574,4653	123777,695	118274,004	5,76948907	0,77488853	5,76948907	0,77488853
X4_SN_cellcirc	0,76252953	0,78760384	0,78159718	0,80159332	0,78284542	0,7888597	1,78270538	0,21303167	1,78270538	0,21303167
X4_SN_cellsol	0,87624481	0,88190773	0,88038898	0,8825074	0,88492637	0,88492161	0,52354173	0,06993115	0,52354173	0,06993115
X4_fp_area	0,00472024	0,00443712	0,00543894	0,00344119	0,00192995	0,0063433	-19,7437609	0,50974567	-19,7437609	0,50974567
X4_fp_avgcellarea	4,6702E-07	3,7213E-07	4,1239E-07	4,6107E-07	4,3878E-07	4,4238E-07	7,24569643	0,3463981	7,24569643	0,3463981
X4_fp_cellarea	0,00034606	0,00015109	0,00028043	0,0001457	9,1705E-05	0,00035966	-23,2152824	0,57934023	-23,2152824	0,57934023
X4_fp_cellcount	741	406	680	316	209	813	-26,7651888	0,48618843	-26,7651888	0,48618843

X4_fp_celldens	156983,643	91500,8552	125024,407	91828,7788	108293,017	128166,747	-12,1069034	0,52421658	-12,1069034	0,52421658
X4_fp_cellcirc	0,72130456	0,80094953	0,77361082	0,79117015	0,77470427	0,77281631	1,86534577	0,58520598	1,86534577	0,58520598
X4_fp_cellsol	0,84631014	0,87741633	0,86848928	0,87687511	0,86748402	0,87089232	0,88864922	0,47058045	0,88864922	0,47058045
X4_Cg_area	0,00532538	0,00490335	0,00599936	0,00436993	0,00306372	0,00559843	-19,6943385	0,2529828	-19,6943385	0,2529828
X4_Cg_height	0,09109542	0,0994762	0,09610105	0,09127761	0,10822136	0,10220906	5,24478412	0,4156375	5,24478412	0,4156375
X4_Cg_avgcellarea	8,1098E-07	7,4903E-07	5,9049E-07	6,9008E-07	6,5383E-07	6,8478E-07	-5,66358318	0,57518025	-5,66358318	0,57518025
X4_Cg_cellarea	0,00085396	0,00073629	0,00068851	0,00064246	0,00043022	0,00068958	-22,6656702	0,1400202	-22,6656702	0,1400202
X4_Cg_cellcount	1053	983	1166	931	658	1007	-18,9256715	0,16378855	-18,9256715	0,16378855
X4_Cg_celldens	197732,554	200475,144	194354,097	213047,135	214771,655	179871,953	2,5531426	0,68349724	2,5531426	0,68349724
X4_Cg_cellcirc	0,76477753	0,78939899	0,79751762	0,74891789	0,79142016	0,77961013	-1,34991891	0,54551826	-1,34991891	0,54551826
X4_Cg_cellsol	0,88076343	0,8899939	0,88836737	0,86850579	0,8863738	0,88398335	-0,761971	0,34280484	-0,761971	0,34280484
X4_DS_area	0,00100713	0,00075776	0,00068717	0,00097469	0,00083958	0,00090343	10,8334856	0,44493808	10,8334856	0,44493808
X4_DS_avgcellarea	7,1299E-07	8,3873E-07	6,551E-07	8,2446E-07	7,8429E-07	8,3572E-07	10,7685858	0,23288454	10,7685858	0,23288454
X4_DS_cellarea	0,00013119	0,00010568	8,3853E-05	0,00011542	0,00010823	0,00013288	11,165987	0,48453078	11,165987	0,48453078
X4_DS_cellcount	184	126	128	140	138	159	-0,2283105	0,98759511	-0,2283105	0,98759511
X4_DS_celldens	182697,005	166280	186270,144	143634,823	164367,115	175995,927	-9,57488223	0,20478844	-9,57488223	0,20478844
X4_DS_cellcirc	0,74094891	0,75028537	0,76929838	0,74927787	0,76941499	0,76521002	1,03383678	0,49364605	1,03383678	0,49364605
X4_DS_cellsol	0,86932878	0,87737883	0,87838332	0,8784056	0,88246244	0,88476219	0,78242246	0,11549938	0,78242246	0,11549938
X4_InfC_area	0,00853052	0,00843281	0,00796834	0,00830059	0,00697986	0,00818778	-5,84850206	0,34824258	-5,84850206	0,34824258
X4_InfC_avgcellarea	8,4286E-07	6,6021E-07	6,9413E-07	7,9949E-07	6,4191E-07	6,9791E-07	-2,63483813	0,80357152	-2,63483813	0,80357152
X4_InfC_cellarea	0,00144297	0,00119696	0,00109951	0,00139592	0,00097313	0,00127857	-2,45560636	0,85954389	-2,45560636	0,85954389

X4_InfC_cellcount	1712	1813	1584	1746	1516	1832	-0,29359953	0,96748103	-0,29359953	0,96748103
X4_InfC_celldens	200691,142	214993,579	198786,823	210211,993	217196,489	223748,046	5,97016811	0,13027463	5,97016811	0,13027463
X4_InfC_cellcirc	0,76484149	0,7783416	0,78434716	0,75957044	0,77457682	0,78696608	-0,27569648	0,83787444	-0,27569648	0,83787444
X4_InfC_cellsol	0,88693268	0,88713489	0,88847952	0,88191176	0,88400426	0,89229323	-0,16292069	0,67542208	-0,16292069	0,67542208
X4_SupC_area	0,045067771	0,044355796	0,045122958	0,048500375	0,053766768	0,050009222	13,2350188	0,01976021	13,2350188	0,01976021
X4_SupC_avgcellarea	6,0222E-07	5,0175E-07	7,1162E-07	9,8147E-07	8,0913E-07	6,7196E-07	35,6327333	0,11684404	35,6327333	0,11684404
X4_SupC_cellarea	0,00304184	0,00269643	0,00486537	0,00753669	0,00738732	0,00530443	90,7689872	0,0312435	90,7689872	0,0312435
X4_SupC_cellcount	5051	5374	6837	7679	9130	7894	43,1062449	0,02521994	43,1062449	0,02521994
X4_SupC_celldens	112075,798	121150,758	151497,106	158317,656	169804,599	157589,333	26,2494709	0,05520456	26,2494709	0,05520456
X4_SupC_cellcirc	0,74554177	0,7510424	0,77677241	0,75122504	0,77552728	0,79089964	1,94845734	0,38166083	1,94845734	0,38166083
X4_SupC_cellsol	0,86412962	0,86061588	0,88418491	0,88119863	0,88682095	0,88911349	1,84760267	0,10549645	1,84760267	0,10549645

Supplementary Table 3: Statistics

panel	Figure 1 : Generation of KIF2A Flex II mice	
1-c	Rosa	
	Column B	KIF2A +/H321D Rosa cre
	vs.	vs,
	Column A	KIF2A +/Flex
	Unpaired t test	
	P value	0,0021
	P value summary	**
	Significantly different (P < 0.05)?	Yes
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
	t, df	t=7,079 df=4
	How big is the difference?	
	Mean ± SEM of column A	100 ± 3,181, n=3
	Mean ± SEM of column B	50,25 ± 6,266, n=3
	Difference between means	-49,75 ± 7,027
	95% confidence interval	-69,26 to -30,24
	R squared (eta squared)	0,9261
	F test to compare variances	
	F, DFn, Dfd	3,88, 2, 2
	P value	0,4098
	P value summary	ns
	Significantly different (P < 0.05)?	No
	Nestin	
	Column B	KIF2A +/H321D Nestin cre
	vs.	vs,
	Column A	KIF2A +/Flex
	Unpaired t test	
	P value	0,0102
	P value summary	*
	Significantly different (P < 0.05)?	Yes
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
	t, df	t=4,576 df=4
	How big is the difference?	
	Mean ± SEM of column A	100 ± 7,41, n=3
	Mean ± SEM of column B	59,24 ± 4,943, n=3
	Difference between means	-40,76 ± 8,908
	95% confidence interval	-65,49 to -16,03
	R squared (eta squared)	0,8396
	F test to compare variances	
	F, DFn, Dfd	2,247, 2, 2
	P value	0,6159
	P value summary	ns
	Significantly different (P < 0.05)?	No
1-d	Rosa	
	Table Analyzed	
	Column B	KIF2A +/H321D Rosa cre
	vs.	vs,
	Column A	KIF2A +/Flex
	Mann Whitney test	
	P value	>0,9999
	Exact or approximate P value?	Exact
	P value summary	ns
	Significantly different (P < 0.05)?	No
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
	Sum of ranks in column A,B	11 , 10
	Mann-Whitney U	4
	Difference between medians	
	Median of column A	82,93, n=3
	Median of column B	85,36, n=3
	Difference: Actual	2,426
	Difference: Hodges-Lehmann	-3,95
	Nestin	
	Table Analyzed	
	Column B	KIF2A +/H321D Nestin cre
	vs.	vs,
	Column A	KIF2A +/Flex
	Mann Whitney test	
	P value	0,8571
	Exact or approximate P value?	Exact
	P value summary	ns
	Significantly different (P < 0.05)?	No
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
	Sum of ranks in column A,B	11 , 17
	Mann-Whitney U	5
	Difference between medians	
	Median of column A	74,58, n=3
	Median of column B	84,4, n=4
	Difference: Actual	9,826
	Difference: Hodges-Lehmann	6,651
panel	**Figure 2 : Adult KIF2A+/H321D mice present with neuroanatomical and behavioral anomalies.**	
2-a	Rosa	
	Column B	KIF2A +/H321D ROSA cre
	vs.	vs,
	Column A	KIF2A +/Flex

	Unpaired t test	
	P value	<0,0001
	P value summary	****
	Significantly different (P < 0.05)?	Yes
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
	t, df	t=4,884 df=26
	How big is the difference?	
	Mean ± SEM of column A	28,71 ± 0,8774, n=15
	Mean ± SEM of column B	23,07 ± 0,717, n=13
	Difference between means	-5,644 ± 1,156
	95% confidence interval	-8,02 to -3,269
	R squared (eta squared)	0,4784
	F test to compare variances	
	F, DFn, Dfd	1,728, 14, 12
	P value	0,3484
	P value summary	ns
	Significantly different (P < 0.05)?	No
	Nestin	
	Table Analyzed	
	Column B	KIF2A +/H321D NestinCre
	vs.	vs,
	Column A	KIF2A +/Flex
	Unpaired t test	
	P value	0,0083
	P value summary	**
	Significantly different (P < 0.05)?	Yes
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
	t, df	t=3,479 df=8
	How big is the difference?	
	Mean ± SEM of column A	29,42 ± 1,924, n=5
	Mean ± SEM of column B	22,04 ± 0,8925, n=5
	Difference between means	-7,38 ± 2,121
	95% confidence interval	-12,27 to -2,488
	R squared (eta squared)	0,6021
	F test to compare variances	
	F, DFn, Dfd	4,649, 4, 4
	P value	0,1658
	P value summary	ns
	Significantly different (P < 0.05)?	No
2-g	Distance open field	
	Table Analyzed	Distance OF
	Two-way ANOVA	Ordinary
	Alpha	0,05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	0,7099	0,9369	ns	No
Row Factor	9,164	0,0001	***	Yes
Column Factor	35,28	<0,0001	****	Yes

ANOVA table	SS (Type III)	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	213508	5	42702	F (5, 96) = 0,254	P=0,9369
Row Factor	2755977	1	2755977	F (1, 96) = 16,39	P=0,0001
Column Factor	10610304	5	2122061	F (5, 96) = 12,62	P<0,0001
Residual	16140695	96	168132		

Compare each cell mean with the other cell mean in that column

Number of families	1
Number of comparisons per family	6
Alpha	0,05

Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D ROSAcre					
T=5	-163,2	-685,7 to 359,3	No	ns	0,955
T=10	-370,3	-892,8 to 152,2	No	ns	0,31
T=15	-379,2	-901,7 to 143,3	No	ns	0,284
T=20	-245,2	-767,7 to 277,3	No	ns	0,758
T=25	-425,9	-948,4 to 96,6	No	ns	0,172
T=30	-345,1	-867,6 to 177,4	No	ns	0,391

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D ROSAcre								
T=5	2236	2399	-163,2	194,5	10	8	0,839	96
T=10	1721	2091	-370,3	194,5	10	8	1,904	96
T=15	1586	1965	-379,2	194,5	10	8	1,95	96
T=20	1521	1766	-245,2	194,5	10	8	1,26	96
T=25	1276	1702	-425,9	194,5	10	8	2,19	96
T=30	1165	1510	-345,1	194,5	10	8	1,774	96

	Distance total open field	
	Table Analyzed	Distance OF totale
	Column B	KIF2A +/H321D ROSAcre
	vs.	vs,
	Column A	KIF2A +/Flex
	Unpaired t test	
	P value	0,0491
	P value summary	*
	Significantly different (P < 0.05)?	Yes
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
	t, df	t=2,129 df=16

	How big is the difference?	
	Mean ± SEM of column A	9504 ± 722,5, n=10
	Mean ± SEM of column B	11433 ± 450,9, n=8
	Difference between means	1929 ± 906
	95% confidence interval	8,278 to 3849
	R squared (eta squared)	0,2208
	F test to compare variances	
	F, DFn, Dfd	3,209, 9, 7
	P value	0,1384
	P value summary	ns
	Significantly different (P < 0.05)?	No
	Rear Open Field	
	Table Analyzed	Rear OF
	Two-way ANOVA	Ordinary
	Alpha	0,05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	0,2171	0,9978	ns	No
Row Factor	11,69	0,0002	***	Yes
Column Factor	15,24	0,0023	**	Yes

ANOVA table	SS (Type III)	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	125,8	5	25,17	F (5, 96) = 0,05736	P=0,9978
Row Factor	6777	1	6777	F (1, 96) = 15,45	P=0,0002
Column Factor	8831	5	1766	F (5, 96) = 4,026	P=0,0023
Residual	42122	96	438,8		

Compare each cell mean with the other cell mean in that column

Number of families	1
Number of comparisons per family	6
Alpha	0,05

Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D ROSAcre					
T=5	-12,33	-39,02 to 14,37	No	ns	0,771
T=10	-18,83	-45,52 to 7,867	No	ns	0,315
T=15	-15,28	-41,97 to 11,42	No	ns	0,559
T=20	-16,85	-43,54 to 9,842	No	ns	0,444
T=25	-17,85	-44,54 to 8,842	No	ns	0,376
T=30	-14,53	-41,22 to 12,17	No	ns	0,615

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D ROSAcre								
T=5	43,3	55,63	-12,33	9,936	10	8	1,24	96
T=10	44,8	63,63	-18,83	9,936	10	8	1,895	96
T=15	42,1	57,38	-15,28	9,936	10	8	1,537	96
T=20	32,9	49,75	-16,85	9,936	10	8	1,696	96
T=25	25,9	43,75	-17,85	9,936	10	8	1,797	96
T=30	21,1	35,63	-14,53	9,936	10	8	1,462	96

	Rear total Open Field	
	Table Analyzed	Rear total
	Column B	KIF2A +/H321D ROSAcre
	vs.	vs,
	Column A	KIF2A +/Flex
	Unpaired t test	
	P value	0,0656
	P value summary	ns
	Significantly different (P < 0.05)?	No
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
	t, df	t=1,977 df=16
	How big is the difference?	
	Mean ± SEM of column A	210,1 ± 35,37, n=10
	Mean ± SEM of column B	305,8 ± 31,03, n=8
	Difference between means	95,65 ± 48,39
	95% confidence interval	-6,934 to 198,2
	R squared (eta squared)	0,1963
	F test to compare variances	
	F, DFn, Dfd	1,624, 9, 7
	P value	0,5352
	P value summary	ns
	Significantly different (P < 0.05)?	No
2-h	Novel object recognition	
	Acquisition	
	Table Analyzed	Temps explo acquis
	Column B	KIF2A +/H321D ROSAcre
	vs.	vs,
	Column A	KIF2A +/Flex
	Unpaired t test	
	P value	0,5197
	P value summary	ns
	Significantly different (P < 0.05)?	No
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
	t, df	t=0,6583 df=16
	How big is the difference?	
	Mean ± SEM of column A	10,83 ± 2,31, n=10
	Mean ± SEM of column B	13,51 ± 3,542, n=8
	Difference between means	2,685 ± 4,078
	95% confidence interval	-5,961 to 11,33
	R squared (eta squared)	0,02637
	F test to compare variances	
	F, DFn, Dfd	1,88, 7, 9

	P value	0,3718							
	P value summary	ns							
	Significantly different (P < 0.05)?	No							
	Retention								
	Table Analyzed	Obj explo ret							
	Two-way ANOVA	Ordinary							
	Alpha	0,05							
	Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?				
	Interaction	4,081	0,2167	ns	No				
	Row Factor	13,88	0,0269	*	Yes				
	Column Factor	4,199	0,2104	ns	No				
	ANOVA table	SS (Type III)	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value			
	Interaction	12,37	1	12,37	F (1, 30) = 1,592	P=0,2167			
	Row Factor	42,06	1	42,06	F (1, 30) = 5,415	P=0,0269			
	Column Factor	12,73	1	12,73	F (1, 30) = 1,638	P=0,2104			
	Residual	233	30	7,767					
	Compare each cell mean with the other cell mean in that column								
	Number of families	1							
	Number of comparisons per family	2							
	Alpha	0,05							
	Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
	Familiar object - Novel object								
	KIF2A +/Flex	-3,437	-6,529 to -0,3441	Yes	*	0,027			
	KIF2A +/H321D ROSAcre	-1,02	-4,3 to 2,26	No	ns	0,719			
	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
	Familiar object - Novel object								
	KIF2A +/Flex	4,061	7,498	-3,437	1,314	9	9	2,616	30
	KIF2A +/H321D ROSAcre	4,044	5,064	-1,02	1,394	8	8	0,732	30
	Recognition index								
	Table Analyzed	Reco Index							
	Column B	KIF2A +/H321D ROSAcre							
	vs.	vs,							
	Column A	KIF2A +/Flex							
	Unpaired t test								
	P value	0,105							
	P value summary	ns							
	Significantly different (P < 0.05)?	No							
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed							
	t, df	t=1,725 df=15							
	How big is the difference?								
	Mean ± SEM of column A	66,08 ± 2,583, n=9							
	Mean ± SEM of column B	57,87 ± 4,135, n=8							
	Difference between means	-8,206 ± 4,757							
	95% confidence interval	-18,35 to 1,933							
	R squared (eta squared)	0,1656							
	F test to compare variances								
	F, DFn, Dfd	2,279, 7, 8							
	P value	0,2713							
	P value summary	ns							
	Significantly different (P < 0.05)?	No							
2-i	Y maze								
	Latency								
	Table Analyzed	Latency							
	Column B	KIF2A +/H321D ROSAcre							
	vs.	vs,							
	Column A	KIF2A +/Flex							
	Unpaired t test								
	P value	0,2214							
	P value summary	ns							
	Significantly different (P < 0.05)?	No							
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed							
	t, df	t=1,276 df=15							
	How big is the difference?								
	Mean ± SEM of column A	8,7 ± 0,5972, n=10							
	Mean ± SEM of column B	30,71 ± 20,9, n=7							
	Difference between means	22,01 ± 17,25							
	95% confidence interval	-14,76 to 58,79							
	R squared (eta squared)	0,09792							
	F test to compare variances								
	F, DFn, Dfd	857,5, 6, 9							
	P value	<0,0001							
	P value summary	****							
	Significantly different (P < 0.05)?	Yes							
	% SPA								
	Table Analyzed	%SPA							
	Column B	KIF2A +/H321D ROSAcre							
	vs.	vs,							
	Column A	KIF2A +/Flex							
	Unpaired t test								
	P value	0,0166							
	P value summary	*							
	Significantly different (P < 0.05)?	Yes							
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed							
	t, df	t=2,695 df=15							
	How big is the difference?								

Mean ± SEM of column A	79,84 ± 1,856, n=10	
Mean ± SEM of column B	68,95 ± 4,077, n=7	
Difference between means	-10,89 ± 4,041	
95% confidence interval	-19,5 to -2,277	
R squared (eta squared)	0,3262	
F test to compare variances		
F, DFn, Dfd	3,376, 6, 9	
P value	0,0998	
P value summary	ns	
Significantly different (P < 0.05)?	No	

panel 4-b — Figure 4 : KIF2A+/H321D mice present cortical layering anomalies.

Layer Nestin E18

Table Analyzed	Layer 1				
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Interaction	7,643	<0,0001	****	Yes	
Row Factor	1,373	0,004	**	Yes	
Column Factor	71,15	<0,0001	****	Yes	

ANOVA table	SS (Type III)	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	321,5	2	160,7	F (2, 18) = 30,21	P<0,0001
Row Factor	57,77	1	57,77	F (1, 18) = 10,86	P=0,0040
Column Factor	2993	2	1497	F (2, 18) = 281,3	P<0,0001
Residual	95,77	18	5,321		

Compare each cell mean with the other cell mean in that column

Number of families	1				
Number of comparisons per family	3				
Alpha	0,05				
Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nestin cre					
Layer II-IV	-4,705	-9,137 to -0,273	Yes	*	0,036
Layer V	-11,62	-16,05 to -7,19	Yes	****	<0,0001
Layer VI	6,713	2,281 to 11,15	Yes	**	0,003

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nestin cre								
Layer II-IV	28,65	33,35	-4,705	1,685	5	3	2,793	18
Layer V	18,61	30,23	-11,62	1,685	5	3	6,899	18
Layer VI	54,86	48,15	6,713	1,685	5	3	3,985	18

Cortical thickness E18

Table Analyzed	Cortical thickness
Column B	KIF2A +/H321D Nestin cre
vs.	vs,
Column A	KIF2A +/Flex
Unpaired t test	
P value	0,4073
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0,8909 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	413,8 ± 13,33, n=5
Mean ± SEM of column B	395,2 ± 15,09, n=3
Difference between means	-18,62 ± 20,91
95% confidence interval	-69,78 to 32,53
R squared (eta squared)	0,1168
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	1,3, 4, 2
P value	0,9566
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No

Density CTIP2 E18

Table Analyzed	Density CTIP2
Column B	KIF2A +/H321D Nestin cre
vs.	vs,
Column A	KIF2A +/Flex
Unpaired t test	
P value	0,0001
P value summary	***
Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=8,7 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	41,33 ± 1,215, n=5
Mean ± SEM of column B	26,62 ± 0,6597, n=3
Difference between means	-14,7 ± 1,69
95% confidence interval	-18,84 to -10,57
R squared (eta squared)	0,9266
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	5,651, 4, 2
P value	0,3119
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No

4-d Layer Nestin P2

	Table Analyzed	Two-way ANOVA , not RM							
	Two-way ANOVA	Ordinary							
	Alpha	0,05							
	Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?				
	Interaction	9,739	0,0252	*	Yes				
	Row Factor	5,584	0,0339	*	Yes				
	Column Factor	75,44	<0,0001	****	Yes				
	ANOVA table	SS (Type III)	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value			
	Interaction	110,5	2	55,23	F (2, 15) = 4,752	P=0,0252			
	Row Factor	63,33	1	63,33	F (1, 15) = 5,449	P=0,0339			
	Column Factor	855,6	2	427,8	F (2, 15) = 36,81	P<0,0001			
	Residual	174,3	15	11,62					
	Compare each cell mean with the other cell mean in that column								
	Number of families	1							
	Number of comparisons per family	3							
	Alpha	0,05							
	Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
	KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nestin cre								
	Layer II-IV	1,097	-5,895 to 8,088	No	ns	0,967			
	Layer V	-9,85	-16,84 to -2,859	Yes	**	0,005			
	Layer VI	-1,774	-8,765 to 5,218	No	ns	0,88			
	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
	KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nestin cre								
	Layer II-IV	43,29	42,2	1,097	2,604	3	4	0,421	15
	Layer V	22,68	32,53	-9,85	2,604	3	4	3,783	15
	Layer VI	38,2	39,97	-1,774	2,604	3	4	0,681	15
	Cortical thickness P2								
	Table Analyzed	Cortical thickness							
	Column B	KIF2A +/H321D Nestin cre							
	vs.	vs,							
	Column A	KIF2A +/Flex							
	Unpaired t test								
	P value	0,2465							
	P value summary	ns							
	Significantly different (P < 0.05)?	No							
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed							
	t, df	t=1,312 df=5							
	How big is the difference?								
	Mean ± SEM of column A	484,3 ± 31,83, n=3							
	Mean ± SEM of column B	530,7 ± 19,64, n=4							
	Difference between means	46,38 ± 35,34							
	95% confidence interval	-44,48 to 137,2							
	R squared (eta squared)	0,2562							
	F test to compare variances								
	F, DFn, Dfd	1,97, 2, 3							
	P value	0,5684							
	P value summary	ns							
	Significantly different (P < 0.05)?	No							
4-e	EDU Nestin								
	Table Analyzed	Two-way ANOVA , not RM							
	Two-way ANOVA	Ordinary							
	Alpha	0,05							
	Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?				
	Interaction	3,776	<0,0001	****	Yes				
	Row Factor	0	>0,9999	ns	No				
	Column Factor	93,38	<0,0001	****	Yes				
	ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value			
	Interaction	111,2	9	12,36	F (9, 40) = 5,891	P<0,0001			
	Row Factor	0	1	0	F (1, 40) = 0	P>0,9999			
	Column Factor	2750	9	305,5	F (9, 40) = 145,7	P<0,0001			
	Residual	83,89	40	2,097					
	Compare each cell mean with the other cell mean in that column								
	Number of families	1							
	Number of comparisons per family	10							
	Alpha	0,05							
	Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
	KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nestin cre								
	Bin 1	-0,5911	-4,094 to 2,912	No	ns	>0,9999			
	Bin 2	-1,456	-4,959 to 2,047	No	ns	0,922			
	Bin 3	-4,316	-7,82 to -0,8133	Yes	**	0,008			
	Bin 4	-1,303	-4,806 to 2,2	No	ns	0,961			
	Bin 5	-0,5332	-4,036 to 2,97	No	ns	>0,9999			
	Bin 6	-1,098	-4,601 to 2,405	No	ns	0,988			
	Bin 7	0,06514	-3,438 to 3,568	No	ns	>0,9999			
	Bin 8	-0,2125	-3,716 to 3,291	No	ns	>0,9999			
	Bin 9	6,334	2,831 to 9,837	Yes	****	<0,0001			
	Bin 10	3,111	-0,3921 to 6,614	No	ns	0,114			
	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
	KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nestin cre								
	Bin 1	4,113	4,704	-0,5911	1,182	3	3	0,5	40
	Bin 2	6,292	7,748	-1,456	1,182	3	3	1,231	40
	Bin 3	9,088	13,4	-4,316	1,182	3	3	3,65	40
	Bin 4	5,843	7,146	-1,303	1,182	3	3	1,102	40
	Bin 5	5,242	5,775	-0,5332	1,182	3	3	0,451	40
	Bin 6	5,303	6,401	-1,098	1,182	3	3	0,928	40

	Bin 7	7,671	7,606	0,06514	1,182	3	3	0,055	40	
	Bin 8	11,65	11,87	-0,2125	1,182	3	3	0,18	40	
	Bin 9	32,06	25,72	6,334	1,182	3	3	5,357	40	
	Bin 10	12,74	9,627	3,111	1,182	3	3	2,631	40	
4-f	Neuronal polarity									
	Table Analyzed	Data 1								
	Two-way ANOVA	Ordinary								
	Alpha	0,05								
	Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?					
	Interaction	34,95	<0,0001	****	Yes					
	Row Factor	7,2E-13	>0,9999	ns	No					
	Column Factor	70,65	<0,0001	****	Yes					
	ANOVA table	SS (Type III)	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value				
	Interaction	1788	2	893,8	F (2, 15) = 45,32	P<0,0001				
	Row Factor	3,68E-11	1	3,683E-11	F (1, 15) = 1,868e-012	P>0,9999				
	Column Factor	3613	2	1806	F (2, 15) = 91,59	P<0,0001				
	Residual	295,9	15	19,72						
	Compare each cell mean with the other cell mean in that column									
	Number of families	1								
	Number of comparisons per family	3								
	Alpha	0,05								
	Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary					
	WT - KIF2A H321D									
	Multipolar	-15,17	-24,28 to -6,064	Yes	**					
	Round	-11,09	-20,2 to -1,98	Yes	*					
	Bipolar	26,26	17,15 to 35,37	Yes	****					
	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF	
	WT - KIF2A H321D									
	Multipolar	10,3	25,47	-15,17	3,392	3	4	4,473	15	
	Round	26,33	37,42	-11,09	3,392	3	4	3,269	15	
	Bipolar	63,38	37,12	26,26	3,392	3	4	7,742	15	
4-h	Layer Nex E18									
	Table Analyzed	Two-way ANOVA , not RM								
	Two-way ANOVA	Ordinary								
	Alpha	0,05								
	Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?					
	Interaction	2,42	0,0004	***	Yes					
	Row Factor	1,065	0,0024	**	Yes					
	Column Factor	95,64	<0,0001	****	Yes					
	ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value				
	Interaction	87,01	2	43,51	F (2, 12) = 16,59	P=0,0004				
	Row Factor	38,28	1	38,28	F (1, 12) = 14,6	P=0,0024				
	Column Factor	3439	2	1719	F (2, 12) = 655,6	P<0,0001				
	Residual	31,47	12	2,623						
	Compare each cell mean with the other cell mean in that column									
	Number of families	1								
	Number of comparisons per family	3								
	Alpha	0,05								
	Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value				
	KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nex cre									
	Layer II-IV	-2,954	-6,617 to 0,7088	No	ns	0,13				
	Layer V	-8,283	-11,95 to -4,62	Yes	***	1E-04				
	Layer VI	2,487	-1,176 to 6,15	No	ns	0,233				
	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF	
	KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nex cre									
	Layer II-IV	25,12	28,07	-2,954	1,322	3	3	2,234	12	
	Layer V	21,44	29,72	-8,283	1,322	3	3	6,265	12	
	Layer VI	56,64	54,15	2,487	1,322	3	3	1,881	12	
	Cortical Thickness Nex E18									
	Table Analyzed	Cortical thickness								
	Column B	KIF2A +/H321D Nex cre								
	vs.	vs,								
	Column A	KIF2A +/Flex								
	Unpaired t test									
	P value	0,8098								
	P value summary	ns								
	Significantly different (P < 0.05)?	No								
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed								
	t, df	t=0,257 df=4								
	How big is the difference?									
	Mean ± SEM of column A	385,9 ± 5,123, n=3								
	Mean ± SEM of column B	389,1 ± 11,27, n=3								
	Difference between means	3,182 ± 12,38								
	95% confidence interval	-31,19 to 37,55								
	R squared (eta squared)	0,01625								
	F test to compare variances									
	F, DFn, Dfd	4,84, 2, 2								
	P value	0,3425								
	P value summary	ns								
	Significantly different (P < 0.05)?	No								
	CTIP2 density Nex									
	Table Analyzed	Unpaired t test data								
	Column B	KIF2A +/H321D Nex cre								

	vs.	vs,
	Column A	KIF2A +/Flex
	Unpaired t test	
	P value	0,0002
	P value summary	***
	Significantly different (P < 0.05)?	Yes
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
	t, df	t=9,442 df=5
	How big is the difference?	
	Mean ± SEM of column A	32,16 ± 0,8545, n=3
	Mean ± SEM of column B	22,7 ± 0,5933, n=4
	Difference between means	-9,46 ± 1,002
	95% confidence interval	-12,04 to -6,885
	R squared (eta squared)	0,9469
	F test to compare variances	
	F, DFn, Dfd	1,556, 2, 3
	P value	0,6879
	P value summary	ns
	Significantly different (P < 0.05)?	No
4-i	EDU Nex	
	Table Analyzed	Two-way ANOVA , not RM
	Two-way ANOVA	Ordinary
	Alpha	0,05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	4,031	<0,0001	****	Yes
Row Factor	0,03151	0,5477	ns	No
Column Factor	90,7	<0,0001	****	Yes

ANOVA table	SS (Type III)	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	112,6	9	12,51	F (9, 50) = 5,207	P<0,0001
Row Factor	0,8804	1	0,8804	F (1, 50) = 0,3664	P=0,5477
Column Factor	2534	9	281,6	F (9, 50) = 117,2	P<0,0001
Residual	120,2	50	2,403		

Compare each cell mean with the other cell mean in that column

Number of families	1
Number of comparisons per family	10
Alpha	0,05

Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nex cre					
Bin 1	0,8805	-2,587 to 4,348	No	ns	0,998
Bin 2	0,1657	-3,302 to 3,633	No	ns	>0,9999
Bin 3	-5,847	-9,315 to -2,38	Yes	****	<0,0001
Bin 4	0,6278	-2,84 to 4,095	No	ns	1
Bin 5	0,5817	-2,886 to 4,049	No	ns	>0,9999
Bin 6	0,4868	-2,981 to 3,954	No	ns	>0,9999
Bin 7	-1,631	-5,098 to 1,836	No	ns	0,853
Bin 8	-3,246	-6,713 to 0,2218	No	ns	0,082
Bin 9	3,455	-0,01266 to 6,922	No	ns	0,052
Bin 10	2,261	-1,207 to 5,728	No	ns	0,472

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nex cre								
Bin 1	3,496	2,615	0,8805	1,184	3	4	0,744	50
Bin 2	5,116	4,95	0,1657	1,184	3	4	0,14	50
Bin 3	6,948	12,8	-5,847	1,184	3	4	4,939	50
Bin 4	6,25	5,622	0,6278	1,184	3	4	0,53	50
Bin 5	7,111	6,529	0,5817	1,184	3	4	0,491	50
Bin 6	8,8	8,314	0,4868	1,184	3	4	0,411	50
Bin 7	11,51	13,14	-1,631	1,184	3	4	1,378	50
Bin 8	12,37	15,61	-3,246	1,184	3	4	2,741	50
Bin 9	27,41	23,96	3,455	1,184	3	4	2,918	50
Bin 10	12,18	9,917	2,261	1,184	3	4	1,91	50

panel	**Figure 5: KIF2A His321Asp variant causes p53 related cell death.**	
5-a	Caspase E12 Nestin	
	Table Analyzed	Unpaired t test data
	Column B	KIF2A +/H321D Nestin cre
	vs.	vs,
	Column A	KIF2A +/Flex
	Unpaired t test	
	P value	<0,0001
	P value summary	****
	Significantly different (P < 0.05)?	Yes
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
	t, df	t=11 df=12
	How big is the difference?	
	Mean ± SEM of column A	0,23 ± 0,02296, n=9
	Mean ± SEM of column B	12,21 ± 1,511, n=5
	Difference between means	11,98 ± 1,089
	95% confidence interval	9,606 to 14,35
	R squared (eta squared)	0,9098
	F test to compare variances	
	F, DFn, Dfd	2405, 4, 8
	P value	<0,0001
	P value summary	****
	Significantly different (P < 0.05)?	Yes
5-b	Caspase E13 Nestin	
	Table Analyzed	Unpaired t test data
	Column B	KIF2A +/H321D Nestin cre
	vs.	vs,

	Column A	KIF2A +/Flex
	Unpaired t test	
	P value	0,0004
	P value summary	***
	Significantly different (P < 0.05)?	Yes
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
	t, df	t=10,9 df=4
	How big is the difference?	
	Mean ± SEM of column A	0,3692 ± 0,03505, n=3
	Mean ± SEM of column B	8,218 ± 0,7192, n=3
	Difference between means	7,849 ± 0,72
	95% confidence interval	5,85 to 9,848
	R squared (eta squared)	0,9674
	F test to compare variances	
	F, DFn, Dfd	421, 2, 2
	P value	0,0047
	P value summary	**
	Significantly different (P < 0.05)?	Yes
5-c	Caspase E14 Nestin	
	Table Analyzed	Unpaired t test data
	Column B	KIF2A +/H321D Nestin cre
	vs.	vs,
	Column A	KIF2A +/Flex
	Unpaired t test	
	P value	0,0001
	P value summary	***
	Significantly different (P < 0.05)?	Yes
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
	t, df	t=8,846 df=6
	How big is the difference?	
	Mean ± SEM of column A	0,4791 ± 0,1039, n=4
	Mean ± SEM of column B	4,687 ± 0,4642, n=4
	Difference between means	4,207 ± 0,4757
	95% confidence interval	3,044 to 5,371
	R squared (eta squared)	0,9288
	F test to compare variances	
	F, DFn, Dfd	19,97, 3, 3
	P value	0,0349
	P value summary	*
	Significantly different (P < 0.05)?	Yes
5-d	Caspase E16 Nestin	
	Table Analyzed	Unpaired t test data
	Column B	KIF2A +/H321D Nestin cre
	vs.	vs,
	Column A	KIF2A +/Flex
	Unpaired t test	
	P value	0,0039
	P value summary	**
	Significantly different (P < 0.05)?	Yes
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
	t, df	t=4,54 df=6
	How big is the difference?	
	Mean ± SEM of column A	0,1908 ± 0,03512, n=4
	Mean ± SEM of column B	1,012 ± 0,1775, n=4
	Difference between means	0,8213 ± 0,1809
	95% confidence interval	0,3786 to 1,264
	R squared (eta squared)	0,7745
	F test to compare variances	
	F, DFn, Dfd	25,54, 3, 3
	P value	0,0246
	P value summary	*
	Significantly different (P < 0.05)?	Yes
5-h	Caspase E14 nex	
	Table Analyzed	Unpaired t test data
	Column B	KIF2A +/H321D Nex cre
	vs.	vs,
	Column A	KIF2A +/Flex
	Unpaired t test	
	P value	0,0002
	P value summary	***
	Significantly different (P < 0.05)?	Yes
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
	t, df	t=8,137 df=6
	How big is the difference?	
	Mean ± SEM of column A	0,3131 ± 0,03251, n=5
	Mean ± SEM of column B	1,527 ± 0,1954, n=3
	Difference between means	1,214 ± 0,1492
	95% confidence interval	0,8489 to 1,579
	R squared (eta squared)	0,9169
	F test to compare variances	
	F, DFn, Dfd	21,68, 2, 4
	P value	0,0143
	P value summary	*
	Significantly different (P < 0.05)?	Yes
5-i	Caspase E16 Nex	
	Table Analyzed	Unpaired t test data
	Column B	KIF2A +/H321D Nex cre

	vs.	vs,
	Column A	KIF2A +/Flex
	Unpaired t test	
	P value	0,0004
	P value summary	***
	Significantly different (P < 0.05)?	Yes
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
	t, df	t=6,282 df=7
	How big is the difference?	
	Mean ± SEM of column A	0,5062 ± 0,04064, n=4
	Mean ± SEM of column B	2,592 ± 0,2911, n=5
	Difference between means	2,086 ± 0,332
	95% confidence interval	1,301 to 2,871
	R squared (eta squared)	0,8494
	F test to compare variances	
	F, DFn, Dfd	64,15, 4, 3
	P value	0,0062
	P value summary	**
	Significantly different (P < 0.05)?	Yes
panel	**Figure 6:KIF2A His321Asp variant effects on microtubule stability and dynamics.**	
6-a	Depolymerisation MT cinetic	
	Table Analyzed	Data 5
	Two-way ANOVA	Ordinary
	Alpha	0,05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	4,574	0,1718	ns	No
Row Factor	70,05	<0,0001	****	Yes
Time	14,91	<0,0001	****	Yes

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	595,6	9	66,17	F (9, 32) = 1,554	P=0,1718
Row Factor	9120	3	3040	F (3, 32) = 71,39	P<0,0001
Time	1942	3	647,2	F (3, 32) = 15,2	P<0,0001
Residual	1363	32	42,59		

Within each row, compare columns (simple effects within rows)	
Number of families	4
Number of comparisons per family	6
Alpha	0,05

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary
5 min				
CTR 1 vs. CTR 2	5,299	-9,138 to 19,73	No	ns
CTR 1 vs. CTR 3	3,464	-10,97 to 17,9	No	ns
CTR 1 vs. KIF2A	-0,4721	-14,91 to 13,96	No	ns
CTR 2 vs. CTR 3	-1,835	-16,27 to 12,6	No	ns
CTR 2 vs. KIF2A	-5,771	-20,21 to 8,666	No	ns
CTR 3 vs. KIF2A	-3,936	-18,37 to 10,5	No	ns
10 min				
CTR 1 vs. CTR 2	11,44	-2,997 to 25,88	No	ns
CTR 1 vs. CTR 3	0,8213	-13,61 to 15,26	No	ns
CTR 1 vs. KIF2A	-6,018	-20,45 to 8,418	No	ns
CTR 2 vs. CTR 3	-10,62	-25,05 to 3,818	No	ns
CTR 2 vs. KIF2A	-17,46	-31,89 to -3,022	Yes	*
CTR 3 vs. KIF2A	-6,839	-21,28 to 7,597	No	ns
15 min				
CTR 1 vs. CTR 2	4,934	-9,503 to 19,37	No	ns
CTR 1 vs. CTR 3	6,421	-8,015 to 20,86	No	ns
CTR 1 vs. KIF2A	-15,46	-29,9 to -1,027	Yes	*
CTR 2 vs. CTR 3	1,487	-12,95 to 15,92	No	ns
CTR 2 vs. KIF2A	-20,4	-34,83 to -5,961	Yes	**
CTR 3 vs. KIF2A	-21,88	-36,32 to -7,448	Yes	**
20 min				
CTR 1 vs. CTR 2	10,72	-3,715 to 25,16	No	ns
CTR 1 vs. CTR 3	-0,741	-15,18 to 13,7	No	ns
CTR 1 vs. KIF2A	-16,06	-30,49 to -1,622	Yes	*
CTR 2 vs. CTR 3	-11,46	-25,9 to 2,974	No	ns
CTR 2 vs. KIF2A	-26,78	-41,22 to -12,34	Yes	***
CTR 3 vs. KIF2A	-15,32	-29,75 to -0,8812	Yes	*

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	q	DF
5 min								
CTR 1 vs. CTR 2	93,56	88,27	5,299	5,328	3	3	1,406	32
CTR 1 vs. CTR 3	93,56	90,1	3,464	5,328	3	3	0,919	32
CTR 1 vs. KIF2A	93,56	94,04	-0,4721	5,328	3	3	0,125	32
CTR 2 vs. CTR 3	88,27	90,1	-1,835	5,328	3	3	0,487	32
CTR 2 vs. KIF2A	88,27	94,04	-5,771	5,328	3	3	1,532	32
CTR 3 vs. KIF2A	90,1	94,04	-3,936	5,328	3	3	1,045	32
10 min								
CTR 1 vs. CTR 2	85,55	74,11	11,44	5,328	3	3	3,036	32
CTR 1 vs. CTR 3	85,55	84,73	0,8213	5,328	3	3	0,218	32
CTR 1 vs. KIF2A	85,55	91,57	-6,018	5,328	3	3	1,597	32
CTR 2 vs. CTR 3	74,11	84,73	-10,62	5,328	3	3	2,818	32
CTR 2 vs. KIF2A	74,11	91,57	-17,46	5,328	3	3	4,634	32
CTR 3 vs. KIF2A	84,73	91,57	-6,839	5,328	3	3	1,815	32
15 min								
CTR 1 vs. CTR 2	66,88	61,94	4,934	5,328	3	3	1,309	32
CTR 1 vs. CTR 3	66,88	60,45	6,421	5,328	3	3	1,704	32
CTR 1 vs. KIF2A	66,88	82,34	-15,46	5,328	3	3	4,104	32
CTR 2 vs. CTR 3	61,94	60,45	1,487	5,328	3	3	0,395	32
CTR 2 vs. KIF2A	61,94	82,34	-20,4	5,328	3	3	5,414	32
CTR 3 vs. KIF2A	60,45	82,34	-21,88	5,328	3	3	5,808	32

	20 min								
	CTR 1 vs. CTR 2	54,59	43,87	10,72	5,328	3	3	2,846	32
	CTR 1 vs. CTR 3	54,59	55,33	-0,741	5,328	3	3	0,197	32
	CTR 1 vs. KIF2A	54,59	70,65	-16,06	5,328	3	3	4,262	32
	CTR 2 vs. CTR 3	43,87	55,33	-11,46	5,328	3	3	3,042	32
	CTR 2 vs. KIF2A	43,87	70,65	-26,78	5,328	3	3	7,108	32
	CTR 3 vs. KIF2A	55,33	70,65	-15,32	5,328	3	3	4,065	32
6-b	EB3 dynamics								
	Table Analyzed	Mean							
	Data sets analyzed	A : CTR137	B : Data Set-B	C : Data Set-C	D : Data Set-D				
	ANOVA summary								
	F	5,886							
	P value	0,0104							
	P value summary	*							
	Significant diff. among means (P < 0.05)?	Yes							
	R square	0,5954							
	Brown-Forsythe test								
	F (DFn, DFd)	1,253 (3, 12)							
	P value	0,3342							
	P value summary	ns							
	Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No							
	Bartlett's test								
	Bartlett's statistic (corrected)	1,981							
	P value	0,5763							
	P value summary	ns							
	Are SDs significantly different (P < 0.05)?	No							
	ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value			
	Treatment (between columns)	0,0253	3	0,008432	F (3, 12) = 5,886	P=0,0104			
	Residual (within columns)	0,01719	12	0,001432					
	Total	0,04249	15						
	Data summary								
	Number of treatments (columns)	4							
	Number of values (total)	16							
	Number of families	1							
	Number of comparisons per family	6							
	Alpha	0,05							
	Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
	CTR137 vs. Column B	0,0046	-0,07486 to 0,08406	No	ns	0,998	A-B		
	CTR137 vs. Column C	0,02183	-0,05763 to 0,1013	No	ns	0,846	A-C		
	CTR137 vs. Column D	-0,08108	-0,1605 to -0,001619	Yes	*	0,045	A-D		
	Column B vs. Column C	0,01723	-0,06223 to 0,09668	No	ns	0,916	B-C		
	Column B vs. Column D	-0,08568	-0,1651 to -0,006219	Yes	*	0,033	B-D		
	Column C vs. Column D	-0,1029	-0,1824 to -0,02344	Yes	*	0,011	C-D		
	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	q	DF
	CTR137 vs. Column B	0,3642	0,3596	0,0046	0,02676	4	4	0,243	12
	CTR137 vs. Column C	0,3642	0,3423	0,02183	0,02676	4	4	1,153	12
	CTR137 vs. Column D	0,3642	0,4452	-0,08108	0,02676	4	4	4,284	12
	Column B vs. Column C	0,3596	0,3423	0,01723	0,02676	4	4	0,91	12
	Column B vs. Column D	0,3596	0,4452	-0,08568	0,02676	4	4	4,527	12
	Column C vs. Column D	0,3423	0,4452	-0,1029	0,02676	4	4	5,438	12
panel	**Supplementary figure 3 :Behavioral test link to cerebellum atrophy and CA1 hippocampal heterotopia in KIF2A mutant mice.**								
3-a	Grip test Strengh								
	Table Analyzed	Grip Strengh							
	Column B	KIF2A +/H321D ROSA cre							
	vs.	vs,							
	Column A	KIF2A +/Flex							
	Unpaired t test								
	P value	0,0018							
	P value summary	**							
	Significantly different (P < 0.05)?	Yes							
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed							
	t, df	t=3,776 df=15							
	How big is the difference?								
	Mean ± SEM of column A	249,9 ± 8,476, n=10							
	Mean ± SEM of column B	201,1 ± 9,553, n=7							
	Difference between means	-48,76 ± 12,91							
	95% confidence interval	-76,28 to -21,24							
	R squared (eta squared)	0,4873							
	F test to compare variances								
	F, DFn, Dfd	1,124, 9, 6							
	P value	0,9195							
	P value summary	ns							
	Significantly different (P < 0.05)?	No							
	Grip test strengh ratio								
	Table Analyzed	Grip Strengh ratio							
	Column B	KIF2A +/H321D ROSA cre							
	vs.	vs,							
	Column A	KIF2A +/Flex							
	Unpaired t test								
	P value	0,2935							
	P value summary	ns							
	Significantly different (P < 0.05)?	No							
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed							
	t, df	t=1,089 df=15							
	How big is the difference?								
	Mean ± SEM of column A	9,229 ± 0,2393, n=10							
	Mean ± SEM of column B	8,79 ± 0,3412, n=7							

	Difference between means	-0,439 ± 0,4033
	95% confidence interval	-1,299 to 0,4206
	R squared (eta squared)	0,07322
	F test to compare variances	
	F, DFn, Dfd	1,423, 6, 9
	P value	0,6086
	P value summary	ns
	Significantly different (P < 0.05)?	No
3-b	Crenelated beam latency	
	Table Analyzed	Latency
	Column B	KIF2A +/H321D ROSA cre
	vs.	vs,
	Column A	KIF2A +/Flex
	Unpaired t test	
	P value	0,2814
	P value summary	ns
	Significantly different (P < 0.05)?	No
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
	t, df	t=1,117 df=15
	How big is the difference?	
	Mean ± SEM of column A	6,93 ± 1,027, n=10
	Mean ± SEM of column B	5,451 ± 0,563, n=7
	Difference between means	-1,479 ± 1,323
	95% confidence interval	-4,299 to 1,342
	R squared (eta squared)	0,07684
	F test to compare variances	
	F, DFn, Dfd	4,75, 9, 6
	P value	0,0714
	P value summary	ns
	Significantly different (P < 0.05)?	No
	Crenelated beam slips	
	Table Analyzed	Slips
	Column B	KIF2A +/H321D ROSA cre
	vs.	vs,
	Column A	KIF2A +/Flex
	Unpaired t test	
	P value	0,2979
	P value summary	ns
	Significantly different (P < 0.05)?	No
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
	t, df	t=1,078 df=15
	How big is the difference?	
	Mean ± SEM of column A	1,233 ± 0,217, n=10
	Mean ± SEM of column B	0,9043 ± 0,189, n=7
	Difference between means	-0,3287 ± 0,3048
	95% confidence interval	-0,9785 to 0,321
	R squared (eta squared)	0,07194
	F test to compare variances	
	F, DFn, Dfd	1,884, 9, 6
	P value	0,4542
	P value summary	ns
	Significantly different (P < 0.05)?	No
3-c	Rotarod	
	Table Analyzed	Rotarod
	Column B	KIF2A +/H321D ROSA cre
	vs.	vs,
	Column A	KIF2A +/Flex
	Unpaired t test	
	P value	0,4252
	P value summary	ns
	Significantly different (P < 0.05)?	No
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
	t, df	t=0,8197 df=15
	How big is the difference?	
	Mean ± SEM of column A	194,7 ± 8,411, n=10
	Mean ± SEM of column B	182,7 ± 12,83, n=7
	Difference between means	-12,02 ± 14,66
	95% confidence interval	-43,27 to 19,23
	R squared (eta squared)	0,04287
	F test to compare variances	
	F, DFn, Dfd	1,628, 6, 9
	P value	0,4903
	P value summary	ns
	Significantly different (P < 0.05)?	No
panel	**Supplementary figure 5 :Abnormal cortical layering in KIF2A+/H321D ROSAcre mice.**	
5-a	Layer E18 ROSA	
	Table Analyzed	Layer
	Two-way ANOVA	Ordinary
	Alpha	0,05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	6,716	0,0018	**	Yes
Row Factor	0,06154	0,6989	ns	No
Column Factor	83,58	<0,0001	****	Yes

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	406,1	2	203	F (2, 24) = 8,361	P=0,0018
Row Factor	3,721	1	3,721	F (1, 24) = 0,1532	P=0,6989
Column Factor	5054	2	2527	F (2, 24) = 104,1	P<0,0001

	Residual	582,8	24	24,28					
	Compare each cell mean with the other cell mean in that column								
	Number of families	1							
	Number of comparisons per family	3							
	Alpha	0,05							
	Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
	KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D ROSA cre								
	Layer II-IV	-0,3633	-8,361 to 7,634	No	ns	0,999			
	Layer V	-9,882	-17,88 to -1,884	Yes	*	0,012			
	Layer VI	8,132	0,1346 to 16,13	Yes	*	0,045			
	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
	KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D ROSA cre								
	Layer II-IV	30,22	30,58	-0,3633	3,117	5	5	0,117	24
	Layer V	20,33	30,21	-9,882	3,117	5	5	3,171	24
	Layer VI	59,07	50,94	8,132	3,117	5	5	2,609	24
	Cortical thickness								
	Table Analyzed	CP							
	Column B	KIF2A +/H321D ROSA cre							
	vs.	vs,							
	Column A	KIF2A +/Flex							
	Unpaired t test								
	P value	0,6429							
	P value summary	ns							
	Significantly different (P < 0.05)?	No							
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed							
	t, df	t=0,4817 df=8							
	How big is the difference?								
	Mean ± SEM of column A	449,4 ± 23,33, n=5							
	Mean ± SEM of column B	435,4 ± 17,27, n=5							
	Difference between means	-13,98 ± 29,03							
	95% confidence interval	-80,92 to 52,96							
	R squared (eta squared)	0,02819							
	F test to compare variances								
	F, DFn, Dfd	1,826, 4, 4							
	P value	0,5742							
	P value summary	ns							
	Significantly different (P < 0.05)?	No							
	CTIP2 Density								
	Table Analyzed	Unpaired t test data							
	Column B	KIF2A +/H321D ROSA cre							
	vs.	vs,							
	Column A	KIF2A +/Flex							
	Unpaired t test								
	P value	0,0021							
	P value summary	**							
	Significantly different (P < 0.05)?	Yes							
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed							
	t, df	t=4,47 df=8							
	How big is the difference?								
	Mean ± SEM of column A	33,8 ± 1,04, n=5							
	Mean ± SEM of column B	24,86 ± 1,709, n=5							
	Difference between means	-8,943 ± 2,001							
	95% confidence interval	-13,56 to -4,33							
	R squared (eta squared)	0,7141							
	F test to compare variances								
	F, DFn, Dfd	2,703, 4, 4							
	P value	0,3589							
	P value summary	ns							
	Significantly different (P < 0.05)?	No							
5-d	EDU ROSA E18								
	Table Analyzed	Two-way ANOVA , not RM							
	Two-way ANOVA	Ordinary							
	Alpha	0,05							
	Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?				
	Interaction	4,91	<0,0001	****	Yes				
	Row Factor	0	>0,9999	ns	No				
	Column Factor	91,5	<0,0001	****	Yes				
	ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value			
	Interaction	79,17	9	8,796	F (9, 40) = 6,071	P<0,0001			
	Row Factor	0	1	0	F (1, 40) = 0	P>0,9999			
	Column Factor	1475	9	163,9	F (9, 40) = 113,1	P<0,0001			
	Residual	57,95	40	1,449					
	Compare each cell mean with the other cell mean in that column								
	Number of families	1							
	Number of comparisons per family	10							
	Alpha	0,05							
	Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
	KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D ROSA cre								
	Bin 1	-0,3858	-3,297 to 2,526	No	ns	>0,9999			
	Bin 2	-0,001254	-2,913 to 2,91	No	ns	>0,9999			
	Bin 3	-5,066	-7,977 to -2,154	Yes	****	<0,0001			
	Bin 4	-1,516	-4,428 to 1,395	No	ns	0,754			
	Bin 5	0,5791	-2,332 to 3,491	No	ns	1			
	Bin 6	-0,00913	-2,921 to 2,902	No	ns	>0,9999			
	Bin 7	-0,1354	-3,047 to 2,776	No	ns	>0,9999			
	Bin 8	1,505	-1,407 to 4,416	No	ns	0,762			

Bin 9	4,683	1,772 to 7,595	Yes	***	2E-04				
Bin 10	0,3465	-2,565 to 3,258	No	ns	>0,9999				

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D ROSA cre								
Bin 1	4,471	4,857	-0,3858	0,9828	3	3	0,393	40
Bin 2	6,192	6,194	-0,001254	0,9828	3	3	0,001	40
Bin 3	7,126	12,19	-5,066	0,9828	3	3	5,154	40
Bin 4	6,506	8,022	-1,516	0,9828	3	3	1,543	40
Bin 5	7,153	6,574	0,5791	0,9828	3	3	0,589	40
Bin 6	8,243	8,252	-0,00913	0,9828	3	3	0,009	40
Bin 7	10,21	10,35	-0,1354	0,9828	3	3	0,138	40
Bin 8	15,96	14,45	1,505	0,9828	3	3	1,531	40
Bin 9	24,77	20,09	4,683	0,9828	3	3	4,765	40
Bin 10	9,364	9,017	0,3465	0,9828	3	3	0,353	40

5-e	Average velocity timelaspe	
	Table Analyzed	Average velocity
	Column B	KIF2A +/H321D Nestin cre
	vs.	vs,
	Column A	KIF2A +/Flex
	Unpaired t test	
	P value	0,6804
	P value summary	ns
	Significantly different (P < 0.05)?	No
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
	t, df	t=0,4256 df=9
	How big is the difference?	
	Mean ± SEM of column A	9,509 ± 0,6225, n=3
	Mean ± SEM of column B	8,879 ± 0,8535, n=8
	Difference between means	-0,6306 ± 1,482
	95% confidence interval	-3,983 to 2,722
	R squared (eta squared)	0,01973
	F test to compare variances	
	F, DFn, Dfd	5,013, 7, 2
	P value	0,3527
	P value summary	ns
	Significantly different (P < 0.05)?	No
	Velocity Rate	
	Table Analyzed	Velocity rate
	Column B	KIF2A +/H321D Nestin cre
	vs.	vs,
	Column A	KIF2A +/Flex
	Unpaired t test	
	P value	0,9281
	P value summary	ns
	Significantly different (P < 0.05)?	No
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
	t, df	t=0,09274 df=9
	How big is the difference?	
	Mean ± SEM of column A	10,36 ± 0,39, n=3
	Mean ± SEM of column B	10,23 ± 0,7799, n=8
	Difference between means	-0,1238 ± 1,335
	95% confidence interval	-3,143 to 2,895
	R squared (eta squared)	0,000955
	F test to compare variances	
	F, DFn, Dfd	10,66, 7, 2
	P value	0,1768
	P value summary	ns
	Significantly different (P < 0.05)?	No
5-f	Number of pauses	
	Table Analyzed	Number of pauses
	Column B	KIF2A +/H321D Nestin cre
	vs.	vs,
	Column A	KIF2A +/Flex
	Unpaired t test	
	P value	0,1796
	P value summary	ns
	Significantly different (P < 0.05)?	No
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
	t, df	t=1,455 df=9
	How big is the difference?	
	Mean ± SEM of column A	0,7251 ± 0,2448, n=3
	Mean ± SEM of column B	1,344 ± 0,2387, n=8
	Difference between means	0,6186 ± 0,4252
	95% confidence interval	-0,3432 to 1,58
	R squared (eta squared)	0,1904
	F test to compare variances	
	F, DFn, Dfd	2,535, 7, 2
	P value	0,6237
	P value summary	ns
	Significantly different (P < 0.05)?	No
	Total time in pause	
	Table Analyzed	Total time in pause
	Column B	KIF2A +/H321D Nestin cre
	vs.	vs,
	Column A	KIF2A +/Flex
	Unpaired t test	
	P value	0,2248

	P value summary	ns							
	Significantly different (P < 0.05)?	No							
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed							
	t, df	t=1,303 df=9							
	How big is the difference?								
	Mean ± SEM of column A	26,73 ± 11,08, n=3							
	Mean ± SEM of column B	69,66 ± 19,16, n=8							
	Difference between means	42,93 ± 32,94							
	95% confidence interval	-31,58 to 117,4							
	R squared (eta squared)	0,1588							
	F test to compare variances								
	F, DFn, Dfd	7,97, 7, 2							
	P value	0,232							
	P value summary	ns							
	Significantly different (P < 0.05)?	No							
5-g	Bipolar at T0								
	Table Analyzed	Bipolar							
	Two-way ANOVA	Ordinary							
	Alpha	0,05							
	Source of Variation	% of total variation	P value		P value summary	Significant?			
	Interaction	1,477	0,167		ns	No			
	Row Factor	4,21E-14	>0,9999		ns	No			
	Column Factor	90,37	<0,0001		****	Yes			
	ANOVA table	SS (Type III)	DF		MS	F (DFn, DFd)	P value		
	Interaction	231,1	1		231,1	F (1, 12) = 2,164	P=0,1670		
	Row Factor	6,59E-12	1		6,594E-12	F (1, 12) = 6,174e-014	P>0,9999		
	Column Factor	14141	1		14141	F (1, 12) = 132,4	P<0,0001		
	Residual	1282	12		106,8				
	Compare each cell mean with the other cell mean in that column								
	Number of families	1							
	Number of comparisons per family	2							
	Alpha	0,05							
	Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,		Significant?	Summary	Adjusted P Value		
	KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nestin cre								
	Persisting BP	7,85	-11,42 to 27,12		No	ns	0,536		
	Transiting to multipolar	-7,85	-27,12 to 11,42		No	ns	0,536		
	Test details	Mean 1	Mean 2		Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
	KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nestin cre									
	Persisting BP	84,63	76,78		7,85	7,547	3	5	1,04	12
	Transiting to multipolar	15,37	23,22		-7,85	7,547	3	5	1,04	12
	Multipolar at T0									
	Table Analyzed	Multipolar								
	Two-way ANOVA	Ordinary								
	Alpha	0,05								
	Source of Variation	% of total variation	P value		P value summary	Significant?				
	Interaction	40,19	0,0113		*	Yes				
	Row Factor	3,22E-13	>0,9999		ns	No				
	Column Factor	0,5826	0,7251		ns	No				
	ANOVA table	SS (Type III)	DF		MS	F (DFn, DFd)	P value			
	Interaction	1193	1		1193	F (1, 12) = 8,942	P=0,0113			
	Row Factor	9,55E-12	1		9,55E-12	F (1, 12) = 7,155e-014	P>0,9999			
	Column Factor	17,3	1		17,3	F (1, 12) = 0,1296	P=0,7251			
	Residual	1602	12		133,5					
	Compare each cell mean with the other cell mean in that column									
	Number of families	1								
	Number of comparisons per family	2								
	Alpha	0,05								
	Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,		Significant?	Summary				
	KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nestin cre									
	Persisting MP	-17,84	-39,38 to 3,701		No	ns				
	Transiting to bipolar	17,84	-3,701 to 39,38		No	ns				
	Test details	Mean 1	Mean 2		Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
	KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nestin cre									
	Persisting MP	42,15	59,99		-17,84	8,437	3	5	2,114	12
	Transiting to bipolar	57,85	40,01		17,84	8,437	3	5	2,114	12
panel	**Supplementary figure 6 :Studies of neural progenitors and primary cilia in KIF2A+/H321D NestinCre mice.**									
6-a	PH3 E12									
	Table Analyzed	Data 3								
	Two-way ANOVA	Ordinary								
	Alpha	0,05								
	Source of Variation	% of total variation	P value		P value summary	Significant?				
	Interaction	0,001332	0,9357		ns	No				
	Row Factor	0,06397	0,5777		ns	No				
	Column Factor	93,39	<0,0001		****	Yes				
	ANOVA table	SS (Type III)	DF		MS	F (DFn, DFd)	P value			
	Interaction	0,00234	1		0,00234	F (1, 20) = 0,006669	P=0,9357			
	Row Factor	0,1124	1		0,1124	F (1, 20) = 0,3203	P=0,5777			
	Column Factor	164,1	1		164,1	F (1, 20) = 467,6	P<0,0001			
	Residual	7,017	20		0,3508					
	Compare each cell mean with the other cell mean in that column									
	Number of families	1								
	Number of comparisons per family	2								
	Alpha	0,05								

Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nestin cre					
Apical	0,1188	-0,7195 to 0,9571	No	ns	0,93
Basal	0,1588	-0,6795 to 0,9971	No	ns	0,879

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nestin cre								
Apical	7,188	7,07	0,1188	0,3468	7	5	0,342	20
Basal	1,905	1,746	0,1588	0,3468	7	5	0,458	20

PH3 E13

Table Analyzed	Two-way ANOVA , not RM
Two-way ANOVA	Ordinary
Alpha	0,05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	0,6233	0,4871	ns	No
Row Factor	4,317	0,0915	ns	No
Column Factor	85,66	<0,0001	****	Yes

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	0,3467	1	0,3467	F (1, 8) = 0,5306	P=0,4871
Row Factor	2,401	1	2,401	F (1, 8) = 3,675	P=0,0915
Column Factor	47,64	1	47,64	F (1, 8) = 72,91	P<0,0001
Residual	5,227	8	0,6534		

Compare each cell mean with the other cell mean in that column

Number of families	1
Number of comparisons per family	2
Alpha	0,05

Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nestin cre					
Apical	1,235	-0,576 to 3,045	No	ns	0,187
Basal	0,5547	-1,256 to 2,365	No	ns	0,669

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nestin cre								
Apical	7,482	6,248	1,235	0,66	3	3	1,871	8
Basal	3,157	2,602	0,5547	0,66	3	3	0,841	8

PH3 E14

Table Analyzed	Two-way ANOVA , not RM
Two-way ANOVA	Ordinary
Alpha	0,05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	0,1313	0,6183	ns	No
Row Factor	0,5034	0,3364	ns	No
Column Factor	93,34	<0,0001	****	Yes

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	0,09776	1	0,09776	F (1, 12) = 0,2616	P=0,6183
Row Factor	0,3747	1	0,3747	F (1, 12) = 1,003	P=0,3364
Column Factor	69,48	1	69,48	F (1, 12) = 185,9	P<0,0001
Residual	4,485	12	0,3737		

Compare each cell mean with the other cell mean in that column

Number of families	1
Number of comparisons per family	2
Alpha	0,05

Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nestin cre					
Apical	-0,4624	-1,566 to 0,6412	No	ns	0,518
Basal	-0,1497	-1,253 to 0,9539	No	ns	0,93

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nestin cre								
Apical	6,209	6,672	-0,4624	0,4323	4	4	1,07	12
Basal	2,198	2,348	-0,1497	0,4323	4	4	0,346	12

PH3 E16

Table Analyzed	Two-way ANOVA , not RM
Two-way ANOVA	Ordinary
Alpha	0,05

Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	0,6315	0,1394	ns	No
Row Factor	0,3625	0,2536	ns	No
Column Factor	95,98	<0,0001	****	Yes

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Interaction	0,212	1	0,212	F (1, 12) = 2,506	P=0,1394
Row Factor	0,1217	1	0,1217	F (1, 12) = 1,438	P=0,2536
Column Factor	32,23	1	32,23	F (1, 12) = 380,8	P<0,0001
Residual	1,015	12	0,08462		

Compare each cell mean with the other cell mean in that column

Number of families	1
Number of comparisons per family	2
Alpha	0,05

Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nestin cre					
Apical	-0,4047	-0,9298 to 0,1205	No	ns	0,14
Basal	0,0558	-0,4694 to 0,581	No	ns	0,956

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nestin cre								

Apical	4,38	4,784	-0,4047	0,2057	4	4	1,967	12
Basal	1,771	1,716	0,0558	0,2057	4	4	0,271	12

6-b PAX6/TBR2 E12

Table Analyzed	%					
Two-way ANOVA	Ordinary					
Alpha	0,05					
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?		
Interaction	0,06447	0,1185	ns	No		
Row Factor	-3,63E-15	>0,9999	ns	No		
Column Factor	79,84	<0,0001	****	Yes		
ANOVA table	SS (Type III)	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value	
Interaction	17,16	3	5,721	F (3, 20) = 2,21	P=0,1185	
Row Factor	-9,66E-13	1	-9,66E-13	F (1, 20) = -3,733e-013	P>0,9999	
Column Factor	21257	3	7086	F (3, 20) = 2737	P<0,0001	
Residual	51,78	20	2,589			
Compare each cell mean with the other cell mean in that column						
Number of families	1					
Number of comparisons per family	4					
Alpha	0,05					
Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nestin cre						
PAX6+/TBR2-	2,716	-0,9669 to 6,399	No	ns	0,21	
PAX6-/TBR2+	-2,104	-5,786 to 1,579	No	ns	0,437	
PAX6+/TBR2+	-0,1914	-3,874 to 3,491	No	ns	1	
TUJ1+	-0,4207	-4,103 to 3,262	No	ns	0,997	

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nestin cre								
PAX6+/TBR2-	78,19	75,47	2,716	1,346	5	2	2,017	20
PAX6-/TBR2+	16,23	18,34	-2,104	1,346	5	2	1,563	20
PAX6+/TBR2+	2,236	2,427	-0,1914	1,346	5	2	0,142	20
TUJ1+	3,34	3,761	-0,4207	1,346	5	2	0,313	20

PAX6/TBR2 E13

Table Analyzed	Two-way ANOVA , not RM					
Two-way ANOVA	Ordinary					
Alpha	0,05					
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?		
Interaction	0,1166	0,061	ns	No		
Row Factor	0	>0,9999	ns	No		
Column Factor	99,68	<0,0001	****	Yes		
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value	
Interaction	19,19	3	6,395	F (3, 16) = 3,01	P=0,0610	
Row Factor	0	1	0	F (1, 16) = 0	P>0,9999	
Column Factor	16405	3	5468	F (3, 16) = 2573	P<0,0001	
Residual	34	16	2,125			
Compare each cell mean with the other cell mean in that column						
Number of families	1					
Number of comparisons per family	4					
Alpha	0,05					
Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nestin cre						
PAX6+/TBR2-	1,441	-1,896 to 4,779	No	ns	0,672	
PAX6-/TBR2+	1,761	-1,576 to 5,098	No	ns	0,498	
PAX6+/TBR2+	-2,716	-6,053 to 0,6213	No	ns	0,138	
TUJ1+	-0,4865	-3,824 to 2,851	No	ns	0,991	

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nestin cre								
PAX6+/TBR2-	68,61	67,17	1,441	1,19	3	3	1,211	16
PAX6-/TBR2+	25,01	23,25	1,761	1,19	3	3	1,479	16
PAX6+/TBR2+	5,045	7,761	-2,716	1,19	3	3	2,282	16
TUJ1+	1,341	1,827	-0,4865	1,19	3	3	0,409	16

PAX6/TBR2 E14

Table Analyzed	Two-way ANOVA , not RM					
Two-way ANOVA	Ordinary					
Alpha	0,05					
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?		
Interaction	0,06381	0,7419	ns	No		
Row Factor	0	>0,9999	ns	No		
Column Factor	98,71	<0,0001	****	Yes		
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value	
Interaction	11,7	3	3,899	F (3, 24) = 0,4177	P=0,7419	
Row Factor	0	1	0	F (1, 24) = 0	P>0,9999	
Column Factor	18094	3	6031	F (3, 24) = 646,2	P<0,0001	
Residual	224	24	9,334			
Compare each cell mean with the other cell mean in that column						
Number of families	1					
Number of comparisons per family	4					
Alpha	0,05					
Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value	
KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nestin cre						
PAX6+/TBR2-	0,7152	-5,1 to 6,53	No	ns	0,996	
PAX6-/TBR2+	-1,852	-7,668 to 3,963	No	ns	0,87	
PAX6+/TBR2+	-0,225	-6,04 to 5,59	No	ns	>0,9999	
TUJ1+	1,362	-4,453 to 7,177	No	ns	0,953	

	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
	KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nestin cre								
	PAX6+/TBR2-	64,18	63,47	0,7152	2,16	4	4	0,331	24
	PAX6-/TBR2+	23,76	25,61	-1,852	2,16	4	4	0,857	24
	PAX6+/TBR2+	8,133	8,358	-0,225	2,16	4	4	0,104	24
	TUJ1+	3,922	2,56	1,362	2,16	4	4	0,631	24
	PAX6/TBR2 E16								
	Table Analyzed	Two-way ANOVA , not RM							
	Two-way ANOVA	Ordinary							
	Alpha	0,05							
	Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?				
	Interaction	0,0986	0,1465	ns	No				
	Row Factor	0	>0,9999	ns	No				
	Column Factor	99,5	<0,0001	****	Yes				
	ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value			
	Interaction	12,49	3	4,163	F (3, 24) = 1,963	P=0,1465			
	Row Factor	0	1	0	F (1, 24) = 0	P>0,9999			
	Column Factor	12603	3	4201	F (3, 24) = 1980	P<0,0001			
	Residual	50,91	24	2,121					
	Compare each cell mean with the other cell mean in that column								
	Number of families	1							
	Number of comparisons per family	4							
	Alpha	0,05							
	Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value			
	KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nestin cre								
	PAX6+/TBR2-	-0,009525	-2,782 to 2,763	No	ns	>0,9999			
	PAX6-/TBR2+	-1,883	-4,655 to 0,8894	No	ns	0,284			
	PAX6+/TBR2+	1,62	-1,152 to 4,393	No	ns	0,424			
	TUJ1+	0,272	-2,5 to 3,044	No	ns	0,998			
	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	N1	N2	t	DF
	KIF2A +/Flex - KIF2A +/H321D Nestin cre								
	PAX6+/TBR2-	56,91	56,92	-0,009525	1,03	4	4	0,009	24
	PAX6-/TBR2+	10,43	12,32	-1,883	1,03	4	4	1,828	24
	PAX6+/TBR2+	26,75	25,13	1,62	1,03	4	4	1,573	24
	TUJ1+	5,899	5,627	0,272	1,03	4	4	0,264	24
6-c	Primary cilia %								
	Table Analyzed	% primary cilia							
	Column B	KIF2A +/H321D Nestin cre							
	vs.	vs,							
	Column A	KIF2A +/Flex							
	Unpaired t test								
	P value	0,813							
	P value summary	ns							
	Significantly different (P < 0.05)?	No							
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed							
	t, df	t=0,2472 df=6							
	How big is the difference?								
	Mean ± SEM of column A	53,33 ± 1,153, n=4							
	Mean ± SEM of column B	52,76 ± 2,018, n=4							
	Difference between means	-0,5745 ± 2,324							
	95% confidence interval	-6,262 to 5,113							
	R squared (eta squared)	0,01008							
	F test to compare variances								
	F, DFn, Dfd	3,066, 3, 3							
	P value	0,3821							
	P value summary	ns							
	Significantly different (P < 0.05)?	No							
	Primary cilia length								
	Table Analyzed	Length cils mean							
	Column B	KIF2A +/H321D Nestin cre							
	vs.	vs,							
	Column A	KIF2A +/Flex							
	Unpaired t test								
	P value	0,5015							
	P value summary	ns							
	Significantly different (P < 0.05)?	No							
	One- or two-tailed P value?	Two-tailed							
	t, df	t=0,715 df=6							
	How big is the difference?								
	Mean ± SEM of column A	0,9031 ± 0,05736, n=4							
	Mean ± SEM of column B	0,9502 ± 0,03247, n=4							
	Difference between means	0,04713 ± 0,06591							
	95% confidence interval	-0,1142 to 0,2084							
	R squared (eta squared)	0,07851							
	F test to compare variances								
	F, DFn, Dfd	3,122, 3, 3							
	P value	0,3748							
	P value summary	ns							
	Significantly different (P < 0.05)?	No							
6-d	Caspase E18								
	Table Analyzed	Unpaired t test data							
	Column B	KIF2A +/H321D Nestin cre							
	vs.	vs,							
	Column A	KIF2A +/Flex							
	Unpaired t test								

P value	0,5531
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0,6355 df=5
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	0,3678 ± 0,1038, n=4
Mean ± SEM of column B	0,5 ± 0,2008, n=3
Difference between means	0,1322 ± 0,2081
95% confidence interval	-0,4026 to 0,6671
R squared (eta squared)	0,07473
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	2,806, 2, 3
P value	0,4112
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No

Caspase P2	
Table Analyzed	Unpaired t test data
Column B	KIF2A +/H321D Nestin cre
vs.	vs,
Column A	KIF2A +/Flex
Unpaired t test	
P value	0,1589
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=1,577 df=7
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	0,2041 ± 0,04682, n=3
Mean ± SEM of column B	0,1289 ± 0,02496, n=6
Difference between means	-0,0752 ± 0,0477
95% confidence interval	-0,188 to 0,03759
R squared (eta squared)	0,262
F test to compare variances	
F, DFn, Dfd	1,759, 2, 5
P value	0,5279
P value summary	ns
Significantly different (P < 0.05)?	No

Résultats non publiés de travaux en cours de finalisation

Conséquences de l'expression tardive de mutations dans le gène KIF2A et contribution au phénotype d'épilepsie dans un modèle de souris transgénique

Johan G. Gilet*[1-4], Paul Voulleminot*[6], Gabrielle Rudolf[1-4], Jamel Chelly[1-5]

[1]Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch 67400, France,
[2]CNRS U7104, Illkirch 67400, France,
[3]INSERM U964, Illkirch 67400, France,
[4]Université de Strasbourg, Illkirch 67400, France,
[5]Service de Diagnostic Génétique, Hôpital Civil de Strasbourg, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg 67000, France.
[6] Département de Neurologie, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France.
*Ces auteurs ont contribué de manière équivalente

Résumé

Afin d'étudier dans un contexte physiologique l'impact de ces mutations sur le développement cortical, nous avons développé un modèle murin basé sur la technologie Cre-Lox exprimant conditionnellement la mutation p.His321Asp de KIF2A permettant le contrôle de l'expression de celle-ci dans le temps et dans l'espace. Les premières analyses neuro-anatomiques et neuro-développementales des souris exprimant la mutation lors du développement embryonnaire ont permis de mettre en évidence une microcéphalie liée à une atrophie de plusieurs structures du cerveau, mais aussi des anomalies de positionnement neuronal dans le cortex et l'hippocampe. De plus, Des explorations phénotypiques ont permis de mettre en évidence des troubles comportementaux et une susceptibilité accrue à l'épilepsie chez la souris mutante. Dans la continuité de ces résultats nous avons exploré les conséquences d'une expression restreinte au stade post-natal de la mutation *KIF2A*, afin de s'affranchir des malformations du développement cortical et déterminer si un impact de la mutation *KIF2A* lors de la maturation, la différenciation et/ou le fonctionnement des neurones est suffisant, ou contribue, à la survenue des phénotypes cliniques comportementaux et d'épilepsie.

Pour aborder cette question importante, nous avons initié des croisements du modèle avec des souris Cre-ERT2 inductibles au tamoxifène et avons testé l'induction de l'expression de la mutation *KIF2A* uniquement en période post-natale (Metzger and Chambon, 2011). A l'aide de cette approche et

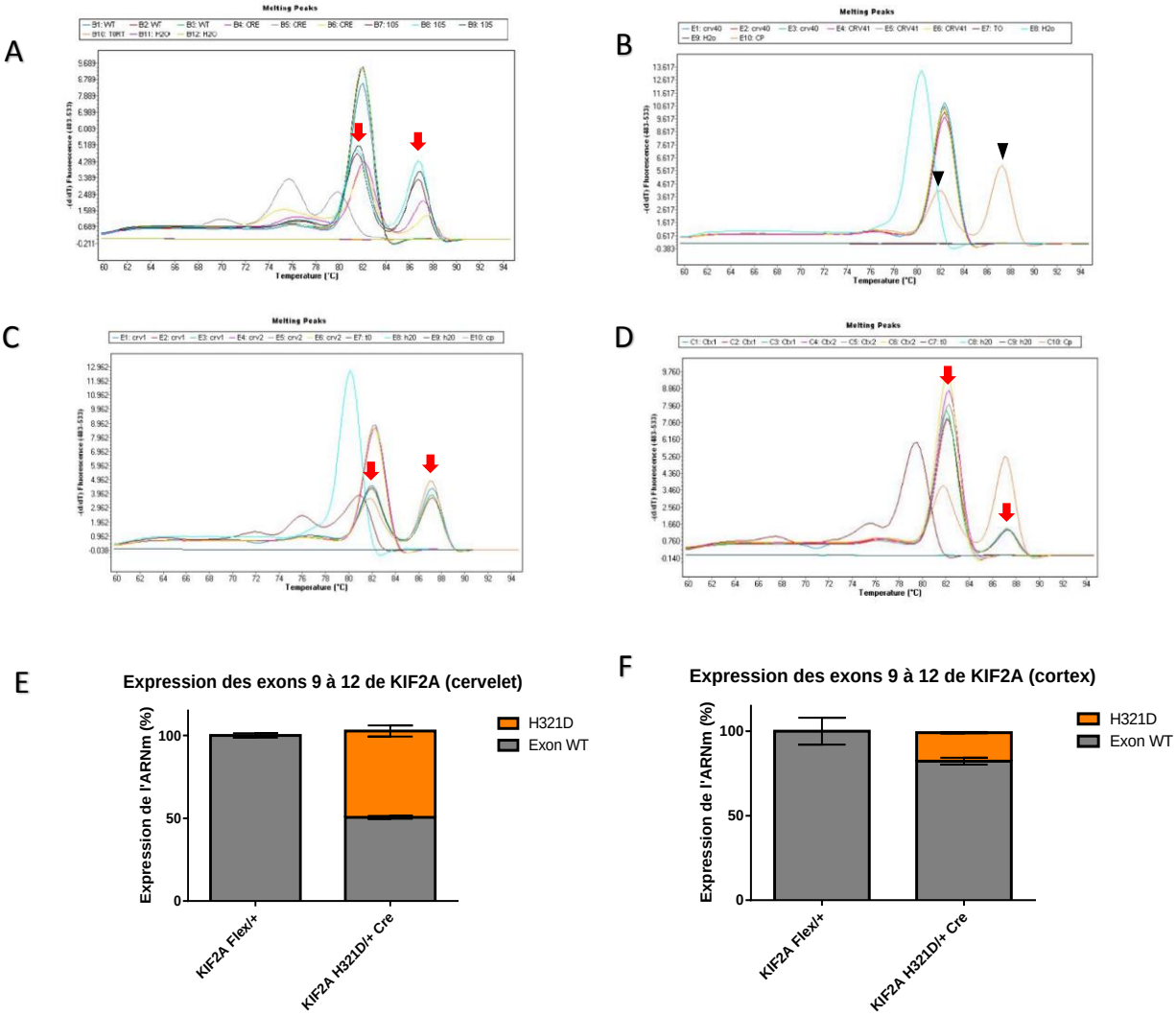
l'étude de ce modèle, il est possible d'évaluer les conséquences de la mutation sur le fonctionnement neuronal et la survenue des symptômes cliniques en l'absence des anomalies hippocampiques et corticales observées lors de l'embryogénèse.

Résultats :

Les souris KIF2A$^{Flex/+}$ sont ainsi croisées avec une souche murine dont le génome comporte une construction Rosa-Cre^{ERT2} afin d'obtenir des souches KIF2A$^{H321D/+}$ Rosa-Cre^{ERT2}. La Cre recombinase est donc placée sous le contrôle d'un promoteur à expression ubiquitaire (Rosa 26) permettant à la Cre d'être transcrite dans l'ensemble des cellules quel que soit le stade de développement (Soriano, 1999). Toutefois, à la naissance, l'exon humain muté est silencieux et l'allèle murin sain s'exprime car la Cre est séquestrée dans le cytoplasme. L'administration de tamoxifène à ces souris permet la translocation de la Cre-recombinase dans le noyau et les remaniements de la séquence Flex et donc l'expression de l'allèle KIF2A muté. Ainsi, le contrôle temporel de l'expression de la mutation est assuré par l'administration du tamoxifène. L'administration de tamoxifène a été réalisée à des périodes différentes du développement sur deux groupes d'animaux distincts. Un premier groupe a reçu du tamoxifène par voie intrapéritonéale durant la 6ème semaine de vie. Cette injection tardive avait pour objectif d'évaluer l'impact de la mutation sur un cerveau dont les réseaux neuronaux étaient déjà fonctionnels. Le second groupe a reçu du tamoxifène par voie intragastrique à P1, P2 et P3. Cette administration postnatale précoce avait pour objectif d'évaluer l'impact de la mutation sur les étapes de différenciation des neurones et leurs éventuelles conséquences phénotypiques. Pour vérifier l'effectivité de la recombinaison génétique induite par le tamoxifène, des prélèvements de queue et de cerveau ont été réalisés chez des souris KIF2A$^{H321D/+}$ Rosa-Cre^{ERT2} et des souris KIF2A$^{Flex/+}$. En effet, l'ensemble des souris a reçu du tamoxifène et seules celles ayant la Cre recombinase étaient en mesure de subir la recombinaison génétique souhaitée. A partir de ces prélèvements, une RT-qPCR et un séquençage Sanger sur l'ARN totale de la queue et différentes structures du cerveau a été réalisée afin de quantifier l'expression de l'exon mutant et la présence de la mutation après injection de tamoxifène à 6 semaines et à P1, P2, P3.

Dans le groupe ayant reçu du tamoxifène durant la 6ème semaine de vie, les courbes de fusion des qPCR réalisées à partir de tissu périphérique (queue) révèlent la présence d'un double pic, uniquement chez la souris KIF2A$^{H321D/+}$ Rosa-CreERT2 (figure 1A). En revanche, la souris KIF2A$^{Flex/+,}$ dépourvue de Cre recombinase n'en présente qu'un seul. La présence de deux pics est liée au fait que l'exon 10 humain porteur de la mutation est dégénéré : sa séquence nucléotidique est donc très différente de l'allèle normal (Données détaillées dans l'article 2). Par conséquent les températures de fusion de l'exon 10

murin et de l'exon 10 humain dégénéré sont différentes se traduisant par un aspect en double-pic sur les courbes de fusion. Ainsi, la présence d'un double pic dans cette population confirme l'effectivité de la recombinaison génétique au niveau du tissu périphérique. En revanche, une seule population a pu être identifiée lorsque cette même technique a été réalisée à partir de l'ARN du SNC, traduisant l'absence de recombinaison efficace à ce niveau (figure 1B). Dans le groupe de souris après injection à P1, P2, P3, les courbes de qPCR ciblant la construction Flex révèlent que le double pic est présent lorsque l'extraction est réalisée à partir du cervelet et du néocortex (figures 1C et 1D). La présence du double pic montre l'effectivité de la recombinaison. A partir de l'aire des différents pics des courbes de fusion, nous avons pu estimer le niveau d'expression de l'exon dégénéré par rapport à l'exon WT. Il apparait que cette expression est de l'ordre de 50% au niveau du cervelet et comprise entre 15 et 20% au niveau du cortex cérébral (figures 1E et 1F). Au final, uniquement les animaux ayant bénéficié de l'administration précoce de tamoxifène (P1-P2-P3) présentent donc une recombinaison effective au niveau du système nerveux central. Nous avons par conséquent limité les investigations suivantes à ce groupe d'animaux. Nous avons complété nos vérifications par un séquençage de l'ADNc afin de confirmer que l'exon détecté en qPCR était bel et bien porteur de la mutation c.961C>G (p.His321Asp). L'ADNc des souris KIF2A$^{H321D/+}$ Rosa-CreERT2 et des souris KIF2A$^{Flex/+}$ a d'abord été séquencé à l'aide d'amorces spécifiques de la construction complète (Flex) et des amorces de l'exon dégénéré. Les séquences obtenues sont similaires à celles du modèle KI constitutif précédemment utilisé par notre équipe et confirment la présence hétérozygote de la mutation c.961C>G (p.His321Asp) chez les souris KIF2A$^{H321D/+}$ Rosa-CreERT2 (figure 1G).



G

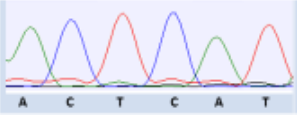
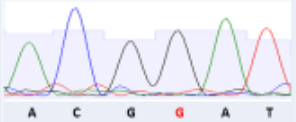
Souris/ Primer	Séquence	Résultat
KIF2A$^{Flex/+}$ Primer construction complete		Séquence « WT » (exon 10 murin)
KIF2A$^{H321D/+}$ Rosa Cre^{ERT2} Primer spécifique exon 10 humain		Séquence mutée (exon 10 humain dégénéré avec c961 C>G)

Figure 1 : Contrôle de l'effectivité de la recombinaison. A, B, C, D, E et F : Courbes de fusion obtenues par qPCR à partir des amorces de la séquence Flex. A : la qPCR réalisée à partir de l'ADNc obtenu sur la queue après administration de tamoxifène à 6 semaines de vie révèle la présence de deux pics d'amplification différents (flèches rouges), signant l'efficacité de la recombinaison. B : un seul pic est observé pour l'ADNc obtenu à partir du cerveau chez les animaux ayant subi le même protocole traduisant l'absence de recombinaison à ce niveau. Seul le contrôle positif présente deux pics (triangles noirs). C & D : deux pics d'amplification sont observés pour l'ADNc extrait à partir du cervelet (C) et du cortex cérébral(D) chez les souris traitées par tamoxifène dès le premier jour de vie. E&F : L'expression relative de l'exon porteur de la mutation est proche de 50% dans le cervelet (E) et de l'ordre de 20% dans le cortex (F). L'expression relative est calculée par rapport à l'expression moyenne de l'exon 10 murin chez les souris KIF2A$^{Flex/+}$. G : Le séquençage de l'ADNc extrait du cerveau de la souris KIF2A$^{Flex/+}$ (contrôle) ne met en évidence qu'une seule population, correspondant à la séquence de l'exon 10 murin, dépourvu de mutation. Le séquençage de l'ADNc de la souris KIF2A$^{Flex/+}$ Rosa Cre^{ERT2} (mutante) à l'aide du primer spécifique de l'exon muté confirme la présence de la mutation c.961C>G.

Nous avons ensuite réalisé des Western-blots dirigés contre la protéine KIF2A pour vérifier que la présence de la mutation ne conduisait pas à une dégradation de celle-ci, générant un pseudo modèle KO hétérozygote. Une extraction de protéine a été réalisée à partir du SNC, en séparant cortex cérébral et cervelet chez 2 souris mutantes et 3 souris contrôles, âgées de 6 semaines. La quantification de l'intensité des bandes de KIF2A met en évidence que le niveau d'expression de la protéine KIF2A est similaire chez les souris contrôles et mutantes, tant au niveau du cortex (intensité moyenne à 100% contre 95.54% p=0.8), que du cervelet (intensité moyenne à 94.4% contre 115.5%, p=0.8) (figure 2). Ces données confirment la stabilité de la protéine mutante et l'obtention d'un modèle KI hétérozygote.

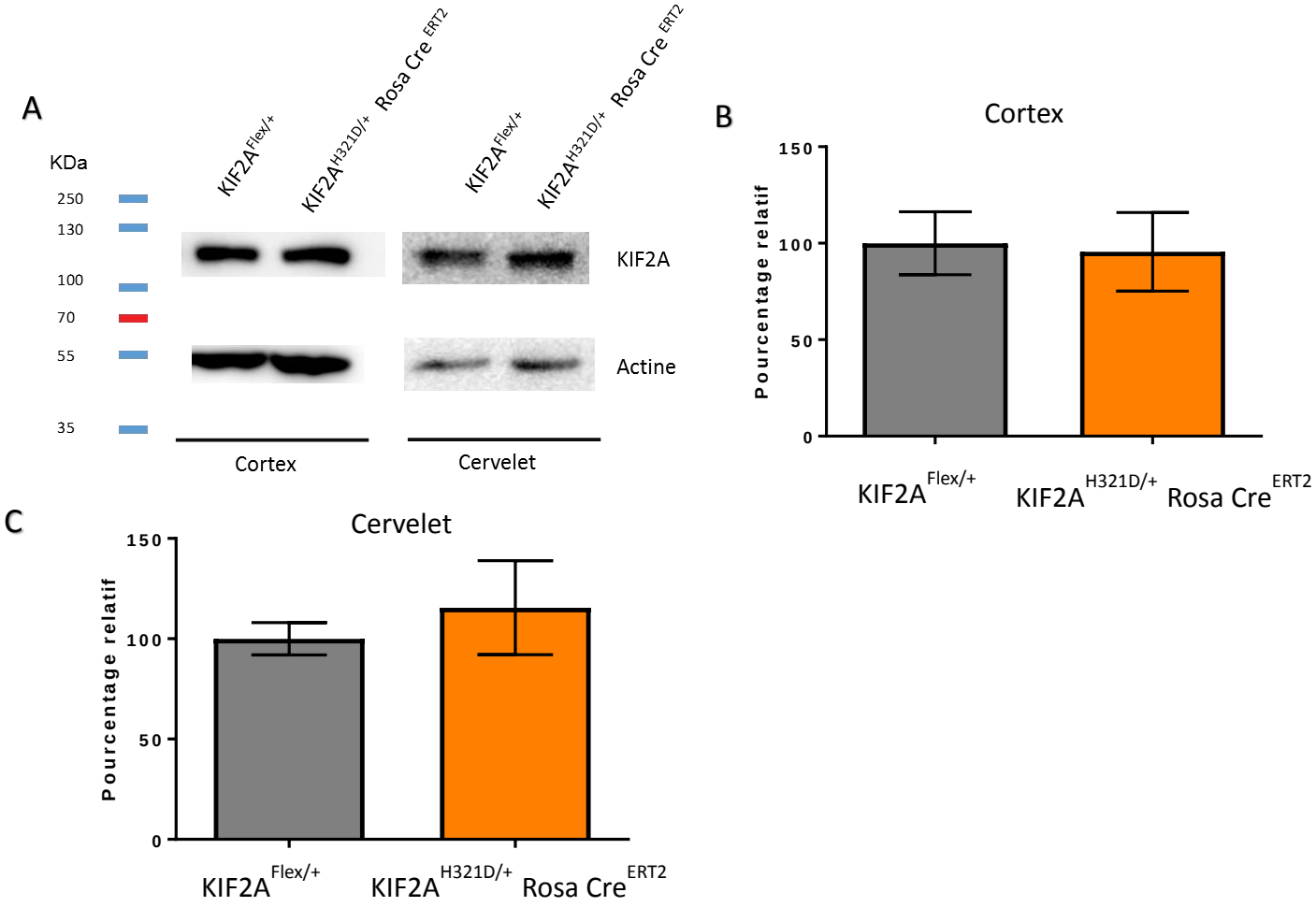


Figure 2 : Contrôle de la stabilité protéique de KIF2A dans le modèle Cre-ERT2. A : Les protéines ont été extraites à partir du cortex et du cervelet des souris. Le contrôle de charge est réalisé par évaluation de la quantité d'actine. B & C : La quantité de protéine est exprimée en pourcentage relatif de la quantité moyenne d'actine des souris contrôles. Les quantités de protéines ne sont pas statistiquement différentes entre les souris contrôles ($KIF2A^{Flex/+}$) et les souris mutantes ($KIF2A^{Flex/+}$ Rosa Cre^{ERT2}) tant niveau du néocortex (intensité moyenne à 100% contre 95.54%, p=0.8 ; t-test) que du cervelet (intensité moyenne à 94.4% contre 115.5%, p=0.8 ; t test).

Deux souris de chaque groupe (KIF2A$^{H321D/+}$ Rosa-Cre^{ERT2} et KIF2A$^{Flex/+}$) ont été sacrifiées à l'âge de 6 semaines avec un protocole de perfusion intracardiaque avec de la PFA. Sur le plan macroscopique, les souris mutantes présentent une tendance à l'hypotrophie globale par rapport aux souris contrôles (figure 3A). En revanche, le volume cérébral est relativement similaire (figure 3B). Sur le plan histologique, aucune MDC n'est observable chez les mutants par comparaison avec les souris contrôles. L'organisation néocorticale et hippocampique apparait conservée, sans désorganisation des couches ni hétérotopie (figure 3 C,D). Chez les mutants, on observe toutefois dans certaines cellules le phénotype cellulaire reflet de la recombinaison et caractéristique de la mutation p.His321Asp caractérisé par une relocalisation de la protéine KIF2A (figure 4A). Cet aspect, rappelle le phénotype constaté dans les neurones du modèle murin constitutif mais également dans les fibroblastes de patients. Ce phénotype est présent au niveau néocortical (figure 4A) mais est absent au niveau hippocampique où la protéine conserve sa répartition homogène, chez les mutants comme chez les contrôles (figure 4B).

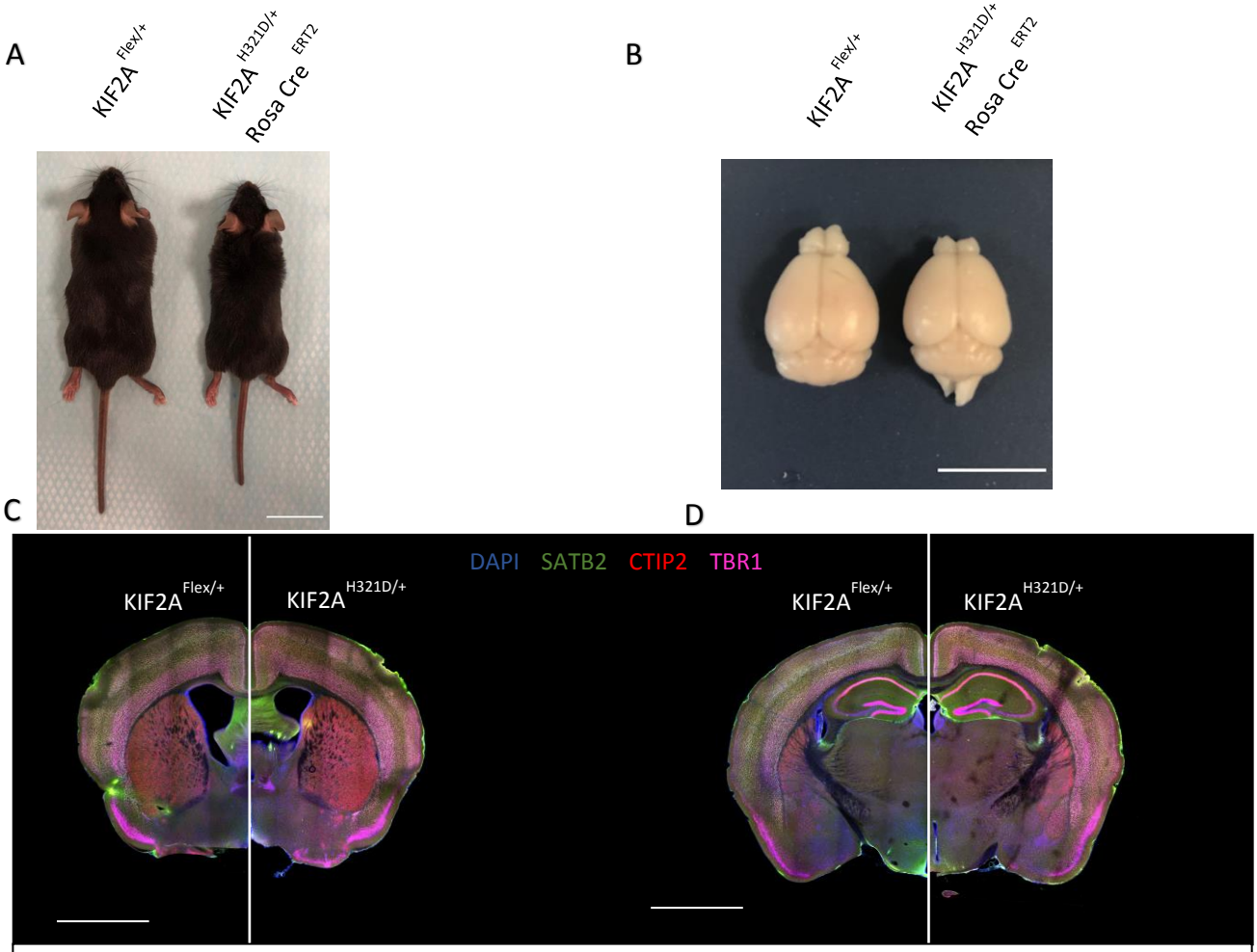


Figure 3 : Données macroscopiques et histologiques du modèle CRE-ERT2. A : Photographie comparative de la souris contrôle (gauche) et mutante (droite). Échelle à 2cm. La souris mutante présente une discrète réduction de taille comparativement à la souris contrôle. B : Photographie comparative des cerveaux des souris contrôle (gauche) et mutante (droite). Échelle à 1cm. La taille des cerveaux est sensiblement comparable entre les 2 souris. C & D : Immunohistochimie sur coupe frontale antérieure (C) et postérieure (D) de cerveau réalisée à l'aide d'un marquage DAPI, d'anticorps anti TBR1, SATB2 et CTIP2. Échelle à 0.2cm. La souris contrôle (hémi-cerveau gauche) et mutante (hémi-cerveau droit) montrent une organisation histologique comparable, sans anomalie morphologique néocorticale ou hippocampique notamment.

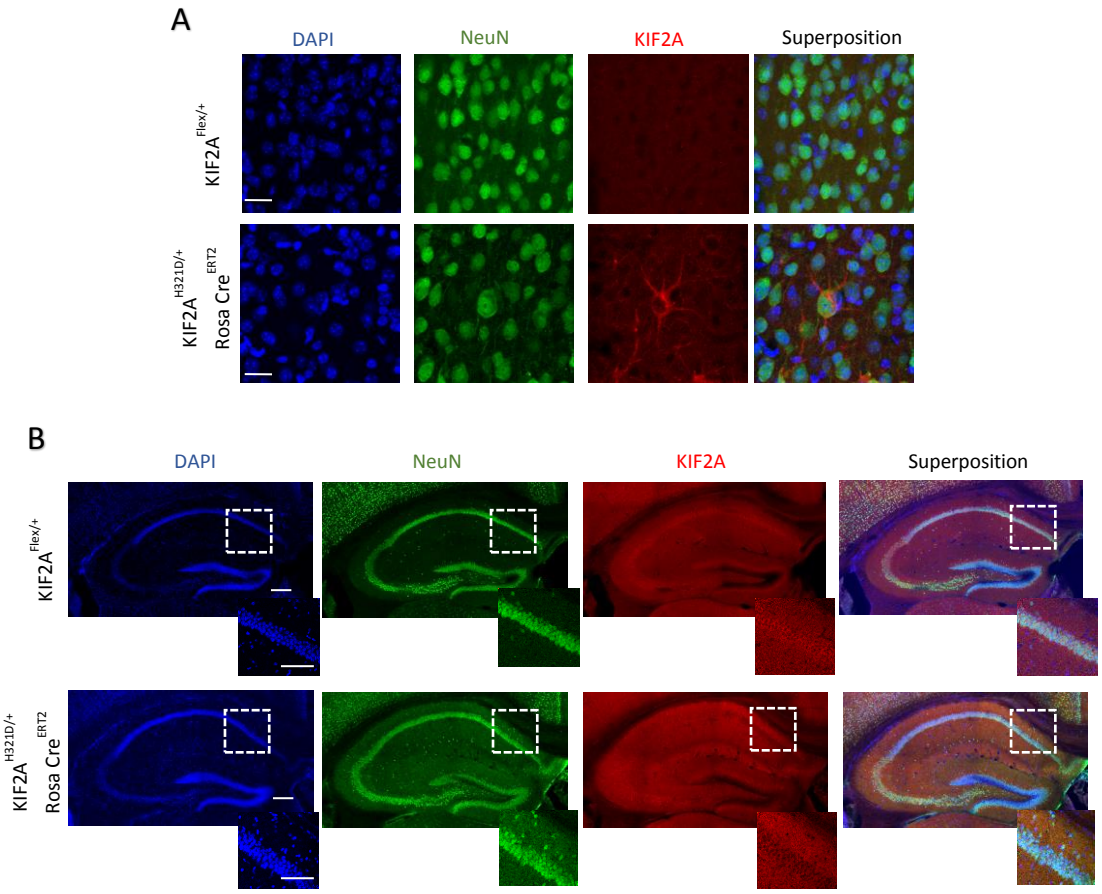


Figure 4 : La perturbation de la localisation de KIF2A est présente dans le modèle CRE-ERT2 uniquement dans le cortex. A : La souris mutante montre une modification de la localisation de la protéine KIF2A au sein des neurones mature (NeuN) similaire à celle observée dans le modèle constitutif (Échelle : 20µm). B : Immunohistochimie de l'hippocampe d'une souris contrôle et mutante réalisée à l'aide des mêmes anticorps. Échelle à 200µm et 100µm (encart). Le profil de distribution de KIF2A est homogène et similaire chez les deux souris. Aucune anomalie structurelle n'est visible, y compris dans la région CA1.

Des EEG de surface après implantation d'électrodes ont été réalisés sur des souris de chaque génotype à 13 semaines. Un premier enregistrement a été réalisé durant 30 minutes, en l'absence de tout traitement pharmacologique. Chez les quatre souris (2 contrôles, 2 mutantes), le rythme de fond s'organise avec une fréquence comparable et ne comporte aucun grapho-élément pathologique durant cette période (figure 5). De même, aucune séquence de crise épileptique, clinique ou électrique isolée, n'est enregistrée. Pour compléter l'exploration, le deuxième temps de l'enregistrement a été réalisé après administration de PTZ à la dose de 10mg/kg. Le PTZ est un antagoniste gabaergique qui permet de favoriser l'induction d'une crise d'épilepsie, et d'observer les prédispositions d'un organisme à réaliser ce type de crise (Dhir, 2012). Une minute après l'injection de PTZ, nous avons pu observer une crise généralisée chez les souris mutantes illustrées par le tracé d'EEG tandis que les souris contrôle n'ont pas présenté de signe épileptique (Figure 5).

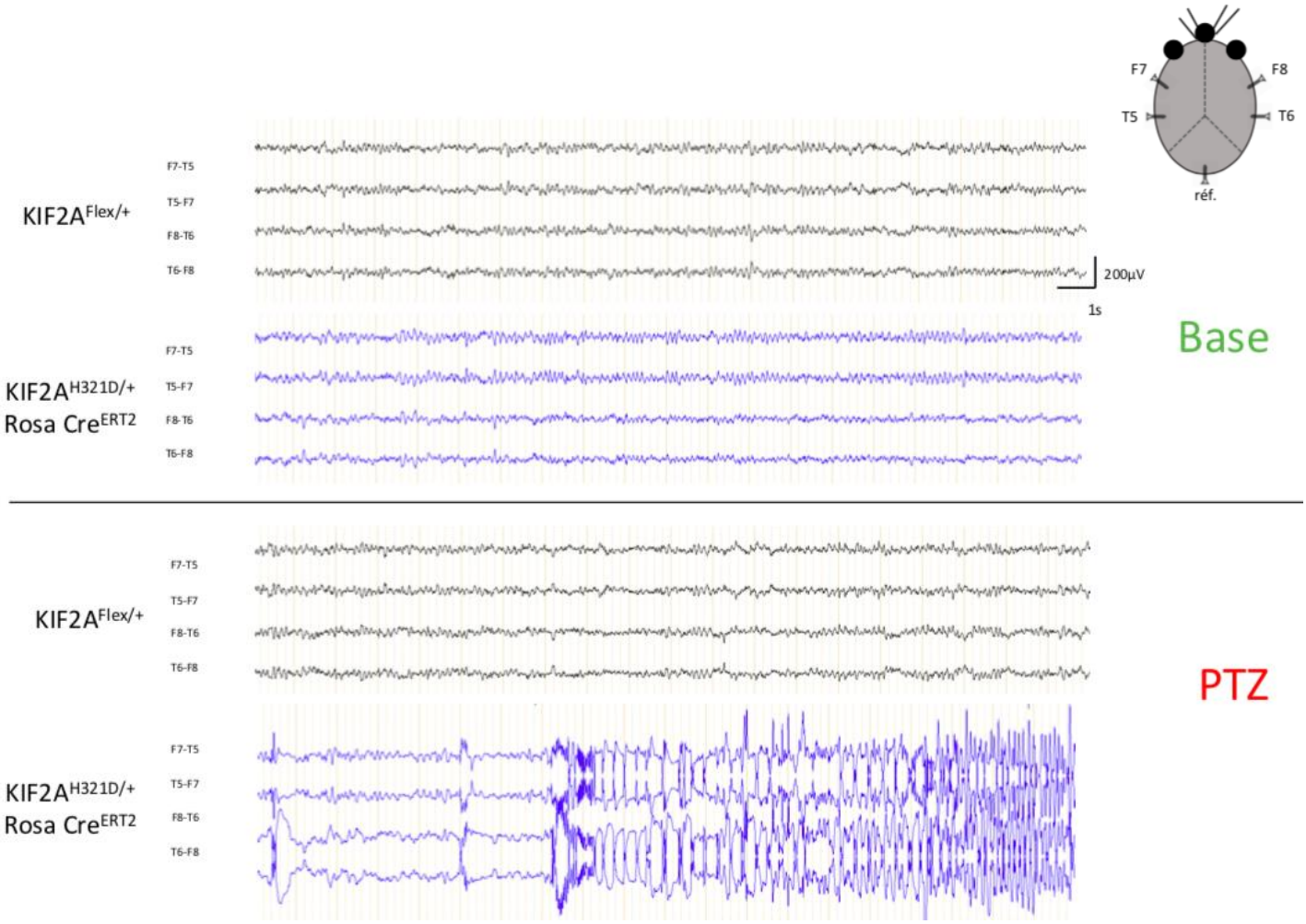


Figure 5: L'expression post-natale de la mutation de KIF2A suffit à l'induction d'une susceptibilité à l'épilepsie.
Dans la partie haute de cette figure, le tracé EEG avant injection de PTZ. Aucun grapho-élément pathologique spontané n'est présent chez la souris mutante KIF2A$^{H321D/+}$ Rosa-Cre^{ERT2}. Dans la partie basse, une minute après l'injection de 10mg/kg de PTZ, la souris mutante KIF2A$^{H321D/+}$ Rosa-Cre^{ERT2} présente une crise d'épilepsie, illustrée par les décharges de pointes répétées sur l'EEG. Tandis que la souris contrôle KIF2A$^{Flex/+}$ ne présente aucun grapho-élément (Échelle : X : 1sec, Y : 200 µV).

Discussion et conclusion :

Lors de cette étude, nous avons tenté d'exprimer la mutation hétérozygote *KIF2A* p.His321Asp uniquement en période post-natale à l'aide de l'utilisation du modèle knock-in conditionnel KIF2A et d'une souris Rosa-CreERT2. En effet, le croisement entre ces deux modèles murins nous a permis de contrôler par l'injection de tamoxifène le moment d'expression de la Cre recombinase et donc le moment de recombinaison du modèle Cre-Lox permettant l'expression de la mutation p.His321Asp. Afin d'étudier des processus post-nataux différents, nous avons établi deux protocoles d'injection du tamoxifène. Un premier, avec des injections à partir de 6 semaines afin d'étudier l'influence de l'expression de la mutation sur un réseau neuronal déjà mature, le second entre les jours post-nataux 1 et 3 afin d'exprimer la mutation très précocement et étudier son impact sur un réseau en cours de maturation. Les résultats de la qPCR ont montré une inefficacité de la Cre recombinase à recombiner dans le cerveau à 6 semaines, tandis que cela fonctionne dans les tissus périphériques tels que la queue. En revanche, le protocole d'injection plus précoce nous a permis d'obtenir l'expression de la

mutation avec des variations d'expression de celle-ci en fonction des structures cérébrales, allant de 20% pour le cortex à 50% pour le cervelet. Pour l'heure, nous n'avons pas d'explication sur la variabilité d'expression de la mutation en fonction des tissus mais il semblerait que celle-ci soit liée au modèle ROSA-CreERT2, ou à l'environnement chromatinien et l'influence sur l'expression de la Cre-recombinase. Ensuite, nous avons étudié l'expression de KIF2A par western-blot afin de confirmer la stabilité de la protéine mutée et prouver que le modèle KIF2A CreERT2 est fonctionnel.

Le but de l'utilisation de ce modèle était de permettre le développement cortical normal chez la souris et d'évaluer si l'expression de la mutation KIF2A p.His321Asp, uniquement après la naissance suffit et/ou permet l'induction des phénotypes cliniques observés dans le modèle constitutif. Tout d'abord, à l'aide de l'immunohistochimie sur des coupes de cerveau, nous avons pu établir que la souris mutante CreERT2 ne comporte aucune malformation corticale notoire par comparaison avec une souris contrôle. En effet, l'observation microscopique des structures modifiées dans le modèle constitutif telles que le cortex et le CA1 de l'hippocampe, ne présente aucune modification, démontrant que l'utilisation de ce modèle est en adéquation avec les objectifs de notre étude. De plus, les investigations immuno-histologiques sur la protéine KIF2A dans les coupes de cortex des souris mutantes ont montrées le phénotype de localisation anormale de la protéine observée précédemment dans les fibroblastes de patients et dans le modèle constitutif. Cependant, nous avons observé ce phénotype uniquement dans le cortex mais pas dans l'hippocampe. Pour finir, nous avons réalisé des explorations électroencéphalographiques sur ces souris afin de répondre à la question de la participation de KIF2A dans l'induction de l'épilepsie posée par cette étude. Lors de ces explorations, nous n'avons pas observé de crise d'épilepsie spontanée, en revanche après injection de PTZ, nous avons observé des crises d'épilepsie généralisées chez les souris mutantes et pas chez les souris contrôles

A l'aide de ces résultats, nous avons pu observer que l'expression lors des stages précoces post-nataux de la mutation p.His321Asp suffit à l'induction d'une susceptibilité à l'épilepsie en absence de malformation du développement cortical. Nous pensons que l'ensemble de ces résultats apporte une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le phénotype clinique et sa dépendance, ou non, aux malformations du développement cortical. Ces travaux et des études similaires d'autre gène pourraient aussi aboutir à un changement de paradigme concernant la pathogénie des symptômes cliniques associés aux MDC et susciter le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Discussion

Durant ce travail de thèse, j'ai participé à l'étude des mécanismes physiopathologiques pour des mutations identifiées dans le gène KIF2A chez des patients présentant des malformations du développement cortical. Pour cette étude nous avons utilisé les fibroblastes des patients et l'électroporation *in-utero* chez la souris et nous avons pu montrer que les mutations de *KIF2A* entrainent des modifications de la prolifération et du positionnement neuronal associées à des anomalies de cycle cellulaire et de ciliogenèse.

Suite à ces résultats, nous avons généré un modèle murin « knock-in » exprimant conditionnellement la mutation p.His321Asp de *KIF2A* en modifiant la technologie FLEx basée sur le système Cre-Lox. Ce modèle souris a été mis au point en collaboration avec l'institut de la clinique de la souris. L'utilisation de ce modèle et de ses propriétés conditionnelles a permis d'étudier de manière plus physiologique, les différents processus perturbés par les mutations de *KIF2A* lors du développement cortical. Dans un premier temps, j'ai caractérisé ce modèle après croisement avec différentes souches de souris exprimant la Cre recombinase sous l'influence de différents promoteurs. En effet, le croisement avec la souris Rosa-Cre a permis d'exprimer la mutation de manière constitutive et mimer la situation du patient, celui avec la souris Nestin-Cre a permis de restreindre l'expression de la mutation aux différents progéniteurs neuronaux et pour finir le croisement avec la souris Nex-Cre a permis d'exprimer la mutation uniquement dans les neurones post-mitotiques. Ces différents modèles d'expression ciblée de la protéine nous ont permis de disséquer les processus impliqués dans la pathogénie des MDC.

I. La technologie FLEx II, une stratégie universelle pour la génération de KI conditionnel et l'étude des pathologies d'origine génétique

Dans le cadre de mes travaux de thèse, nous avons développé et caractérisé un nouveau type de modèle murin adapté à la dissection des conséquences des mutations faux-sens impliquées dans des pathologies d'origine génétique. En effet lorsque la mutation génétique n'entraine pas une haploinsuffisance, l'étude de modèle souris KO n'est pas adaptée car elle ne modélise pas génétiquement la situation des patients. C'est pourquoi l'utilisation d'un modèle souris KI ciblée sur la mutation ponctuelle identifiée chez des patients est une meilleure méthode pour modéliser et reproduire les signes cliniques rapportés pour la pathologie. Cependant, à ce jour, ce type de modèle existe uniquement de manière constitutive, ne permettant aucun contrôle sur l'expression de la mutation. En revanche, le modèle KI conditionnel que nous avons utilisé permet le contrôle de l'expression d'une mutation ponctuelle dans le temps et dans l'espace. Ce modèle est basé sur le

modèle FLEx utilisant la technologie Cre-Lox décrite dans l'introduction dans la partie « Technologie FLEx » de cette thèse (Schnütgen and Ghyselinck, 2007; Schnütgen et al., 2003) et dans l'article 2.
De nombreuses études ont tenté de générer un modèle KI conditionnel en utilisant cette technologie ou d'autres méthodes mais très peu y sont parvenus. Les travaux de Scekic-Zahirovic et coll. sur la sclérose latérale amyotrophique, ont été menés en utilisant une approche permettant de remplacer l'expression de l'exon sain par un exon muté grâce à l'utilisation de séquence Lox encadrant l'exon sauvage et un codon stop avant l'exon muté. En présence de la CRE, cette séquence est délétée permettant à l'exon muté de s'exprimer (Scekic-Zahirovic et al., 2016). Cette stratégie fonctionne parfaitement mais uniquement lorsque la mutation est située dans le dernier ou avant dernier exon, ce qui limite le nombre de mutations ponctuelles étudiables. L'étude de Capulli et coll. a tenté d'utiliser la technologie FLEx afin de générer un modèle KI conditionnel, cependant le pourcentage d'identité entre l'exon sauvage et l'exon muté étant trop élevé cela a entraîné la formation de structures secondaires de l'ARN, une délétion de ces deux exon et finalement un modèle KO (Capulli et al., 2019). Cependant, une stratégie similaire à celle utilisée dans la technologie FLEx a permis la réussite du développement d'un modèle souris KI conditionnel. En effet, Obeng et coll. ont utilisé la même alternance des séquences LoxP et Lox muté que dans la technologie Flex mais ils ont placé deux exons sauvages en position sens et deux exons dont celui muté en position antisens à la place d'un exon dans la stratégie d'origine. Cela a permis l'expression conditionnelle de la mutation K700E de SF3B1 (Obeng et al., 2016). En revanche, il existe une limite à cette stratégie qui réside dans le fait que les exons doivent obligatoirement être de petite taille. Dans le cas d'exons de trop grande taille, la trop grande distance entre les séquences LoxP pourrait entraîner une réduction du pourcentage d'efficacité de la recombinaison par ces séquences comme l'illustre l'étude de Zheng et coll. (Zheng et al., 2000).
Afin de s'affranchir de toutes ces difficultés et contraintes pour le développement d'un modèle de souris KI conditionnel quel que soit la position de la mutation ponctuelle sur le gène, nous avons modifié la stratégie en utilisant les propriétés dégénérées du code génétique. En effet, plusieurs codons pouvant correspondre à un même acide aminé, nous avons modifié un à deux nucléotides de tous les codons de l'exon situé en position antisens afin de conserver la même séquence protéique excepté pour le codon porteur de la mutation. Ces modifications ont permis de réduire de manière significative le pourcentage d'identité entre l'exon murin en position sens et l'exon humain en position antisens et passer de 96% à 42% dans le cas de *KIF2A*. Cette stratégie a permis d'éviter, d'une part la formation de structures secondaires de l'ARN et d'autre part la formation d'un modèle KO (Figure 53). Cependant, l'insertion de ces mutations silencieuses peut diminuer l'efficacité de l'épissage lors de la transcription de l'ADN, d'où l'importance de tester la construction dans des cellules souches embryonnaires avant la génération du modèle pour vérifier qu'elle est fonctionnelle. Il faut également contrôler l'efficacité de la recombinaison *in-vivo* lorsque le modèle souris est généré.

Le développement de cette nouvelle technologie a été déployé pour la conception du modèle pour *KIF2A* et pour *NEDD4L*, deux gènes responsables de malformations du développement cortical. Pour NEDD4L, les malformations corticales développementales sont des hétérotopies périventriculaires. Dans les deux modèles murins, la vérification génétique et protéique a démontré que cette technologie est fonctionnelle et pourrait être utilisée pour l'étude des mécanismes physiopathologiques d'autres types de pathologies d'origines génétiques.

L'intérêt de ce modèle réside dans plusieurs aspects, tout d'abord certains modèles KI exprimant constitutivement une mutation ponctuelle ne sont pas viables car cette mutation est trop délétère ou rend les animaux stériles. Grâce à ce type de modèle, il est possible de contrôler l'expression de la mutation ponctuelle dans le temps et dans l'espace. Ces propriétés conditionnelles permettront de disséquer plus précisément l'impact de ces mutations, en l'exprimant par exemple uniquement dans un type cellulaire ou à un temps donné qui serait crucial dans l'induction de la pathologie. De plus, l'intérêt majeur dans l'utilisation de la technologie FLEx est la capacité à réaliser un sauvetage. En effet, en utilisant une stratégie inverse, il est possible de positionner l'exon dégénéré présentant la mutation en position de lecture de l'ADN et un exon sain en position antisens. Ce positionnement favorise l'expression de la mutation dès la formation du zygote puis la présence de la CRE permettra la délétion de l'exon muté et l'expression de l'exon sain permettant ainsi d'observer si l'expression de l'exon sain dans un type cellulaire donné ou à un temps donné permet de reverser les phénotypes induits par la mutation (Figure 54). La génération de ce modèle permet ainsi de modéliser de façon précise les pathologies liées à des mutations ponctuelles mais aussi de pouvoir mieux contrôler son expression et disséquer de façon précise les différents processus impliqués dans la pathologie.

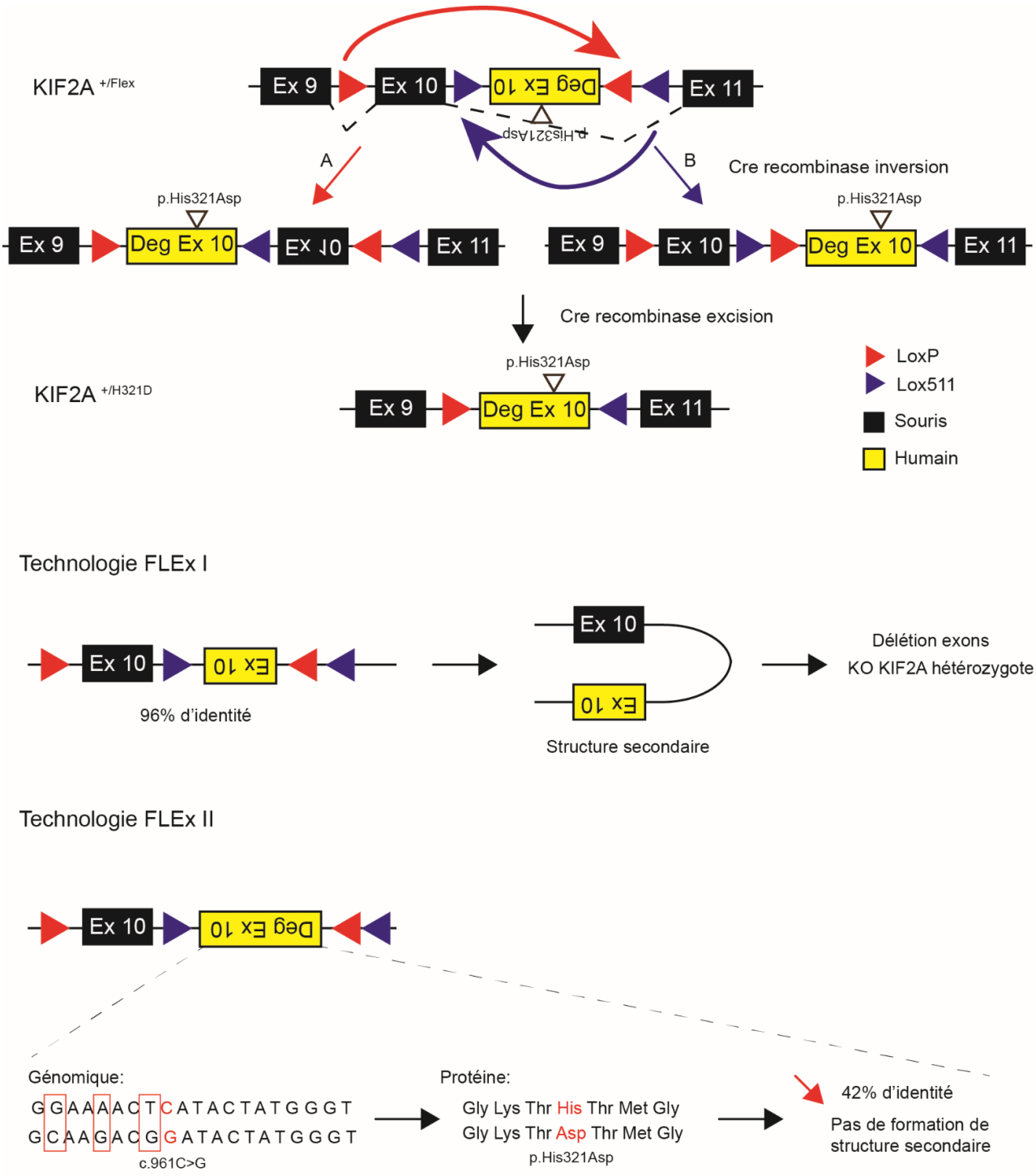


Figure 53 : La modification de la technologie FLEx permet la génération d'un modèle murin knock-in conditionnel.

La technologie FLEx est basée sur l'exon murin sauvage positionné dans le sens de lecture de l'ADN suivi par l'exon humain contenant la mutation en position antisens. Ces deux exons sont encadrés par des séquences LoxP et Lox mutées ne pouvant recombiner que spécifiquement entre elles. En présence de la Cre recombinase, l'un des deux couples de Lox effectue une inversion positionnant l'autre couple de manière à effectuer une excision. Le résultat de ce positionnement permet de déléter la séquence sauvage tandis que la séquence contenant la mutation s'exprime. Cependant en l'état cette technologie ne fonctionne pas car l'identité entre les exons est trop importante menant à la formation de structures secondaires, la délétion des deux exons et un KO hétérozygote de KIF2A. Afin d'éviter cela, nous avons dégénéré l'exon contenant la mutation en changeant les nucléotides de chaque codon pour conserver la même séquence protéique excepté pour la mutation, ce changement diminuant le pourcentage d'identité et évitant la formation de structures secondaires.

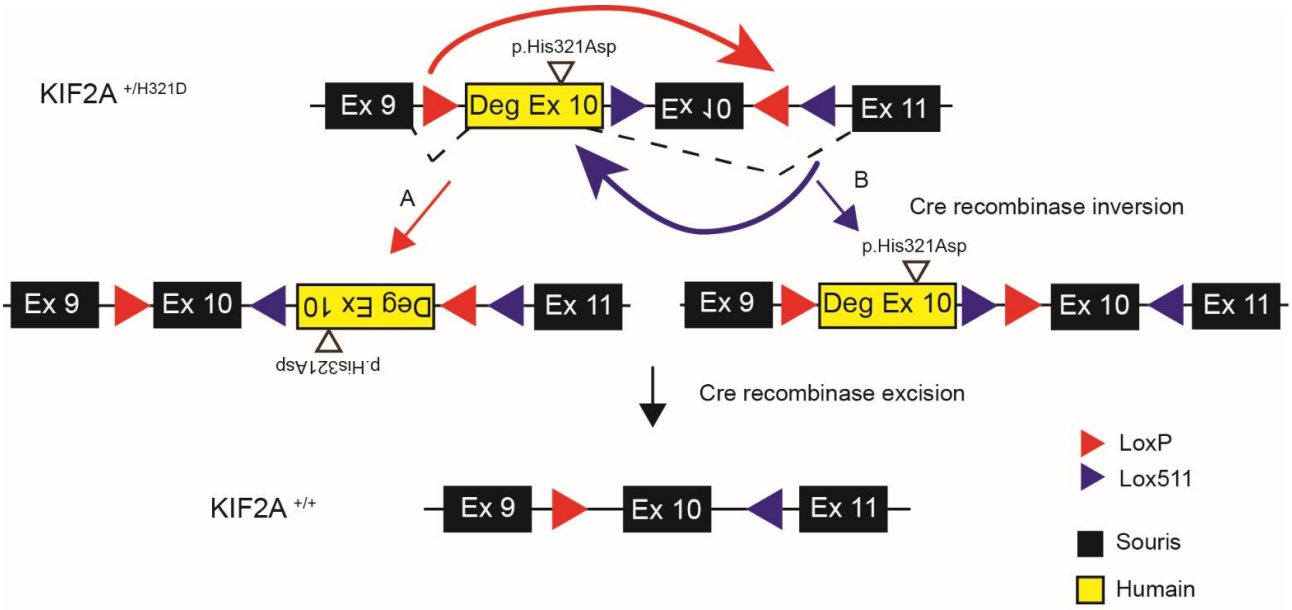


Figure 54 : Exemple de stratégie de sauvetage dans le cadre de la mutation KIF2A par l'utilisation de la technologie FLEx.
La technologie FLEx permet l'élaboration d'une stratégie de sauvetage afin d'évaluer la réversibilité des phénotypes causés par la mutation. En inversant la position entre l'exon humain dégénéré contenant la mutation et l'exon murin sauvage, il est possible grâce à cette technologie d'arrêter l'expression de la mutation et permettre d'activer l'expression de l'exon souris sauvage.

II. L'étude des mécanismes physiopathologiques des MDC lié aux mutations de KIF2A par l'utilisation du modèle murin Knock-in conditionnel.

Les études génétiques par séquençage Sanger et RT-qPCR ont confirmé l'efficacité et la fonctionnalité de la technologie FLEx modifiée que nous avons utilisé pour générer un modèle knock-in conditionnel pour KIF2A. De même, les études neuro-morphologiques du modèle souris KIF2A après croisement avec la souris Rosa-Cre, nous ont permis de reproduire les phénotypes corticaux identifiés chez le patient, en particulier la microcéphalie et les hétérotopies corticales et hippocampiques. De plus, les études comportementales et les enregistrements électroencéphalographiques ont confirmé la présence d'une hyperactivité, de troubles de la mémoire et une susceptibilité à l'épilepsie, des phénotypes cliniques caractéristiques des patients atteints de MDC. Enfin, l'étude neuro-développementale du modèle après croisement avec les souris Nestin-Cre et Nex-Cre a permis de mettre en évidence, une augmentation de la mort cellulaire lors des processus précoces de neurogénèse pouvant participer à l'induction de la microcéphalie. De plus, l'étude de la migration neuronale a montré une accumulation de neurones destinés aux couches superficielles du cortex dans la zone intermédiaire reliée à la perturbation de processus post-mitotiques et plus précisément une anomalie de la transition multipolaire-bipolaire lors de l'initiation de la migration.

Enfin, l'utilisation des propriétés conditionnelles du modèle KIF2A couplé à la technologie CRE-ERT2, nous a permis d'induire l'expression de la mutation par injection de tamoxifène en post-natal en

permettant un développement cortical normal chez la souris. Les enregistrements électroencéphalographiques réalisés à l'âge adulte chez ces souris, ont montré que des perturbations dans des processus postnataux induites par la mutation de KIF2A suffisent à induire de la susceptibilité à épilepsie.

L'ensemble des résultats obtenus par la surexpression de la protéine mutante et l'étude du modèle murin *in vivo,* soulève un certain nombre de questions que nous allons discuter. Les résultats obtenus par ces deux types d'approches, nous permettent de suggérer que les mutations de *KIF2A* agissent selon un effet dominant négatif. Ensuite, nous préciserons le rôle de KIF2A dans l'induction des MDC par sa fonction de dépolymérisation des microtubules. Dans une troisième partie, nous tenterons de préciser si l'effet des mutations de KIF2A s'exprime lors des processus prolifératifs ou post-mitotiques. Nous tenterons d'établir la relation entre la protéine KIF2A mutante et le phénomène d'apoptose observé dans le modèle souris. Enfin, les travaux réalisés sur le modèle KIF2A Cre-ERT2 nous permettrons de discuter si les crises d'épilepsies observées chez les patients atteints de MDC sont liées uniquement à l'altération des processus neuro-développementaux, post-nataux ou à une combinaison des deux.

1. L'impact des mutations de KIF2A à travers un effet perte de fonction ou dominant négatif ?

Toutes les mutations identifiées dans le gène *KIF2A* chez des patients atteints de MDC sont des variants hétérozygotes, *de novo* (Cavallin et al., 2016; Poirier et al., 2013; Tian et al., 2016). L'allèle muté induit la pathologie selon un mode autosomique dominant. La question qui se pose est de savoir si cette mutation hétérozygote agit par un mécanisme d'haploinsuffisance c'est à dire que la protéine n'est plus exprimée qu'à 50%, par un gain de fonction c'est à dire que la protéine est surexprimée ou dupliquée ou qu'elle obtient une nouvelle fonction différente de celle classique, ou par un effet dominant négatif c'est à dire que la mutation perturbe la fonction de la protéine sauvage exprimée par l'allèle non muté (Wilkie, 1994). Les études de surexpression de la protéine mutante réalisées sur le modèle murin et sur les fibroblastes de patients montrent que la protéine mutée est stable étant donné que nous n'avons pas observé de diminution de son expression que ce soit au niveau de l'ARN messager ou de l'expression protéique (Broix et al., 2017). De plus, le patient présentant une large délétion 5q12.1 emportant le gène KIF2A, ne présente qu'une déficience intellectuelle non associée à une malformation cérébrale (Jaillard et al., 2011). L'ensemble de ces résultats réfutent l'hypothèse d'un effet de la mutation par haploinsuffisance. En ce qui concerne le gain de fonction, lors de

l'utilisation du modèle KI ou des fibroblastes de patients, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'expression de KIF2A, ni de rôle différent de celui de la protéine au niveau des MT.

En revanche, l'ensemble des résultats que nous avons obtenus nous dirigent vers un effet dominant négatif. En effet, Les résultats de marquages de KIF2A sur fibroblastes de patients, par surexpression dans des cellules ou par électroporation *in-utero,* ainsi que l'étude du cortex du modèle souris KI, ont montré une relocalisation de KIF2A aux microtubules avec une perte quasi totale de sa localisation « classique » diffuse dans le cytoplasme. Ces observations confortent l'hypothèse d'une localisation anormale de la protéine engendrée par les mutations. KIF2A fonctionne sous la forme de dimère, et dans le cas d'une mutation hétérozygote 1/3 des dimères comprennent deux protéines sauvages, 1/3 une protéine sauvage et une protéine mutée, 1/3 deux protéines mutées. C'est à dire que dans ce cas de figure, 2/3 des dimères présenteront une localisation anormale liée à la mutation tandis que 1/3 pourront être correctement localisés, pouvant expliquer cette perte très significative de sa localisation normale.

Par ailleurs, lors des études du modèle murin « knock-out » constitutif homozygote de KIF2A et le modèle « knock-in » conditionnel pour la mutation p.His321Asp, nous avons pu observer de nombreux phénotypes similaires avec des anomalies de la migration neuronale dans le cortex et une accumulation de neurones dans la zone intermédiaire, des anomalies de la migration hippocampique avec des anomalies de lamination au niveau de CA1, CA3 pour le modèle KO, tandis que ces anomalies sont restreintes au CA1 pour le modèle KI. Si l'on compare le KO uniquement en post-natal de KIF2A avec notre modèle KI, des similitudes sont encore présentes avec une hypotrophie globale de la souris couplée à une diminution du poids par rapport aux souris contrôle mais également la présence de phénotypes comportementaux comme l'hyperactivité et la présence de crises d'épilepsie (Homma et al., 2003, 2018). Ces similitudes peuvent être liées au faite qu'une perte de fonction et un effet dominant négatif engendre une perte de sa fonction principale. En revanche, le modèle KO n'est pas viable et meurt lors du premier jour de vie par incapacité de se nourrir, tandis que le modèle KI est viable et ne présente pas de problème de mort prématurée. Nous pouvons penser que cette différence est due au faite que dans le modèle KO, l'intégralité de KIF2A n'est plus exprimée et donc son rôle n'est plus du tout présent, tandis que dans le modèle KI comme illustrée précédemment il resterait environ 1/3 des dimères de KIF2A fonctionnel et donc pouvant assurer leur rôle (Homma et al., 2003) (Figure 55). Ce constat est transposable à l'humain où KIF2A d'après la base de donné gnomAD ne supporte pas la perte de fonction totale et donc ne permet pas au fœtus d'être viable tandis que dans le cas des mutations faux-sens identifiées dans les MDC, ils le sont.

Phénotypes	Modèle Knock-out (Homma et al., 2003, 2018)	Modèle Knock-in p.His321Asp	Similitude
Viabilité	1 jour post-naissance	Normal	
Morphologie	Hypotrophie	Hypotrophie	
Poids	Diminution	Diminution	
Morphologie cérébrale	Ventricules élargies Atrophie structures matière blanche	Microcéphalie Atrophie hippocampe, cervelet et structures matières blanches.	
Mort cellulaire	Non décris	Importante entre E12 et E16	
Prolifération	Non étudiée	Absence de défaut évident	
Phénotype corticaux	Anomalie de migration	Anomalie de migration	
Phénotypes hippocampiques	Anomalie de migration CA1+CA3 Morphologie anormale	Anomalie de migration CA1	
Phénotype comportementaux	Hyperactivité	Hyperactivité + déficits cognitifs	
Épilepsie	Crises hippocampiques spontanées à contribution post-natale	Crises généralisées après injection de PTZ avec contribution post-natale	

Figure 55: Tableau comparatif entre le modèle murin Knock-out et Knock-in KIF2A.
Le comparatif entre la souris knock-out et la souris knock-in permet de montrer que plusieurs phénotypes sont similaires (en vert) ou partiellement similaires (en orange) pouvant expliquer que l'influence des mutations de KIF2A se traduit par une perte de fonction liée à un effet dominant négatif ou un effet intermédiaire. Cependant, des différences subsistent permettant de montrer que cet effet n'est pas lié à une haploinsuffisance.

De plus, nous retrouvons de nombreux phénotypes communs entre les modèles KO et KI mais ceux-ci ne sont pas identiques avec des différences morphologiques du cerveau et la présence d'une mort cellulaire élevée chez le KI. Ces différences suggèrent que les mécanismes perturbés sont les mêmes mais que l'effet induit par l'absence de la protéine ou par une protéine présentant une mutation ponctuelle est différent (Figure 55).

Bien que les données soient en faveur d'un effet dominant négatif, nous avons aussi utilisé l'approche d'EIU pour réaliser des expériences de « sauvetage » (rescue) du phénotype en surexprimant la protéine sauvage en même temps que les protéines mutées. Cependant, comme la surexpression de

la protéine sauvage elle-même entraine aussi des anomalies de positionnement neuronal, il n'a pas été possible de consolider l'hypothèse d'un effet dominant négatif par cette approche.

2. L'impact des mutations de KIF2A sur le neuro-développement par son action sur les microtubules

KIF2A est une protéine associée au cytosquelette de MT, qui par son activité de dépolymérisation, permet de réguler la dynamique des MT (Desai et al., 1999). Lors des études par surexpression des mutations, sur les fibroblastes de patients et le modèle KI conditionnel, nous avons pu démontrer que les mutations de KIF2A mènent à une séquestration de la protéine aux MT et à des dérégulations de la dynamique des MT et de plusieurs processus associés (Broix et al., 2017; Poirier et al., 2013). Il est donc important de comprendre par quels mécanismes les mutations de KIF2A induisent des MDC. Cet effet s'exerce-t-il par un effet direct de la protéine sur la régulation des processus cellulaire critiques pour le neuro-développementaux ou par un effet indirect en agissant sur la dynamique du cytosquelette de MT.

De nombreuses études tentant de comprendre la fonction de KIF2A dans différents modèles et types d'organismes ont montré un rôle exclusivement moteur impliqué dans la régulation de la dépolymérisation des MT. Jusqu'à présent aucune autre fonction de la protéine n'a pu être spécifiquement identifiée (Desai and Mitchison, 1997; Maor-Nof et al., 2013; Miyamoto et al., 2015; Ogawa and Hirokawa, 2015; Ogawa et al., 2017; Schimizzi et al., 2010; Trofimova et al., 2018). En reliant le phénotype de séquestration de KIF2A aux différentes étapes de son mécanisme de dépolymérisation, nous pouvons penser que KIF2A conserve sa capacité à fixer l'ATP, étape nécessaire et indispensable pour fixer les MT. De plus, nos études sur la protéine mutante purifiée montrent l'incapacité de celle-ci à dépolymériser les MT *in-vitro* et peuvent expliquer sa séquestration aux MT. En effet, lors des dernières étapes du mécanisme de dépolymérisation, KIF2A termine l'hydrolyse d'ATP afin de retirer les dimères de tubulines et donc se détacher des MT. Nous pouvons donc penser que c'est ce processus d'hydrolyse qui est perturbé expliquant la perte de capacité de dépolymérisation de la protéine et son blocage sur les MT (Ogawa et al., 2017; Trofimova et al., 2018). Lors de nos études mécanistiques sur les fibroblastes de patient par l'étude de la dynamique des microtubules par analyse en temps réel des comètes EB3 et par l'étude de la cinétique de dépolymérisation par traitement au nocodazole, nous avons pu constater que la mutation de KIF2A entraine une modification de la dynamique des MT par une modification de la balance entre polymérisation/dépolymérisation qui a pu être confirmée par une diminution du nombre de MT

dépolymérisés après injection de nocodazole, une drogue bloquant la polymérisation des MT (Figure 56).

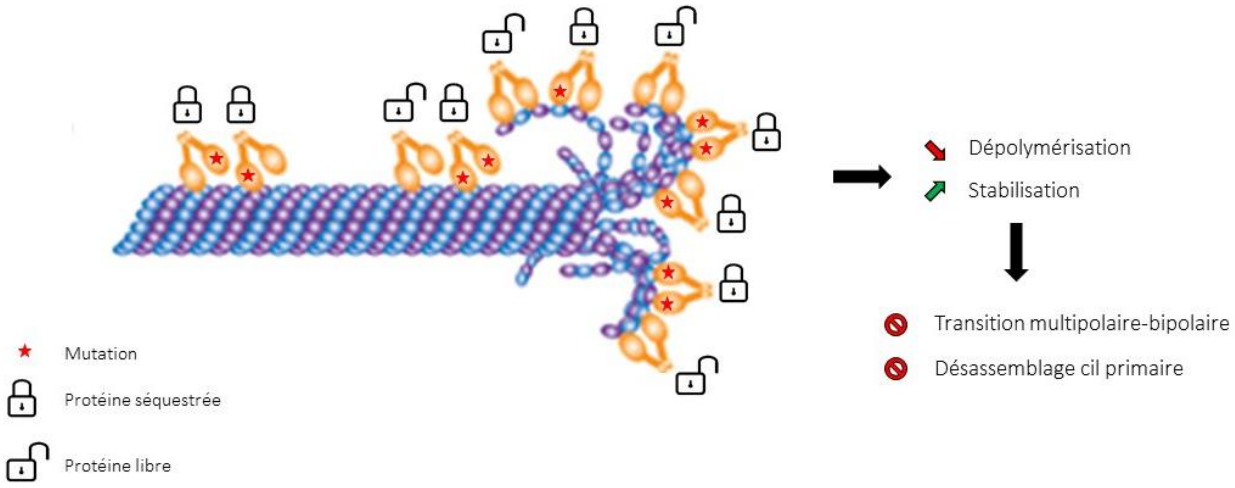


Figure 56: L'impact des mutations de KIF2A sur les microtubules et les processus neuro-développementaux
KIF2A fonctionnant sous la forme de dimère, une mutation dans un monomère de KIF2A (étoile rouge) est suffisante pour séquestrer la protéine au niveau des microtubules (cadenas fermé). Dans ce modèle uniquement 1/3 des protéines seront fonctionnelles (cadenas ouvert). Cette perte des 2/3 de la fonction de KIF2A entraine une diminution de la dépolymérisation des microtubules couplée à une stabilisation des MT entrainant des anomalies de la transition multipolaire-bipolaire et des anomalies de désassemblage du cil primaire.

Dans ce modèle, nous proposons que cette absence de dépolymérisation des MT par KIF2A entraine une stabilisation des protofilaments pouvant être reliée à de nombreux processus perturbés lors du développement cortical. Il est possible de corréler cette modification de la dynamique des MT aux problèmes de transition multipolaire-bipolaire observés dans le modèle KI. En effet, la dépolymérisation de KIF2A permet la suppression des branches collatérales des neurones, comme ont pu le démontrer plusieurs études (Homma et al., 2003; Ogawa and Hirokawa, 2015). A l'aide de ces études, nous pouvons penser que les anomalies de dépolymérisation des MT provoquées par les mutations de KIF2A peuvent mener à des anomalies de suppression de collatérales et donc bloquer la transition multipolaire-bipolaire et l'initiation de la migration ce qui explique la présence de neurones anormalement positionnés dans la ZI.

Par ailleurs, KIF2A est également impliquée dans le désassemblage du cil primaire par la dépolymérisation des MT (Miyamoto et al., 2015). Il est donc envisageable que les anomalies de dépolymérisation des MT entrainent une absence de désassemblage du cil primaire entraînant un blocage de la transition entre les phases G1 et S du cycle cellulaire perturbant la prolifération de

progéniteurs neuronaux comme observé lors de la surexpression par électroporation *in-utero* (Broix et al., 2017). De plus, l'accumulation de protéine KIF2A peut perturber d'autres processus le long des MT, tels que la fixation de différentes MAP le long des protofilaments mais également gêner les processus de transport intracellulaire. L'ensemble de ces observations permettent de suggérer un effet indirect de KIF2A sur le neuro-développement en déstabilisant la dynamique des microtubules et ses processus associés.

3. Les tubulinopathies et MDC liées aux protéines associées aux microtubules : Une convergence des mécanismes physiopathologiques ?

Les tubulinopathies regroupent l'ensemble des MDC induites par des mutations dans les gènes codant pour des sous unités de tubulines. Les MT étant impliqués dans de nombreux processus du développement cortical, le spectre de malformations répertoriées dans les tubulinopathies est large, allant de la microcéphalie à différent types de LIS. Au cours de ces dernières années, les avancées technologiques dans le domaine du diagnostic génétique ont permis d'identifier de nombreuses mutations dans des MAP telles que *KIF2A, KIF5C, DCX, LIS1,* etc... Cependant, ces mutations ne sont pas répertoriées en tant que tubulinopathies mais lorsque l'on regarde le spectre de malformations concernées nous pouvons constater qu'il est identique à celui des tubulinopathies. Ces MAP étant très largement impliquées dans la dynamique des MT au même titre que les différentes sous-unités de tubuline, nous pouvons supposer que les mécanismes physiopathologiques sous-jacents aux MDC pourraient être similaires (Figure 57).

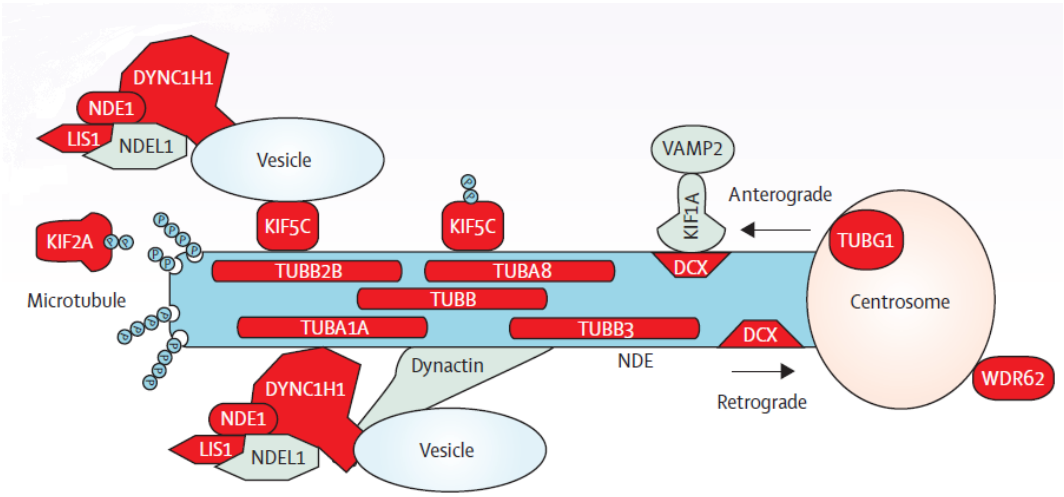


Figure 57: Schéma récapitulatif illustrant le lien entre microtubules et malformations du développement cortical.
Ce schéma illustre en rouge l'ensemble des protéines associées aux mécanismes et à la structure des MT mutées identifiées chez des patients atteints de MDC (D'après Guerrini et al., 2014)

En effet, lorsque l'on compare les différents modèles KO ou KI étudiés dans le cadre de protéines associées aux MT et induisant des MDC, nous pouvons observer des phénotypes similaires. Lorsque nous comparons notre modèle KI pour KIF2A aux résultats obtenus pour les modèles KO KIF2A, KO DCX, le KO TUBB3, le KI TUBA1A et KI TUBG1 nous constatons que l'ensemble de ces modèles présentent des anomalies de migration au niveau de l'hippocampe plus ou moins similaires dans la couche CA1 ou CA3 ou l'ensemble des couches de l'hippocampe présentant une double couche. Il en va de même pour la migration dans le cortex, où la majorité de ces modèles présente une accumulation de neurones mal positionnés dans la ZI. Cette observation va dans le sens que ces différents gènes mutés entrainent des perturbations différentes au niveau des MT mais lorsque le cytosquelette de MT subit des perturbations lors du développement cortical, cela a pour conséquence l'implication de mécanismes physiopathologiques identiques pouvant être regroupés sous le terme de microtubulinopathies incluant les pathologies associées aux mutations dans les sous unités de tubuline mais également dans les MAP tel que KIF2A.

4. Impact des mutations de KIF2A sur la prolifération ou sur les processus post-mitotiques ?

Lors des travaux de surexpression des mutations de KIF2A dans des modèles cellulaires et chez l'embryon lors du développement cortical par électroporation *in-utero*, il a pu être démontré que les mutations de KIF2A entrainent une altération des processus de prolifération liés à un cycle cellulaire anormalement long et une anomalie de ciliogenèse (Broix et al., 2017). Lorsque l'on met en lien ces observations avec la littérature illustrant le rôle de KIF2A lors de la mitose (Ali et al., 2017; Amity L. Manning et al., 2007; Ganem and Compton, 2004; Jang et al., 2009, 2008) et lors de la ciliogenèse (Miyamoto et al., 2015), il semble que physiologiquement les mutations de KIF2A altèrent ces processus et que les phénotypes corticaux et la microcéphalie chez les patients atteints de MDC liées à ces mutations sont dues majoritairement à la perturbation de processus prolifératif. Cependant, l'étude du modèle KI conditionnel pour la mutation p.His321Asp, ne montre pas d'altération significative de la prolifération, que ce soit au niveau de la mitose ou de la ciliogenèse. En revanche, l'étude du modèle a permis de relier la microcéphalie à la présence d'une augmentation de la mort cellulaire par apoptose lors du développement cortical entre E12 et E16. De plus, le croisement avec la souris Nex-Cre permettant d'exprimer la mutation uniquement dans les cellules post-mitotiques et donc d'exclure une perturbation de la prolifération (Goebbels et al., 2006), a permis de retrouver les phénotypes observés (à l'exception de la mort cellulaire massive entre E12 et E16) chez les souris ROSA-Cre et Nestin-Cre exprimant la mutation lors des processus prolifératifs (Dubois et al., 2006; Soriano, 1999). Ces résultats nous permettent de conclure que les phénotypes corticaux observés sont

dûs à des processus post-mitotiques excluant toute implication d'un impact sur la prolifération. Dans cette situation, il faut favoriser l'hypothèse soutenue par les résultats obtenus à l'aide du modèle souris KI. En effet, le modèle nous permet d'analyser de façon physiologique l'effet des mutations de KIF2A avec une expression hétérozygote dans l'ensemble des cellules du cerveau. En revanche, la surexpression des mutations de KIF2A entraine un niveau d'expression très élevé pouvant entrainer des phénotypes cellulaires qui ne sont pas présents dans le cadre du patient.

5. Lien entre KIF2A et l'apoptose

Nos explorations des processus précoces de neurogenèse dans le modèle KI conditionnel KIF2A, ont montré une importante augmentation de la mort cellulaire par apoptose entre les jours embryonnaires 12 et 16 qui pourrait expliciter la microcéphalie observée lors des stades post-nataux. Nous avons observé cette augmentation de l'apoptose après croisement du modèle avec les souris Nestin-Cre et Nex-Cre. Cependant, la mort cellulaire dans les souris Nex-Cre est bien plus faible que dans les souris Nestin-Cre et ne mène pas à une microcéphalie. Cette observation nous montre qu'il y a une augmentation de la mort cellulaire dans les progéniteurs et dans les neurones post-mitotiques et que la combinaison de la mort de ces deux types cellulaires contribue à l'induction du phénotype de microcéphalie.

Le lien entre KIF2A et la mort cellulaire par apoptose n'est pas très évident car l'induction de l'apoptose est reliée à l'activation de voie de signalisation intrinsèque ou extrinsèque à la cellule. Cependant, KIF2A et son rôle exclusivement moteur sur les MT n'entre pas dans une de ces voies de signalisation. Malgré cette absence de lien évident, des études récentes sur des cellules cancéreuses ont permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression de KIF2A dans ce type de cellule, permettant d'établir un lien entre cette augmentation d'expression et la dérégulation de la prolifération cellulaire observée dans certains cancers. Lorsque l'on remet cette observation dans le contexte des nombreux rôles de KIF2A dans la division cellulaire il est possible d'établir un lien évident entre cette augmentation d'expression et la formation de cancer (Wang et al., 2016; WANG et al., 2014; Zhang et al., 2017; ZHANG et al., 2016). Suite à ces observations, de nombreuses études ont visé à empêcher cette augmentation de l'expression de KIF2A dans un but thérapeutique. L'utilisation d'ARN interférent contre KIF2A dans différents types de cellules cancéreuses a permis de provoquer une diminution de la prolifération de ces cellules et une augmentation de la mort cellulaire menant à une diminution des tissus cancéreux.

Lors de l'exploration des différentes voies potentiellement impliquées dans l'induction de cette mort cellulaire, la voie PI3K/Akt/mTor a montré de nombreuses variations. En effet, la perte de fonction de KIF2A dans ces cellules provoque une diminution de l'expression de PI3K et Akt, menant à une activation de Bcl-2 et Bax deux gènes pro-apoptotiques (WANG et al., 2014; Zhang et al., 2017). De plus, des observations similaires ont été réalisées sur des cellules souches neuronales par inactivation de KIF2A à l'aide d'ARNi menant à une diminution de la phosphorylation de Akt. Compte tenu de ces observations, il serait intéressant d'étudier de manière plus précise si l'on observe ces mêmes variations chez le modèle souris KI lors des stades embryonnaires présentant une augmentation de l'apoptose.

Lors de notre étude nous avons tenté d'observer si cette augmentation significative de la mort cellulaire pouvait être liée à une augmentation de l'expression de p53 et de sa voie d'activation menant finalement à l'apoptose. En effet, des études réalisées sur des cultures de neurones et lors du développement cortical ont permis de montrer une augmentation de la mort des neurones par apoptose liée à une augmentation de p53 (Johnson et al., 1999; Morrison et al., 2003; Vogt et al., 2018). Nos résultats de western-blot sur des extrait de cortex à E12 étant le stade où la mort cellulaire est la plus élevée, a permis de montrer une augmentation de p53 pouvant expliquer l'induction de l'apoptose par l'activation de cette voie de signalisation. Le mécanisme perturbé par la mutation de KIF2A à l'origine de cette activation de la voie dépendante de p53 est pour le moment inconnu. Cependant différents liens entre des perturbations lors du neuro-développement et l'activation de l'apoptose dépendante de p53 ont pu être établi. L'utilisation du modèle de mutation spontanée *Magoh* présentant une microcéphalie liée à une mutation dans *LIS1* par Pilaz et coll. a montré une augmentation de l'apoptose via l'activation de p53 reliée à un prolongement anormal du temps de mitose (Pilaz et al., 2016). Dans le même contexte, l'étude de Marthiens et coll. a permis de démontrer que la surexpression de Plk4 lors du développement cortical entraine une amplification du nombre de centrosomes lors de la division cellulaire menant finalement à l'induction de l'apoptose par l'activation de p53 provoquant une microcéphalie chez ce modèle murin (Marthiens et al., 2013). Mais l'étude la plus pertinente dans le contexte de KIF2A est l'étude de Breuss et coll. qui lors de l'étude du modèle KI pour la mutation p.Glu401Lys dans TUBB3 a pu démontrer que l'expression homozygote de la mutation entraine une augmentation de la mort cellulaire des neurones destinés aux couches superficielles du cortex. De plus, cette mort cellulaire par apoptose a été reliée à une activation de la voie p53 et des anomalies de l'angle du fuseau mitotique lors de la prolifération (Breuss et al., 2016).

Lorsque l'on compare les résultats de la littérature montrant le lien entre une inactivation de KIF2A et une dérégulation d'AKT, avec nos résultats d'apoptose liée à une activation de la voie de signalisation p53, une relation entre les 2 voies semble possible. En effet, plusieurs études ont mis en évidence que les modifications de la dynamique des MT par l'utilisation de drogues, modifient le niveau d'activation de la voie PI3K/AKT. Les études de Jo et coll. et de Mercado-Matos et coll. après traitement au nocodazole, une drogue permettant de bloquer la polymérisation des MT et de Taxol permettant une stabilisation des MT, ont montré que les cellules ayant été mises en présence de ces drogues présentent une modification de l'activation d'AKT. En effet, l'injection de nocodazole entraine une diminution du niveau de phosphorylation d'AKT tandis que l'administration de taxol, entraine une augmentation du niveau de p-AKT. D'un point de vue physiologique, ces modifications du niveau de phosphorylation d'AKT par l'utilisation de ces deux types de drogues entrainent finalement des anomalies de progression dans le cycle et une mort cellulaire (Jo et al., 2014; Mercado-Matos et al., 2017). Ce lien entre les microtubules et la régulation de la voie de signalisation PI3K/AKT permet d'établir un lien avec KIF2A. Nous pouvons penser que la dérégulation par l'inactivation de KIF2A réalisée dans l'étude de certains cancers, ou par les mutations de KIF2A dans le cas des MDC peut entrainer une diminution de l'activation de la voie PI3K/AKT à travers un impact sur la dynamique des microtubules que nous avons pu mettre en évidence dans les fibroblastes de patients.

De plus, un lien entre AKT et la voie de signalisation p53 a été démontré. En effet, il semble que l'activation d'AKT mène à une phosphorylation de MDM2 qui contribue à l'inactivation de p53. Cependant il semblerait que cette régulation soit réciproque car p53 aurait la capacité de réguler sa propre expression à travers une activation de MDM2, et une inhibition d'AKT (Gottlieb et al., 2002; Wee et al., 2009). L'activation de p53 permettant l'induction de l'apoptose et l'activation d'AKT promouvant la survie cellulaire, cette boucle de régulation de leur expression permet d'effectuer une balance entre mort et survie cellulaire. En mettant en relation ces résultats avec la possible dérégulation d'AKT par KIF2A à travers son effet sur les MT, il est possible d'émettre une hypothèse expliquant le lien entre KIF2A et l'apoptose. En effet, la dérégulation de la dynamique par KIF2A peut entrainer une dérégulation du niveau d'activation d'AKT, cette dérégulation pouvant ensuite entrainer une suractivation de p53 et donc l'activation de l'apoptose par les caspases (Figure 58). Il serait donc très important dans la continuité de ces résultats, d'étudier les niveaux d'activation de la voie PI3K/AKT et p53 lors des étapes précoces du développement cortical durant lesquelles la mort cellulaire est la plus élevée. Ces études devraient permettre de mettre en évidence le lien entre les perturbations des MT par les mutations de KIF2A et l'induction de l'apoptose par la dérégulation de la voie PI3K/AKT et p53.

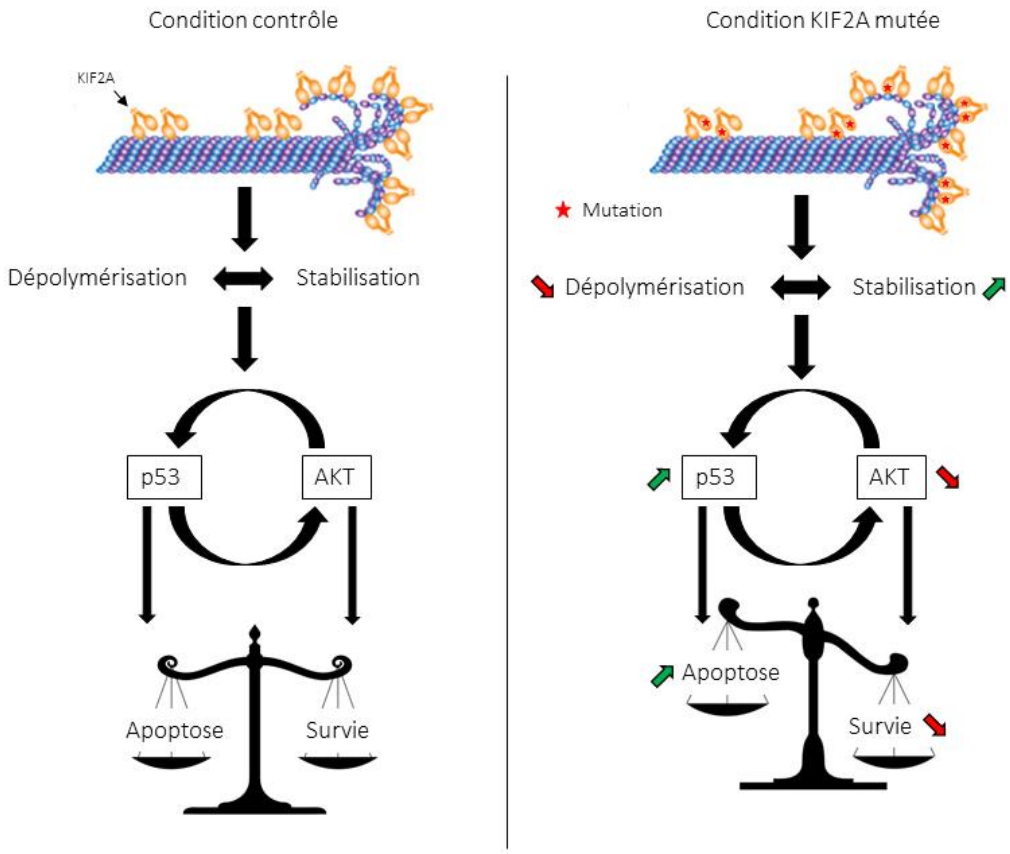


Figure 58 : Hypothèse de relation entre les anomalies de dynamique des microtubules liées aux mutations de KIF2A et l'apoptose.
Dans une condition contrôle la dépolymérisation des MT par KIF2A permet le maintien de la dynamique des MT et de l'expression de la voie de signalisation PI3K/AKT permettant l'inhibition de p53 et le maintien de la balance entre survie cellulaire et apoptose. Dans une condition où KIF2A est mutée, la perte de dépolymérisation des MT pourrait entrainer une modification de la dynamique des MT menant à une diminution de AKT et donc une suractivation de P53 entrainant l'induction de l'apoptose.

6. Épilepsie dans les MDC : perturbation durant la période anténatale ou post-natale ?

Le paradigme actuel entre les MDC et l'épilepsie réside sur le fait que les crises d'épilepsie pharmaco-résistantes observées chez les patients atteints de MDC sont probablement liées aux malformations congénitales. Cependant le mécanisme physiopathologique expliquant ces crises a pour l'heure été très peu élucidé et des faits mènent à une contribution post-natale (Represa, 2019).

Lors des explorations du modèle constitutif KI KIF2A, nous n'avons pas enregistré de crises d'épilepsie spontanée mais une susceptibilité à l'épilepsie a été observée après injection d'une faible dose de PTZ chez les souris mutantes. La même dose de PTZ n'a pas entraîné de modifications EEG chez les souris contrôles. Cependant, l'utilisation de ce modèle constitutif présentant de nombreuses malformations congénitales ne nous permet pas de savoir si cette susceptibilité est due aux malformations identifiées et/ou à un impact de la mutation sur des processus post-nataux. Afin de répondre à cette question et d'étudier les mécanismes sous-jacents à l'induction du phénotype d'épilepsie, nous avons profité des propriétés conditionnelles du modèle KI de KIF2A en le croisant avec la souris Rosa Cre-ERT2 afin de

choisir le moment auquel la mutation p.His321Asp s'exprime. En effet, à l'aide d'injections de tamoxifène entre les jours post-nataux 1 et 3, nous avons pu induire l'expression de la mutation après la naissance et assurer ainsi un développement cortical normal chez la souris. Grâce à l'étude de ce modèle murin, nous avons pu confirmer sa fonctionnalité ainsi que l'absence de malformations du développement cortical et conclure que ce modèle est en adéquation avec la question posée par l'étude. Cependant, la mutation de KIF2A dans ce modèle s'exprime à un faible niveau dans le cortex. Malgré cela, nous avons été en mesure d'observer une susceptibilité accrue à l'épilepsie comme pour le modèle constitutif avec la présence de crises généralisées après l'injection de la même dose de PTZ. Ces résultats montrent que l'expression et l'impact de la mutation de KIF2A restreint au stade post-natal sont suffisants à l'induction de l'épilepsie.

Lorsque l'on remet cette observation dans le contexte du rôle de KIF2A sur les microtubules, l'induction post-natale de l'épilepsie peut être liée à plusieurs processus tels que la croissance axonale ou la synaptogénèse. En effet, plusieurs études ainsi que nos travaux ont montré que l'inactivation et les mutations de KIF2A entraînent la formation d'un axone anormalement long avec la présence d'un nombre très élevé de collatérale produisant un réseau neuronal anormal pouvant être épileptogène (Homma et al., 2003; Maor-Nof et al., 2013). De plus, l'équipe de Homma et coll. a réalisé une étude similaire par l'utilisation du modèle KO KIF2A. En effet, l'inactivation post-natale de KIF2A par injection de tamoxifène a montré des phénotypes correspondants à nos résultats avec la présence de crises d'épilepsie spontanées d'origine hippocampiques liées à une morphologie axonale et dendritique anormale des neurones hippocampiques (Homma et al., 2018).

L'ensemble des résultats obtenus durant l'étude post-natale des modèles KI et KO pour le gène KIF2A tend vers une forte influence de dysfonctionnements lors de processus post-nataux menant à l'induction de crises d'épilepsie. De plus, les observations cliniques des patients présentant des MDC vont dans ce sens. En effet, si l'on se base sur un modèle où seuls les MDC congénitale sont la cause de l'épilepsie, les crises devraient apparaître de manière périnatale. Cependant, une forte proportion de patients atteints de MDC peuvent présenter leurs premières crises d'épilepsie au cours de leur première année de vie où les processus post-nataux de synaptogénèse et axonogenèse sont les plus importants (Bahi-Buisson et al., 2013; Liu et al., 2015; Represa, 2019).

III. Conclusion générale

Lors de ce travail de thèse nous avons pu développer et valider un nouveau type de modèle murin KI conditionnel exprimant la mutation p.His321Asp de KIF2A impliquée dans l'induction de MDC. L'utilisation de ce type de modèle nous a permis de modéliser les phénotypes présents chez le patient et à l'aide de l'exploration de celui-ci lors du développement cortical de pouvoir mieux comprendre les mécanismes sous-jacents. En effet, nous avons pu montrer que la souris présente une microcéphalie liée à une augmentation de la mort cellulaire par apoptose lors des étapes précoces du développement cortical et des anomalies de la migration neuronale et plus précisément du positionnement dans le cortex et l'hippocampe lié à un défaut de transition multipolaire-bipolaire. De plus, l'utilisation des fibroblastes de patient et la purification de la protéine mutée nous a permis de mettre en évidence un défaut de dépolymérisation des MT par KIF2A lié à la mutation entrainant une perturbation de la dynamique des microtubules.

Lors de la caractérisation de ce modèle murin KI conditionnel, nous avons aussi retrouvé les phénotypes cliniques présents chez les patients présentant des MDC avec une hyperactivité, un déficit de mémoire et une susceptibilité à l'épilepsie. L'utilisation des propriétés conditionnelles du modèle couplé à une souris Cre-ERT2 inductible au tamoxifène nous a permis de démontrer que l'expression de la mutation uniquement en post-natale suffit à l'induction de la susceptibilité à l'épilepsie, remettant ainsi en cause le paradigme du lien direct entre les anomalies neuro-anatomiques telles que les MDC et les processus épileptogènes. L'ensemble de ces résultats ont permis une première modélisation précise de la pathologie des MDC liée aux mutations de KIF2A et de pouvoir mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'induction des MDC et de ses phénotypes cliniques associés. De plus, la validation de la technologie FLEx II générant un modèle murin exprimant conditionnellement une mutation ponctuelle quel que soit sa position dans le gène pourrait permettre le développement de modèles murins pour d'autres pathologies d'origine génétique, ouvrant ainsi la voie à des approches rationnelles permettant la dissection des mécanismes physiopathologiques associés aux mutations faux sens et ayant un effet dominant qui représentent par ailleurs les causes les plus fréquentes des formes sporadiques des maladies génétiques.

Bibliographie

Aaku-Saraste, E., Oback, B., Hellwig, A., and Huttner, W.B. (1997). Neuroepithelial cells downregulate their plasma membrane polarity prior to neural tube closure and neurogenesis. Mech. Dev. *69*, 71–81.

Adnani, L., Han, S., Li, S., Mattar, P., and Schuurmans, C. (2018). Mechanisms of Cortical Differentiation. Int. Rev. Cell Mol. Biol. *336*, 223–320.

Ahmad, F.J., and Baas, P.W. (1995). Microtubules released from the neuronal centrosome are transported into the axon. J. Cell Sci. *108*.

Akhmanova, A., and Steinmetz, M.O. (2015). Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *16*, 711–726.

Alcamo, E.A., Chirivella, L., Dautzenberg, M., Dobreva, G., Fariñas, I., Grosschedl, R., and McConnell, S.K. (2008). Satb2 Regulates Callosal Projection Neuron Identity in the Developing Cerebral Cortex. Neuron *57*, 364–377.

Ali, A., Veeranki, S.N., Chinchole, A., and Tyagi, S. (2017). MLL/WDR5 Complex Regulates Kif2A Localization to Ensure Chromosome Congression and Proper Spindle Assembly during Mitosis. Dev. Cell *41*, 605–622.e7.

Amity L. Manning, †, Neil J. Ganem, †, Bakhoum, S.F., Wagenbach, M., Wordeman, L., and Compton*, and D.A. (2007). The Kinesin-13 Proteins Kif2a, Kif2b, and Kif2c/MCAK Have Distinct Roles during Mitosis in Human Cells. Mol. Biol. Cell *19*, 308–317.

Anderson, S.A., Marin, O., Horn, C., Jennings, K., and Rubenstein, J.L. (2001). Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. Development *128*.

ANGEVINE, J.B., and SIDMAN, R.L. (1961). Autoradiographic Study of Cell Migration during Histogenesis of Cerebral Cortex in the Mouse. Nature *192*, 766–768.

Arai, Y., Pulvers, J.N., Haffner, C., Schilling, B., Nüsslein, I., Calegari, F., and Huttner, W.B. (2011). Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. Nat. Commun. *2*, 154.

Asenjo, A.B., Chatterjee, C., Tan, D., DePaoli, V., Rice, W.J., Diaz-Avalos, R., Silvestry, M., and Sosa, H. (2013). Structural Model for Tubulin Recognition and Deformation by Kinesin-13 Microtubule Depolymerases. Cell Rep. *3*, 759–768.

Ayala, R., Shu, T., and Tsai, L.-H. (2007). Trekking across the Brain: The Journey of Neuronal Migration. Cell *128*, 29–43.

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

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

Baldassari, S., Picard, F., Verbeek, N.E., van Kempen, M., Brilstra, E.H., Lesca, G., Conti, V., Guerrini, R., Bisulli, F., Licchetta, L., et al. (2019). The landscape of epilepsy-related GATOR1 variants. Genet. Med. *21*, 398–408.

Barkovich, A.J. (2010). Current concepts of polymicrogyria. Neuroradiology *52*, 479–487.

Barkovich, A.J., Guerrini, R., Kuzniecky, R.I., Jackson, G.D., and Dobyns, W.B. (2012). A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. Brain *135*, 1348–1369.

Barnes, A.P., and Polleux, F. (2009). Establishment of Axon-Dendrite Polarity in Developing Neurons. Annu. Rev. Neurosci. *32*, 347–381.

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

Bartlett, P., Seki, T., Nakajima, K., Hayashi, K., Kubo, K., and Kitazawa, A. (2015). Cellular dynamics of neuronal migration in the hippocampus. Front. Neurosci. Artic. Front. Neurosci *9*.

Baulac, S., Lenk, G.M., Dufresnois, B., Bencheikh, B.O.A., Couarch, P., Renard, J., Larson, P.A., Ferguson, C.J., Noé, E., Poirier, K., et al. (2014). Role of the phosphoinositide phosphatase FIG4 gene in familial epilepsy with polymicrogyria. Neurology *82*, 1068–1075.

Baulac, S., Ishida, S., Marsan, E., Miquel, C., Biraben, A., Nguyen, D.K., Nordli, D., Cossette, P., Nguyen, S., Lambrecq, V., et al. (2015). Familial focal epilepsy with focal cortical dysplasia due to *DEPDC 5* mutations. Ann. Neurol. *77*, 675–683.

Baye, L.M., and Link, B.A. (2008). Nuclear migration during retinal development. Brain Res. *1192*, 29–36.

Bayer, S.A. (1980). Development of the hippocampal region in the rat I. Neurogenesis examined with3H-thymidine autoradiography. J. Comp. Neurol. *190*, 87–114.

Bazelot, M., Simonnet, J., Dinocourt, C., Bruel-Jungerman, E., Miles, R., Fricker, D., and Francis, F. (2012). Cellular anatomy, physiology and epileptiform activity in the CA3 region of Dcx knockout mice: a neuronal lamination defect and its consequences. Eur. J. Neurosci. *35*, 244–256.

Bechstedt, S., Lu, K., and Brouhard, G.J. (2014). Doublecortin Recognizes the Longitudinal Curvature of the Microtubule End and Lattice. Curr. Biol. *24*, 2366–2375.

Bedogni, F., Hodge, R.D., Elsen, G.E., Nelson, B.R., Daza, R.A.M., Beyer, R.P., Bammler, T.K., Rubenstein, J.L.R., and Hevner, R.F. (2010). Tbr1 regulates regional and laminar identity of postmitotic neurons in developing neocortex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 13129–13134.

Betizeau, M., Cortay, V., Patti, D., Pfister, S., Gautier, E., Bellemin-Ménard, A., Afanassieff, M., Huissoud, C., Douglas, R.J., Kennedy, H., et al. (2013). Precursor diversity and complexity of lineage relationships in the outer subventricular zone of the primate. Neuron *80*, 442–457.

Bhabha, G., Johnson, G.T., Schroeder, C.M., and Vale, R.D. (2016). How Dynein Moves Along Microtubules. Trends Biochem. Sci. *41*, 94–105.

Bonnet, C., Boucher, D., Lazereg, S., Pedrotti, B., Islam, K., Denoulet, P., and Larcher, J.C. (2001). Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylation. J. Biol. Chem. *276*, 12839–12848.

Bouabe, H., and Okkenhaug, K. (2013). Gene targeting in mice: a review. Methods Mol. Biol. *1064*, 315–336.

Boyle, M.P., Bernard, A., Thompson, C.L., Ng, L., Boe, A., Mortrud, M., Hawrylycz, M.J., Jones, A.R., Hevner, R.F., and Lein, E.S. (2011). Cell-type-specific consequences of reelin deficiency in the mouse neocortex, hippocampus, and amygdala. J. Comp. Neurol. *519*, 2061–2089.

Bradke, F., and Dotti, C.G. (2000). Establishment of neuronal polarity: lessons from cultured hippocampal neurons. Curr. Opin. Neurobiol. *10*, 574–581.

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

Breuss, M.W., Leca, I., Gstrein, T., Hansen, A.H., and Keays, D.A. (2017). Tubulins and brain development – The origins of functional specification. Mol. Cell. Neurosci. *84*, 58–67.

Britanova, O., de Juan Romero, C., Cheung, A., Kwan, K.Y., Schwark, M., Gyorgy, A., Vogel, T., Akopov, S., Mitkovski, M., Agoston, D., et al. (2008). Satb2 Is a Postmitotic Determinant for Upper-Layer Neuron Specification in the Neocortex. Neuron *57*, 378–392.

Brock, S., Stouffs, K., Scalais, E., D'Hooghe, M., Keymolen, K., Guerrini, R., Dobyns, W.B., Di Donato, N., and Jansen, A.C. (2018). Tubulinopathies continued: refining the phenotypic spectrum associated with variants in TUBG1. Eur. J. Hum. Genet. *26*, 1132–1142.

Broix, L., Jagline, H., L Ivanova, E., Schmucker, S., Drouot, N., Clayton-Smith, J., Pagnamenta, A.T., Metcalfe, K.A., Isidor, B., Louvier, U.W., et al. (2016). Mutations in the HECT domain of NEDD4L lead to AKT–mTOR pathway deregulation and cause periventricular nodular heterotopia. Nat. Genet.

Broix, L., Asselin, L., Silva, C.G., Ivanova, E.L., Tilly, P., Gilet, J.G., Lebrun, N., Lè Ne Jagline, H., Muraca, G., Saillour, Y., et al. (2017). Ciliogenesis and cell cycle alterations contribute to KIF2A-related malformations of cortical development. Hum. Mol. Genet. *0*, 1–15.

Brouhard, G.J., and Rice, L.M. (2014). The contribution of αβ-tubulin curvature to microtubule dynamics. J. Cell Biol. *207*, 323–334.

Brouhard, G.J., Stear, J.H., Noetzel, T.L., Al-Bassam, J., Kinoshita, K., Harrison, S.C., Howard, J., and Hyman, A.A. (2008). XMAP215 is a processive microtubule polymerase. Cell *132*, 79–88.

Butner, K.A., and Kirschner, M.W. (1991). Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. J. Cell Biol. *115*, 717–730.

Bystron, I., Blakemore, C., and Rakic, P. (2008). Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. Nat. Rev. Neurosci. *9*, 110–122.

Calegari, F., and Huttner, W.B. (2003). An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. J. Cell Sci. *116*, 4947–4955.

Calegari, F., Haubensak, W., Haffner, C., and Huttner, W.B. (2005). Journal of Neuroscience. J. Neurosci. *17*, 2079–2087.

Campbell, K., and Götz, M. (2002). Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. Trends Neurosci. *25*, 235–238.

Cappello, S., Gray, M.J., Badouel, C., Lange, S., Einsiedler, M., Srour, M., Chitayat, D., Hamdan, F.F., Jenkins, Z.A., Morgan, T., et al. (2013). Mutations in genes encoding the cadherin receptor-ligand pair

DCHS1 and FAT4 disrupt cerebral cortical development. Nat. Genet. *45*, 1300–1308.

Capulli, M., Costantini, R., Sonntag, S., Maurizi, A., Paganini, C., Monti, L., Forlino, A., Shmerling, D., Teti, A., and Rossi, A. (2019). Testing the Cre-mediated genetic switch for the generation of conditional knock-in mice. PLoS One *14*, e0213660.

Carabalona, A., Beguin, S., Pallesi-Pocachard, E., Buhler, E., Pellegrino, C., Arnaud, K., Hubert, P., Oualha, M., Siffroi, J.P., Khantane, S., et al. (2012). A glial origin for periventricular nodular heterotopia caused by impaired expression of Filamin-A. Hum. Mol. Genet. *21*, 1004–1017.

Carolyn A. Moores, R.A.M. (2005). Lucky 13 - microtubule depolymerisation by kinesin-13 motors. J. Cell Sci. *118*, 1105–1116.

Carvalho, P., Gupta, M.L., Hoyt, M.A., and Pellman, D. (2004). Cell cycle control of kinesin-mediated transport of Bik1 (CLIP-170) regulates microtubule stability and dynein activation. Dev. Cell *6*, 815–829.

Cavallin, M., Bijlsma, E.K., El Morjani, A., Moutton, S., Peeters, E.A.J., Maillard, C., Pedespan, J.M., Guerrot, A.-M., Drouin-Garaud, V., Coubes, C., et al. (2016). Recurrent KIF2A mutations are responsible for classic lissencephaly. Neurogenetics.

Caviness, V.S., and Sidman, R.L. (1973). Time of origin of corresponding cell classes in the cerebral cortex of normal and reeler mutant mice: An autoradiographic analysis. J. Comp. Neurol. *148*, 141–151.

Chae, T.H., Kim, S., Marz, K.E., Hanson, P.I., and Walsh, C.A. (2004). The hyh mutation uncovers roles for αSnap in apical protein localization and control of neural cell fate. Nat. Genet. *36*, 264–270.

Chai, X., Zhao, S., Fan, L., Zhang, W., Lu, X., Shao, H., Wang, S., Song, L., Failla, A.V., Zobiak, B., et al. (2016). Reelin and cofilin cooperate during the migration of cortical neurons: a quantitative morphological analysis. Development *143*, 1029–1040.

Chapin, S.J., and Bulinski, J.C. (1991). Non-neuronal 210 × 10(3) Mr microtubule-associated protein (MAP4) contains a domain homologous to the microtubule-binding domains of neuronal MAP2 and tau. J. Cell Sci. *98*.

Chaudhary, A.R., Lu, H., Krementsova, E.B., Bookwalter, C.S., Trybus, K.M., and Hendricks, A.G. (2019). MAP7 regulates organelle transport by recruiting kinesin-1 to microtubules. J. Biol. Chem. jbc.RA119.008052.

Chen, B., Schaevitz, L.R., and McConnell, S.K. (2005). Fezl regulates the differentiation and axon targeting of layer 5 subcortical projection neurons in cerebral cortex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 17184–17189.

Chen, B., Wang, S.S., Hattox, A.M., Rayburn, H., Nelson, S.B., and McConnell, S.K. (2008). The Fezf2–Ctip2 genetic pathway regulates the fate choice of subcortical projection neurons in the developing cerebral cortex. Proc. Natl. Acad. Sci. *105*, 11382–11387.

Christensen, J., Cloos, P., Toftegaard, U., Klinkenberg, D., Bracken, A.P., Trinh, E., Heeran, M., Di Stefano, L., and Helin, K. (2005). Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription. Nucleic Acids Res. *33*, 5458–5470.

Cianfrocco, M.A., DeSantis, M.E., Leschziner, A.E., and Reck-Peterson, S.L. (2015). Mechanism and

regulation of cytoplasmic dynein. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *31*, 83–108.

Classon, M., and Harlow, E. (2002). The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. Nat. Rev. Cancer *2*, 910–917.

Colamarino, S.A., and Tessier-Lavigne, M. (1995). The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. Cell *81*, 621–629.

Conde, C., and Cáceres, A. (2009). Microtubule assembly , organization and dynamics in axons and dendrites. *10*.

Coombes, C.E., Yamamoto, A., Kenzie, M.R., Odde, D.J., and Gardner, M.K. (2013). Evolving Tip Structures Can Explain Age-Dependent Microtubule Catastrophe. Curr. Biol. *23*, 1342–1348.

Cooper, J.A. (2014). Molecules and mechanisms that regulate multipolar migration in the intermediate zone. Front. Cell. Neurosci. *8*, 386.

Coy, D.L., Hancock, W.O., Wagenbach, M., and Howard, J. (1999). Kinesin's tail domain is an inhibitory regulator of the motor domain. Nat. Cell Biol. *1*, 288–292.

Cregan, S.P., MacLaurin, J.G., Craig, C.G., Robertson, G.S., Nicholson, D.W., Park, D.S., and Slack, R.S. (1999). Bax-Dependent Caspase-3 Activation Is a Key Determinant in p53-Induced Apoptosis in Neurons. J. Neurosci. *19*, 7860–7869.

Cushion, T.D., Paciorkowski, A.R., Pilz, D.T., Mullins, J.G.L., Seltzer, L.E., Marion, R.W., Tuttle, E., Ghoneim, D., Christian, S.L., Chung, S.-K., et al. (2014). De Novo Mutations in the Beta-Tubulin Gene TUBB2A Cause Simplified Gyral Patterning and Infantile-Onset Epilepsy. Am. J. Hum. Genet. *94*, 634–641.

D'Arcangelo, G., G. Miao, G., Chen, S.-C., Scares, H.D., Morgan, J.I., and Curran, T. (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. Nature *374*, 719–723.

D'Gama, A.M., Geng, Y., Couto, J.A., Martin, B., Boyle, E.A., LaCoursiere, C.M., Hossain, A., Hatem, N.E., Barry, B.J., Kwiatkowski, D.J., et al. (2015). Mammalian target of rapamycin pathway mutations cause hemimegalencephaly and focal cortical dysplasia. Ann. Neurol. *77*, 720–725.

Dehmelt, L., and Halpain, S. (2004). The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. Genome Biol. *6*, 204.

Denoulet, P., Eddé, B., and Gros, F. (1986). Differential expression of several neurospecific β-tubulin mRNAs in the mouse brain during development. Gene *50*, 289–297.

Desai, A., and Mitchison, T.J. (1997). MICROTUBULE POLYMERIZATION DYNAMICS. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *13*, 83–117.

Desai, A., Verma, S., Mitchison, T.J., and Walczak, C.E. (1999). Kin I Kinesins Are Microtubule-Destabilizing Enzymes. Cell *96*, 69–78.

Desikan, R.S., and Barkovich, A.J. (2016). Malformations of Cortical Development. Ann. Neurol. *80*, 797.

Dhir, A. (2012). Pentylenetetrazol (PTZ) Kindling Model of Epilepsy. In Current Protocols in Neuroscience, (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), p. Unit9.37.

van Dijk, J., Miro, J., Strub, J.-M., Lacroix, B., van Dorsselaer, A., Edde, B., and Janke, C. (2008). Polyglutamylation is a post-translational modification with a broad range of substrates. J. Biol. Chem. *283*, 3915–3922.

Dimitrov, A., Quesnoit, M., Moutel, S., Cantaloube, I., Poüs, C., and Perez, F. (2008). Detection of GTP-Tubulin Conformation in Vivo Reveals a Role for GTP Remnants in Microtubule Rescues. Science (80-.). *322*, 1353–1356.

Di Donato, N., Timms, A.E., Aldinger, K.A., Mirzaa, G.M., Bennett, J.T., Collins, S., Olds, C., Mei, D., Chiari, S., Carvill, G., et al. (2018). Analysis of 17 genes detects mutations in 81% of 811 patients with lissencephaly. Genet. Med. *20*, 1354–1364.

Dubois, N.C., Hofmann, D., Kaloulis, K., Bishop, J.M., and Trumpp, A. (2006). Nestin-Cre transgenic mouse line Nes-Cre1 mediates highly efficient Cre/loxP mediated recombination in the nervous system, kidney, and somite-derived tissues. Genesis *44*, 355–360.

Dunn, S., Morrison, E.E., Liverpool, T.B., Molina-París, C., Cross, R.A., Alonso, M.C., and Peckham, M. (2008). Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. J. Cell Sci. *121*, 1085–1095.

Dwyer, N.D., Chen, B., Chou, S.-J., Hippenmeyer, S., Nguyen, L., and Ghashghaei, H.T. (2016). Neural Stem Cells to Cerebral Cortex: Emerging Mechanisms Regulating Progenitor Behavior and Productivity. J. Neurosci. *36*, 11394–11401.

Ebneth, A., Godemann, R., Stamer, K., Illenberger, S., Trinczek, B., Mandelkow, E.-M., and Mandelkow, E. (1998). Overexpression of Tau Protein Inhibits Kinesin-dependent Trafficking of Vesicles, Mitochondria, and Endoplasmic Reticulum: Implications for Alzheimer's Disease. J. Cell Biol. *143*, 777–794.

Estivill-Torrus, G., Pearson, H., van Heyningen, V., Price, D.J., and Rashbass, P. (2002). Pax6 is required to regulate the cell cycle and the rate of progression from symmetrical to asymmetrical division in mammalian cortical progenitors. Development *129*.

Fallet-Bianco, C., Loeuillet, L., Poirier, K., Loget, P., Chapon, F., Pasquier, L., Saillour, Y., Beldjord, C., Chelly, J., and Francis, F. (2008). Neuropathological phenotype of a distinct form of lissencephaly associated with mutations in TUBA1A. Brain *131*, 2304–2320.

Falnikar, A., Tole, S., Liu, M., Liu, J.S., and Baas, P.W. (2013). Polarity in Migrating Neurons Is Related to a Mechanism Analogous to Cytokinesis. Curr. Biol. *23*, 1215–1220.

Feng, L., Allen, N.S., Simo, S., and Cooper, J.A. (2007). Cullin 5 regulates Dab1 protein levels and neuron positioning during cortical development. Genes Dev. *21*, 2717–2730.

Fernández, V., Llinares-benadero, C., and Borrell, V. (2016). Cerebral cortex expansion and folding : what have we learned ? 1–24.

Fietz, S.A., Kelava, I., Vogt, J., Wilsch-Bräuninger, M., Stenzel, D., Fish, J.L., Corbeil, D., Riehn, A., Distler, W., Nitsch, R., et al. (2010). OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. Nat. Neurosci. *13*, 690–699.

Fietz, S.A., Lachmann, R., Brandl, H., Kircher, M., Samusik, N., Schröder, R., Lakshmanaperumal, N., Henry, I., Vogt, J., Riehn, A., et al. (2012). Transcriptomes of germinal zones of human and mouse fetal neocortex suggest a role of extracellular matrix in progenitor self-renewal. Proc. Natl. Acad. Sci. *109*,

11836–11841.

Fleck, M.W., Hirotsune, S., Gambello, M.J., Phillips-Tansey, E., Suares, G., Mervis, R.F., Wynshaw-Boris, A., and McBain, C.J. (2000). Hippocampal abnormalities and enhanced excitability in a murine model of human lissencephaly. J. Neurosci. *20*, 2439–2450.

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

Fourniol, F., Perderiset, M., Houdusse, A., and Moores, C. (2013). Structural studies of the doublecortin family of MAPs. Methods Cell Biol. *115*, 27–48.

Francis, F., Koulakoff, A., Boucher, D., Chafey, P., Schaar, B., Vinet, M.-C., Friocourt, G., McDonnell, N., Reiner, O., Kahn, A., et al. (1999). Doublecortin Is a Developmentally Regulated, Microtubule-Associated Protein Expressed in Migrating and Differentiating Neurons. Neuron *23*, 247–256.

Francis, F., Meyer, G., Fallet-Bianco, C., Moreno, S., Kappeler, C., Socorro, A.C., Tuy, F.P.D., Beldjord, C., and Chelly, J. (2006). Human disorders of cortical development: From past to present. Eur. J. Neurosci. *23*, 877–893.

Franco, S.J., Martinez-Garay, I., Gil-Sanz, C., Harkins-Perry, S.R., and Müller, U. (2011). Reelin Regulates Cadherin Function via Dab1/Rap1 to Control Neuronal Migration and Lamination in the Neocortex. Neuron *69*, 482–497.

Frantz, G.D., and McConnell, S.K. (1996). Restriction of Late Cerebral Cortical Progenitors to an Upper-Layer Fate. Neuron *17*, 55–61.

Fricker, M., Tolkovsky, A.M., Borutaite, V., Coleman, M., and Brown, G.C. (2018). Neuronal Cell Death. Physiol. Rev. *98*, 813–880.

Friedman, D.S., and Vale, R.D. (1999). Single-molecule analysis of kinesin motility reveals regulation by the cargo-binding tail domain. Nat. Cell Biol. *1*, 293–297.

Gabriel, E., Wason, A., Ramani, A., Gooi, L.M., Keller, P., Pozniakovsky, A., Poser, I., Noack, F., Telugu, N.S., Calegari, F., et al. (2016). CPAP promotes timely cilium disassembly to maintain neural progenitor pool. EMBO J. *35*, 803–819.

Gadadhar, S., Bodakuntla, S., Natarajan, K., and Janke, C. (2017). The tubulin code at a glance. J. Cell Sci. *130*, 1347–1353.

Gadde, S., and Heald, R. (2004). Mechanisms and Molecules of the Mitotic Spindle. Curr. Biol. *14*, R797–R805.

Gal, J.S., Morozov, Y.M., Ayoub, A.E., Chatterjee, M., Rakic, P., and Haydar, T.F. (2006). Molecular and Morphological Heterogeneity of Neural Precursors in the Mouse Neocortical Proliferative Zones. J. Neurosci. *26*, 1045–1056.

Ganem, N.J., and Compton, D.A. (2004). The KinI kinesin Kif2a is required for bipolar spindle assembly through a functional relationship with MCAK. J. Cell Biol. *166*, 473–478.

Gao, Z., and Godbout, R. (2013). Reelin-Disabled-1 signaling in neuronal migration: splicing takes the stage. Cell. Mol. Life Sci. *70*, 2319–2329.

Gardner, M.K., Zanic, M., and Howard, J. (2013). Microtubule catastrophe and rescue. Curr. Opin. Cell Biol. *25*, 14–22.

des Georges, A., Katsuki, M., Drummond, D.R., Osei, M., Cross, R.A., and Amos, L.A. (2008). Mal3, the Schizosaccharomyces pombe homolog of EB1, changes the microtubule lattice. Nat. Struct. Mol. Biol. *15*, 1102–1108.

Ghosh-Roy, A., Goncharov, A., Jin, Y., and Chisholm, A.D. (2012). Kinesin-13 and Tubulin Posttranslational Modifications Regulate Microtubule Growth in Axon Regeneration. Dev. Cell *23*, 716–728.

Gilmore, E.C., and Walsh, C.A. (2013). Genetic causes of microcephaly and lessons for neuronal development. Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol. *2*, 461–478.

Gleeson, J.G. (2000). Classical lissencephaly and double cortex (subcortical band heterotopia): LIS1 and doublecortin. Curr. Opin. Neurol. *13*, 121–125.

Goebbels, S., Bormuth, I., Bode, U., Hermanson, O., Schwab, M.H., and Nave, K.-A. (2006). Genetic targeting of principal neurons in neocortex and hippocampus of NEX-Cre mice. Genesis *44*, 611–621.

Goodson, H. V, and Jonasson, E.M. (2018). Microtubules and Microtubule-Associated Proteins.

Goshima, G., and Vale, R.D. (2003). The roles of microtubule-based motor proteins in mitosis: comprehensive RNAi analysis in the Drosophila S2 cell line. J. Cell Biol. *162*, 1003–1016.

Gottlieb, T.M., Leal, J.F.M., Seger, R., Taya, Y., and Oren, M. (2002). Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. Oncogene *21*, 1299–1303.

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

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

Götz, M., Stoykova, A., and Gruss, P. (1998). Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. Neuron *21*, 1031–1044.

Gregory, W.A., Edmondson, J.C., Hatten, M.E., and Mason, C.A. (1988). Cytology and neuron-glial apposition of migrating cerebellar granule cells in vitro. J. Neurosci. *8*, 1728–1738.

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

Guarnieri, F.C., de Chevigny, A., Falace, A., and Cardoso, C. (2018). Disorders of neurogenesis and cortical development. Dialogues Clin. Neurosci. *20*, 255–266.

Guerrini, R., and Dobyns, W.B. (2014). Malformations of cortical development : clinical features and genetic causes. Lancet Neurol. *13*, 710–726.

Gumy, L.F., Katrukha, E.A., Kapitein, L.C., and Hoogenraad, C.C. (2014). New insights into mRNA trafficking in axons. Dev. Neurobiol. *74*, 233–244.

Gundersen, R., Barrett, J., and O'Leary, D. (1979). Neuronal chemotaxis: chick dorsal-root axons turn toward high concentrations of nerve growth factor. Science (80-.). *206*, 1079–1080.

Guo, J., Yang, Z., Song, W., Chen, Q., Wang, F., Zhang, Q., and Zhu, X. (2006). Nudel contributes to microtubule anchoring at the mother centriole and is involved in both dynein-dependent and -independent centrosomal protein assembly. Mol. Biol. Cell *17*, 680–689.

Guo, W., Jiang, H., Gray, V., Dedhar, S., and Rao, Y. (2007). Role of the integrin-linked kinase (ILK) in determining neuronal polarity. Dev. Biol. *306*, 457–468.

Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G.S., Henderson, J.T., Woo, M., Soengas, M.S., Elia, A., de la Pompa, J.L., Kagi, D., Khoo, W., et al. (1998). Differential Requirement for Caspase 9 in Apoptotic Pathways In Vivo. Cell *94*, 339–352.

Han, W., Kwan, K.Y., Shim, S., Lam, M.M.S., Shin, Y., Xu, X., Zhu, Y., Li, M., and Sestan, N. (2011). TBR1 directly represses Fezf2 to control the laminar origin and development of the corticospinal tract. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 3041–3046.

Hansen, D. V., Lui, J.H., Parker, P.R.L., and Kriegstein, A.R. (2010). Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. Nature *464*, 554–561.

Hatten, M.E. (1999). CENTRAL NERVOUS SYSTEM NEURONAL MIGRATION. Annu. Rev. Neurosci. *22*, 511–539.

Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W., and Huttner, W.B. (2004). Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 3196–3201.

Hayashi, K., Kubo, K., Kitazawa, A., and Nakajima, K. (2015). Cellular dynamics of neuronal migration in the hippocampus. Front. Neurosci. *9*.

Heald, R. (2000). Motor function in the mitotic spindle. Cell *102*, 399–402.

Heffner, C., Lumsden, A., and O'Leary, D. (1990). Target control of collateral extension and directional axon growth in the mammalian brain. Science (80-.). *247*, 217–220.

Helenius, J., Brouhard, G., Kalaidzidis, Y., Diez, S., and Howard, J. (2006). The depolymerizing kinesin MCAK uses lattice diffusion to rapidly target microtubule ends. Nature *441*, 115–119.

Hendershott, M.C., and Vale, R.D. (2014). Regulation of microtubule minus-end dynamics by CAMSAPs and Patronin. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *111*, 5860–5865.

Hevner, R.F., Shi, L., Justice, N., Hsueh, Y.-P., Sheng, M., Smiga, S., Bulfone, A., Goffinet, A.M., Campagnoni, A.T., and Rubenstein, J.L.. (2001). Tbr1 Regulates Differentiation of the Preplate and Layer 6. Neuron *29*, 353–366.

Higginbotham, H., Guo, J., Yokota, Y., Umberger, N.L., Su, C.-Y., Li, J., Verma, N., Hirt, J., Ghukasyan, V., Caspary, T., et al. (2013). Arl13b-regulated cilia activities are essential for polarized radial glial scaffold formation. Nat. Publ. Gr. *16*.

Hippenmeyer, S. (2014). Molecular Pathways Controlling the Sequential Steps of Cortical Projection Neuron Migration. In Advances in Experimental Medicine and Biology, pp. 1–24.

Hirokawa, N., and Noda, Y. (2008). Intracellular Transport and Kinesin Superfamily Proteins, KIFs: Structure, Function, and Dynamics. Physiol. Rev. *88*, 1089–1118.

Hirokawa, N., and Tanaka, Y. (2015). Kinesin superfamily proteins (KIFs): Various functions and their relevance for important phenomena in life and diseases. Exp. Cell Res. *334*, 16–25.

Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., and Niwa, S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 682–696.

Hirotsune, S., Fleck, M.W., Gambello, M.J., Bix, G.J., Chen, A., Clark, G.D., Ledbetter, D.H., McBain, C.J., and Wynshaw-Boris, A. (1998). Graded reduction of Pafah1b1 (Lis1) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. Nat. Genet. *19*, 333–339.

Hoess, R.H., Ziese, M., and Sternberg, N. (1982). P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *79*, 3398–3402.

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

Homma, N., Zhou, R., Naseer, M.I., Chaudhary, A.G., Al-Qahtani, M.H., and Hirokawa, N. (2018). KIF2A regulates the development of dentate granule cells and postnatal hippocampal wiring. Elife *7*.

Hoogenraad, C.C., and Bradke, F. (2009). Control of neuronal polarity and plasticity – a renaissance for microtubules? Trends Cell Biol. *19*, 669–676.

Huang, J., Roberts, A.J., Leschziner, A.E., and Reck-Peterson, S.L. (2012). Lis1 acts as a "clutch" between the ATPase and microtubule-binding domains of the dynein motor. Cell *150*, 975–986.

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

Inoko, A., Matsuyama, M., Goto, H., Ohmuro-Matsuyama, Y., Hayashi, Y., Enomoto, M., Ibi, M., Urano, T., Yonemura, S., Kiyono, T., et al. (2012). Trichoplein and Aurora A block aberrant primary cilia assembly in proliferating cells. J. Cell Biol. *197*, 391–405.

Ivanova, E.L., Gilet, J.G., Sulimenko, V., Duchon, A., Rudolf, G., Runge, K., Collins, S.C., Asselin, L., Broix, L., Drouot, N., et al. (2019). TUBG1 missense variants underlying cortical malformations disrupt neuronal locomotion and microtubule dynamics but not neurogenesis. Nat. Commun. *10*, 2129.

Jaglin, X.H., Poirier, K., Saillour, Y., Buhler, E., Tian, G., Bahi-Buisson, N., Fallet-Bianco, C., Phan-Dinh-Tuy, F., Kong, X.P., Bomont, P., et al. (2009). Mutations in the β-tubulin gene TUBB2B result in asymmetrical polymicrogyria. Nat. Genet. *41*, 746–752.

Jaillard, S., Andrieux, J., Plessis, G., Krepischi, A.C.V., Lucas, J., David, V., Le Brun, M., Bertola, D.R., David, A., Belaud-Rotureau, M.-A., et al. (2011). 5q12.1 deletion: Delineation of a phenotype including mental retardation and ocular defects. Am. J. Med. Genet. Part A *155*, 725–731.

Jang, C.-Y., Coppinger, J. a, Seki, A., Yates, J.R., and Fang, G. (2009). Plk1 and Aurora A regulate the depolymerase activity and the cellular localization of Kif2a. J. Cell Sci. *122*, 1334–1341.

Jang, C.Y., Wong, J., Coppinger, J.A., Seki, A., Yates, J.R., and Fang, G. (2008). DDA3 recruits microtubule

depolymerase Kif2a to spindle poles and controls spindle dynamics and mitotic chromosome movement. J. Cell Biol. *181*, 255–267.

Jang, M.-A., Woo, H.I., Kim, J.-W., Lee, J., and Ki, C.-S. (2013). Identification of DCX Gene Mutation in Lissencephaly Spectrum With Subcortical Band Heterotopia Using Whole Exome Sequencing. Pediatr. Neurol. *48*, 411–414.

Janke, C. (2014). The tubulin code: molecular components, readout mechanisms, and functions. J. Cell Biol. *206*, 461–472.

Janke, C., and Chloë Bulinski, J. (2011). Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *12*, 773–786.

Jansen, A., and Andermann, E. (2005). Genetics of the polymicrogyria syndromes. J. Med. Genet. *42*, 369–378.

Janson, M.E., de Dood, M.E., and Dogterom, M. (2003). Dynamic instability of microtubules is regulated by force. J. Cell Biol. *161*, 1029–1034.

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

Jiang, H., Guo, W., Liang, X., and Rao, Y. (2005). Both the Establishment and the Maintenance of Neuronal Polarity Require Active Mechanisms: Critical Roles of GSK-3β and Its Upstream Regulators. Cell *120*, 123–135.

Jiang, K., Hua, S., Mohan, R., Grigoriev, I., Yau, K.W., Liu, Q., Katrukha, E.A., Altelaar, A.F.M., Heck, A.J.R., Hoogenraad, C.C., et al. (2014). Microtubule Minus-End Stabilization by Polymerization-Driven CAMSAP Deposition. Dev. Cell *28*, 295–309.

Jo, H., Loison, F., and Luo, H.R. (2014). Microtubule dynamics regulates Akt signaling via dynactin p150. Cell. Signal. *26*, 1707–1716.

Johnson, M.D., Kinoshita, Y., Xiang, H., Ghatan, S., and Morrison, R.S. (1999). Contribution of p53-dependent caspase activation to neuronal cell death declines with neuronal maturation. J. Neurosci. *19*, 2996–3006.

Joshi, H.C., and Cleveland, D.W. (1989). Differential utilization of beta-tubulin isotypes in differentiating neurites. J. Cell Biol. *109*, 663–673.

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.

Juric-Sekhar, G., and Hevner, R.F. (2019). Malformations of Cerebral Cortex Development: Molecules and Mechanisms. Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. *14*, 293–318.

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

Keays, D.A., Tian, G., Poirier, K., Huang, G.-J., Siebold, C., Cleak, J., Oliver, P.L., Fray, M., Harvey, R.J., Molnár, Z., et al. (2007). Mutations in α-Tubulin Cause Abnormal Neuronal Migration in Mice and Lissencephaly in Humans. Cell *128*, 45–57.

Kielar, M., Tuy, F.P.D., Bizzotto, S., Lebrand, C., de Juan Romero, C., Poirier, K., Oegema, R., Mancini, G.M., Bahi-Buisson, N., Olaso, R., et al. (2014). Mutations in Eml1 lead to ectopic progenitors and neuronal heterotopia in mouse and human. Nat. Neurosci. *17*, 923–933.

Kim, H., Binder, L.I., and Rosenbaum, J.L. (1979). The periodic association of MAP2 with brain microtubules in vitro. J. Cell Biol. *80*, 266–276.

Kim, H., Kim, M., Im, S.-K., and Fang, S. (2018). Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. Lab. Anim. Res. *34*, 147–159.

Kitazawa, A., Kubo, K., Hayashi, K., Matsunaga, Y., Ishii, K., and Nakajima, K. (2014). Hippocampal Pyramidal Neurons Switch from a Multipolar Migration Mode to a Novel "Climbing" Migration Mode during Development. J. Neurosci. *34*.

Kline-Smith, S.L., Khodjakov, A., Hergert, P., and Walczak, C.E. (2004). Depletion of Centromeric MCAK Leads to Chromosome Congression and Segregation Defects Due to Improper Kinetochore Attachments. Mol. Biol. Cell *15*, 1146–1159.

Koizumi, H., Tanaka, T., and Gleeson, J.G. (2006). doublecortin-like kinase Functions with doublecortin to Mediate Fiber Tract Decussation and Neuronal Migration. Neuron *49*, 55–66.

Konishi, Y., and Setou, M. (2009). Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. Nat. Neurosci. *12*, 559–567.

Konno, D., Shioi, G., Shitamukai, A., Mori, A., Kiyonari, H., Miyata, T., and Matsuzaki, F. (2008). Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. Nat. Cell Biol. *10*, 93–101.

Kosodo, Y., Röper, K., Haubensak, W., Marzesco, A.-M., Corbeil, D., and Huttner, W.B. (2004). Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells. EMBO J. *23*, 2314–2324.

Kosodo, Y., Suetsugu, T., Suda, M., Mimori-Kiyosue, Y., Toida, K., Baba, S.A., Kimura, A., and Matsuzaki, F. (2011). Regulation of interkinetic nuclear migration by cell cycle-coupled active and passive mechanisms in the developing brain. EMBO J. *30*, 1690–1704.

Kriegstein, A.R., and Götz, M. (2003). Radial glia diversity: A matter of cell fate. Glia *43*, 37–43.

Kriegstein, A.R., and Noctor, S.C. (2004). Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. Trends Neurosci. *27*, 392–399.

Kuan, C.-Y., Roth, K.A., Flavell, R.A., and Rakic, P. (2000). Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. Trends Neurosci. *23*, 291–297.

Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S., Kuan, C.-Y., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P., and Flavell, R.A. (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. Nature *384*, 368–372.

L'Hernault, S.W., and Rosenbaum, J.L. (1985). Chlamydomonas .alpha.-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the .epsilon.-amino group of a lysine. Biochemistry *24*, 473–478.

Landrieu, P., and Goffinet, A. (1979). Mitotic spindle fiber orientation in relation to cell migration in the neo-cortex of normal and reeler mouse. Neurosci. Lett. *13*, 69–72.

Lange, C., Huttner, W.B., and Calegari, F. (2009a). Cdk4/CyclinD1 Overexpression in Neural Stem Cells Shortens G1, Delays Neurogenesis, and Promotes the Generation and Expansion of Basal Progenitors. Cell Stem Cell *5*, 320–331.

Lange, C., Huttner, W.B., and Calegari, F. (2009b). Cdk4/CyclinD1 Overexpression in Neural Stem Cells Shortens G1, Delays Neurogenesis, and Promotes the Generation and Expansion of Basal Progenitors. Cell Stem Cell *5*, 320–331.

Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR Signaling in Growth Control and Disease. Cell *149*, 274–293.

Lee, J. (2017). Malformations of cortical development: Genetic mechanisms and diagnostic approach. Korean J. Pediatr. *60*, 1–9.

Lee, H.O., and Norden, C. (2013). Mechanisms controlling arrangements and movements of nuclei in pseudostratified epithelia. Trends Cell Biol. *23*, 141–150.

Lee, J.H., Huynh, M., Silhavy, J.L., Kim, S., Dixon-Salazar, T., Heiberg, A., Scott, E., Bafna, V., Hill, K.J., Collazo, A., et al. (2012). De novo somatic mutations in components of the PI3K-AKT3-mTOR pathway cause hemimegalencephaly. Nat. Genet. *44*, 941–945.

Lesca, G., and Depienne, C. (2015). Epilepsy genetics: The ongoing revolution. Rev. Neurol. (Paris). *171*, 539–557.

Leventer, R.J., Cardoso, C., Ledbetter, D.H., and Dobyns, W.B. (2001). LIS1 missense mutations cause milder lissencephaly phenotypes including a child with normal IQ. Neurology *57*, 416–422.

Li, G., and Pleasure, S.J. (2014). The development of hippocampal cellular assemblies. Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol. *3*, 165–177.

Liu, W., An, D., Xiao, J., Li, J., Hao, N., and Zhou, D. (2015). Malformations of cortical development and epilepsy: A cohort of 150 patients in western China. Seizure *32*, 92–99.

Lloyd, T.E., Machamer, J., O'Hara, K., Kim, J.H., Collins, S.E., Wong, M.Y., Sahin, B., Imlach, W., Yang, Y., Levitan, E.S., et al. (2012). The p150(Glued) CAP-Gly domain regulates initiation of retrograde transport at synaptic termini. Neuron *74*, 344–360.

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

Lu, W., and Gelfand, V.I. (2017). Moonlighting Motors: Kinesin, Dynein, and Cell Polarity. Trends Cell Biol. *27*, 505–514.

Lui, J.H., Hansen, D.V., and Kriegstein, A.R. (2011). Development and Evolution of the Human Neocortex. Cell *146*, 18–36.

Luo, R., Jeong, S.-J., Jin, Z., Strokes, N., Li, S., and Piao, X. (2011). G protein-coupled receptor 56 and collagen III, a receptor-ligand pair, regulates cortical development and lamination. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 12925–12930.

Machon, O., van den Bout, C.J., Backman, M., Kemler, R., and Krauss, S. (2003). Role of β-catenin in the developing cortical and hippocampal neuroepithelium. Neuroscience *122*, 129–143.

Maiato, H., Sampaio, P., and Sunkel, C.E. (2004). Microtubule-associated proteins and their essential roles during mitosis. Int. Rev. Cytol. *241*, 53–153.

Maiti, B., Li, J., Bruin, A. de, Gordon, F., Timmers, C., Opavsky, R., Patil, K., Tuttle, J., Cleghorn, W., and Leone, G. (2005). Cloning and Characterization of Mouse E2F8, a Novel Mammalian E2F Family Member Capable of Blocking Cellular Proliferation. J. Biol. Chem. *280*, 18211–18220.

Manabe, N., Hirai, S.-I., Imai, F., Nakanishi, H., Takai, Y., and Ohno, S. (2002). Association of ASIP/mPAR-3 with adherens junctions of mouse neuroepithelial cells. Dev. Dyn. *225*, 61–69.

Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., and Milligan, R.A. (1991). Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study. J. Cell Biol. *114*, 977–991.

Maney, T., Wagenbach, M., and Wordeman, L. (2001). Molecular Dissection of the Microtubule Depolymerizing Activity of Mitotic Centromere-associated Kinesin. J. Biol. Chem. *276*, 34753–34758.

Maor-Nof, M., Homma, N., Raanan, C., Nof, A., Hirokawa, N., and Yaron, A. (2013). Axonal Pruning Is Actively Regulated by the Microtubule-Destabilizing Protein Kinesin Superfamily Protein 2A. Cell Rep. *3*, 971–977.

MarÃ-n-Padilla, M. (2015). Human cerebral cortex Cajal-Retzius neuron: development, structure and function. A Golgi study. Front. Neuroanat. *9*, 21.

Marín, O., and Rubenstein, J.L.R. (2001). A long, remarkable journey: Tangential migration in the telencephalon. Nat. Rev. Neurosci. *2*, 780–790.

Marín, O., and Rubenstein, J.L.R. (2003). CELL MIGRATION IN THE FOREBRAIN. Annu. Rev. Neurosci. *26*, 441–483.

Marthiens, V., Rujano, M.A., Pennetier, C., Tessier, S., Paul-Gilloteaux, P., and Basto, R. (2013). Centrosome amplification causes microcephaly. Nat. Cell Biol. *15*, 731–740.

Martynoga, B., Drechsel, D., and Guillemot, F. (2012). Molecular control of neurogenesis: a view from the mammalian cerebral cortex. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *4*, a008359.

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.

Maurer, S.P., Bieling, P., Cope, J., Hoenger, A., and Surrey, T. (2011). GTPgammaS microtubules mimic the growing microtubule end structure recognized by end-binding proteins (EBs). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 3988–3993.

Maurer, S.P., Fourniol, F.J., Bohner, G., Moores, C.A., and Surrey, T. (2012). EBs recognize a nucleotide-dependent structural cap at growing microtubule ends. Cell *149*, 371–382.

McConnell, S.K. (1988). Fates of visual cortical neurons in the ferret after isochronic and heterochronic transplantation. J. Neurosci. *8*, 945–974.

McConnell, S.K., and Kaznowski, C.E. (1991). Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex. Science *254*, 282–285.

McKenna, W.L., Betancourt, J., Larkin, K.A., Abrams, B., Guo, C., Rubenstein, J.L.R., and Chen, B. (2011).

Tbr1 and Fezf2 regulate alternate corticofugal neuronal identities during neocortical development. J. Neurosci. *31*, 549–564.

Melki, R., Carlier, M.F., Pantaloni, D., and Timasheff, S.N. (1989). Cold depolymerization of microtubules to double rings: geometric stabilization of assemblies. Biochemistry *28*, 9143–9152.

Mercado-Matos, J., Clark, J.L., Piper, A.J., Janusis, J., and Shaw, L.M. (2017). Differential involvement of the microtubule cytoskeleton in insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 signaling to AKT determines the response to microtubule disruption in breast carcinoma cells. J. Biol. Chem. *292*, 7806–7816.

Metzger, D., and Chambon, P. (2001). Site- and Time-Specific Gene Targeting in the Mouse. Methods *24*, 71–80.

Metzger, D., and Chambon, P. (2011). Generation of Spatio-Temporally Controlled Targeted Somatic Mutations in the Mouse. In Current Protocols in Mouse Biology, (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), pp. 55–70.

Meyer, G., and González-Gómez, M. (2018). The heterogeneity of human Cajal-Retzius neurons. Semin. Cell Dev. Biol. *76*, 101–111.

Miyamoto, T., Hosoba, K., Ochiai, H., Royba, E., Izumi, H., Sakuma, T., Yamamoto, T., Dynlacht, B., and Matsuura, S. (2015). The Microtubule-Depolymerizing activity of a mitotic kinesin protein KIF2A drives primary cilia disassembly coupled with cell proliferation. Cell Rep. *10*, 664–673.

Miyata, T. (2007). Development of three-dimensional architecture of the neuroepithelium: Role of pseudostratification and cellular 'community.' Dev. Growth Differ. *50*, S105–S112.

Miyata, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Kawano, M., Muto, T., and Ogawa, M. (2004). Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. Development *131*, 3133–3145.

Møller, R.S., Weckhuysen, S., Chipaux, M., Marsan, E., Taly, V., Bebin, E.M., Hiatt, S.M., Prokop, J.W., Bowling, K.M., Mei, D., et al. (2016). Germline and somatic mutations in the *MTOR* gene in focal cortical dysplasia and epilepsy. Neurol. Genet. *2*, e118.

Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Hirata, T., Hibi, M., and Macklis, J.D. (2005). Fezl Is Required for the Birth and Specification of Corticospinal Motor Neurons. Neuron *47*, 817–831.

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

Moores, C.A., Perderiset, M., Francis, F., Chelly, J., Houdusse, A., and Milligan, R.A. (2004). Mechanism of Microtubule Stabilization by Doublecortin. Mol. Cell *14*, 833–839.

Morest, D.K. (1970). A study of neurogenesis in the forebrain of opossum pouch young. Z. Anat. Entwicklungsgesch. *130*, 265–305.

Morris-Rosendahl, D., Najm, J., Lachmeijer, A., Sztriha, L., Martins, M., Kuechler, A., Haug, V., Zeschnigk, C., Martin, P., Santos, M., et al. (2008). Refining the phenotype of α-1a Tubulin (TUBA1A) mutation in patients with classical lissencephaly. Clin. Genet. *74*, 425–433.

Morrison, R.S., Kinoshita, Y., Johnson, M.D., Guo, W., and Garden, G.A. (2003). p53-Dependent Cell

Death Signaling in Neurons. Neurochem. Res. *28*, 15–27.

Moughamian, A.J., and Holzbaur, E.L.F. (2012). Dynactin is required for transport initiation from the distal axon. Neuron *74*, 331–343.

Moughamian, A.J., Osborn, G.E., Lazarus, J.E., Maday, S., and Holzbaur, E.L.F. (2013). Ordered recruitment of dynactin to the microtubule plus-end is required for efficient initiation of retrograde axonal transport. J. Neurosci. *33*, 13190–13203.

Mukai, M., Ikegami, K., Sugiura, Y., Takeshita, K., Nakagawa, A., and Setou, M. (2009). Recombinant Mammalian Tubulin Polyglutamylase TTLL7 Performs both Initiation and Elongation of Polyglutamylation on β-Tubulin through a Random Sequential Pathway †. Biochemistry *48*, 1084–1093.

Myshrall, T.D., Moore, S.A., Ostendorf, A.P., Satz, J.S., Kowalczyk, T., Nguyen, H., Daza, R.A.M., Lau, C., Campbell, K.P., and Hevner, R.F. (2012). Dystroglycan on Radial Glia End Feet Is Required for Pial Basement Membrane Integrity and Columnar Organization of the Developing Cerebral Cortex. J. Neuropathol. Exp. Neurol. *71*, 1047–1063.

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.

Nadarajah, B., Alifragis, P., Wong, R.O.L., and Parnavelas, J.G. (2002). Ventricle-directed migration in the developing cerebral cortex. Nat. Neurosci. *5*, 218–224.

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.

Noda, Y., Niwa, S., Hom-Booher, N., Fukuda, H., Imajo-Ohmi, S., and Hirokawa, N. (2012). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha (PIPK) regulates neuronal microtubule depolymerase kinesin, KIF2A and suppresses elongation of axon branches. Proc. Natl. Acad. Sci. *109*, 1725–1730.

Nogales, E. (2000). Structural Insights into Microtubule Function. Annu. Rev. Biochem. *69*, 277–302.

Nogales, E., Wolf, S.G., and Downing, K.H. (1998). Structure of the αβ tubulin dimer by electron crystallography. Nature *391*, 199–203.

Nonaka-Kinoshita, M., Reillo, I., Artegiani, B., Ángeles Martínez-Martínez, M., Nelson, M., Borrell, V., and Calegari, F. (2013). Regulation of cerebral cortex size and folding by expansion of basal progenitors. EMBO J. *32*, 1817–1828.

Nosten-Bertrand, M., Kappeler, C., Dinocourt, C., Denis, C., Germain, J., Dinh Tuy, F.P., Verstraeten, S., Alvarez, C., Métin, C., Chelly, J., et al. (2008). Epilepsy in Dcx Knockout Mice Associated with Discrete Lamination Defects and Enhanced Excitability in the Hippocampus. PLoS One *3*, e2473.

O'Rourke, N., Dailey, M., Smith, S., and McConnell, S. (1992). Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex. Science (80-.). *258*, 299–302.

Obeng, E.A., Chappell, R.J., Seiler, M., Chen, M.C., Campagna, D.R., Schmidt, P.J., Schneider, R.K., Lord, A.M., Wang, L., Gambe, R.G., et al. (2016). Physiologic Expression of Sf3b1K700ECauses Impaired

Erythropoiesis, Aberrant Splicing, and Sensitivity to Therapeutic Spliceosome Modulation. Cancer Cell *30*, 404–417.

Ogawa, T., and Hirokawa, N. (2015). Microtubule Destabilizer KIF2A Undergoes Distinct Site-Specific Phosphorylation Cascades that Differentially Affect Neuronal Morphogenesis. Cell Rep. *12*, 1774–1788.

Ogawa, M., Miyata, T., Nakajimat, K., Yagyu, K., Seike, M., Ikenaka, K., Yamamoto, H., and Mikoshibat, K. (1995). The reeler gene-associated antigen on cajal-retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. Neuron *14*, 899–912.

Ogawa, T., Saijo, S., Shimizu, N., Jiang, X., and Hirokawa, N. (2017). Mechanism of Catalytic Microtubule Depolymerization via KIF2-Tubulin Transitional Conformation. Cell Rep. *20*, 2626–2638.

Ohi, R., and Zanic, M. (2016). Ahead of the Curve: New Insights into Microtubule Dynamics. F1000Research *5*, 314.

Ohshima, T., Hirasawa, M., Tabata, H., Mutoh, T., Adachi, T., Suzuki, H., Saruta, K., Iwasato, T., Itohara, S., Hashimoto, M., et al. (2007). Cdk5 is required for multipolar-to-bipolar transition during radial neuronal migration and proper dendrite development of pyramidal neurons in the cerebral cortex. Development *134*, 2273–2282.

Orban, P.C., Chui, D., and Marth, J.D. (1992). Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *89*, 6861–6865.

Pacary, E., Haas, M.A., Wildner, H., Azzarelli, R., Bell, D.M., Abrous, D.N., and Guillemot, F. (2012). Visualization and Genetic Manipulation of Dendrites and Spines in the Mouse Cerebral Cortex and Hippocampus using In utero Electroporation. J. Vis. Exp. 2–7.

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

Paridaen, J.T.M.L., Wilsch-Bräuninger, M., and Huttner, W.B. (2013). Asymmetric Inheritance of Centrosome-Associated Primary Cilium Membrane Directs Ciliogenesis after Cell Division. Cell *155*, 333–344.

Park, J.H., and Roll-Mecak, A. (2018). The tubulin code in neuronal polarity. Curr. Opin. Neurobiol. *51*, 95–102.

Parrini, E., Ramazzotti, A., Dobyns, W.B., Mei, D., Moro, F., Veggiotti, P., Marini, C., Brilstra, E.H., Bernardina, B.D., Goodwin, L., et al. (2006). Periventricular heterotopia: phenotypic heterogeneity and correlation with Filamin A mutations. Brain *129*, 1892–1906.

Parrini, E., Conti, V., Dobyns, W.B., and Guerrini, R. (2016). Genetic Basis of Brain Malformations. Mol. Syndromol. *7*, 220–233.

Passemard, S., Perez, F., Colin-Lemesre, E., Rasika, S., Gressens, P., and El Ghouzzi, V. (2017). Golgi trafficking defects in postnatal microcephaly: The evidence for “Golgipathies.” Prog. Neurobiol. *153*, 46–63.

Perdiz, D., Mackeh, R., Poüs, C., and Baillet, A. (2011). The ins and outs of tubulin acetylation: More than just a post-translational modification? Cell. Signal. *23*, 763–771.

Peris, L., Wagenbach, M., Lafanechère, L., Brocard, J., Moore, A.T., Kozielski, F., Job, D., Wordeman, L.,

and Andrieux, A. (2009). Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. J. Cell Biol. *185*, 1159–1166.

Pilaz, L.-J., Patti, D., Marcy, G., Ollier, E., Pfister, S., Douglas, R.J., Betizeau, M., Gautier, E., Cortay, V., Doerflinger, N., et al. (2009a). Forced G1-phase reduction alters mode of division, neuron number, and laminar phenotype in the cerebral cortex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 21924–21929.

Pilaz, L.-J., Patti, D., Marcy, G., Ollier, E., Pfister, S., Douglas, R.J., Betizeau, M., Gautier, E., Cortay, V., Doerflinger, N., et al. (2009b). Forced G1-phase reduction alters mode of division, neuron number, and laminar phenotype in the cerebral cortex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 21924–21929.

Pilaz, L.-J., McMahon, J.J., Miller, E.E., Lennox, A.L., Suzuki, A., Salmon, E., and Silver, D.L. (2016). Prolonged Mitosis of Neural Progenitors Alters Cell Fate in the Developing Brain. Neuron *89*, 83–99.

Pilz, D., Matsumoto, N., Minnerath, S., Mills, P., Gleeson, J.G., Allen, K.M., Walsh, C.A., Barkovich, A.J., Dobyns, W.B., Ledbetter, D.H., et al. (1998). LIS1 and XLIS (DCX) mutations cause most classical lissencephaly, but different patterns of malformation. Hum. Mol. Genet. *7*, 2029–2037.

Pilz, G.-A., Shitamukai, A., Reillo, I., Pacary, E., Schwausch, J., Stahl, R., Ninkovic, J., Snippert, H.J., Clevers, H., Godinho, L., et al. (2013). Amplification of progenitors in the mammalian telencephalon includes a new radial glial cell type. Nat. Commun. *4*, 2125.

Poirier, K., Keays, D.A., Francis, F., Saillour, Y., Bahi, N., Manouvrier, S., Fallet-Bianco, C., Pasquier, L., Toutain, A., Tuy, F.P.D., et al. (2007). Large spectrum of lissencephaly and pachygyria phenotypes resulting from de novo missense mutations in tubulin alpha 1A (*TUBA1A*). Hum. Mutat. *28*, 1055–1064.

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

Poirier, K., Lebrun, N., Broix, L., Tian, G., Saillour, Y., Boscheron, C., Parrini, E., Valence, S., Saint Pierre, B., Oger, M., et al. (2013). Mutations in TUBG1, DYNC1H1, KIF5C and KIF2A cause malformations of cortical development and microcephaly. Nat. Publ. Gr. *45*, 639–647.

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

Preitner, N., Quan, J., Nowakowski, D.W., Hancock, M.L., Shi, J., Tcherkezian, J., Young-Pearse, T.L., and Flanagan, J.G. (2014). APC Is an RNA-Binding Protein, and Its Interactome Provides a Link to Neural Development and Microtubule Assembly. Cell *158*, 368–382.

Raff, E.C., Hoyle, H.D., Popodi, E.M., and Turner, F.R. (2008). Axoneme beta-tubulin sequence determines attachment of outer dynein arms. Curr. Biol. *18*, 911–914.

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

Rakic, P. (1974). Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. Science *183*, 425–427.

Rakic, P. (1995). A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. Trends Neurosci. *18*, 383–388.

Raynaud-Messina, B., and Merdes, A. (2007). γ-tubulin complexes and microtubule organization. Curr. Opin. Cell Biol. *19*, 24–30.

Reck-Peterson, S.L., Redwine, W.B., Vale, R.D., and Carter, A.P. (2018). The cytoplasmic dynein transport machinery and its many cargoes. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *19*, 382–398.

Reed, N.A., Cai, D., Blasius, T.L., Jih, G.T., Meyhofer, E., Gaertig, J., and Verhey, K.J. (2006). Microtubule Acetylation Promotes Kinesin-1 Binding and Transport. Curr. Biol. *16*, 2166–2172.

Reillo, I., de Juan Romero, C., García-Cabezas, M.Á., and Borrell, V. (2011). A Role for Intermediate Radial Glia in the Tangential Expansion of the Mammalian Cerebral Cortex. Cereb. Cortex *21*, 1674–1694.

Renthal, R., Schneider, B.G., Miller, M.M., and Ludueña, R.F. (1993). β_{IV} is the major β-tubulin isotype in bovine cilia. Cell Motil. Cytoskeleton *25*, 19–29.

Represa, A. (2019). Why Malformations of Cortical Development Cause Epilepsy. Front. Neurosci. *13*, 250.

Ribierre, T., Deleuze, C., Bacq, A., Baldassari, S., Marsan, E., Chipaux, M., Muraca, G., Roussel, D., Navarro, V., Leguern, E., et al. (2018). Second-hit mosaic mutation in mTORC1 repressor DEPDC5 causes focal cortical dysplasia–associated epilepsy. J. Clin. Invest. *128*, 2452–2458.

Rieder, C.L., Jensen, C.G., and Jensen, L.C.W. (1979). The resorption of primary cilia during mitosis in a vertebrate (PtK1) cell line. J. Ultrastruct. Res. *68*, 173–185.

Rivière, J.-B., Mirzaa, G.M., O'Roak, B.J., Beddaoui, M., Alcantara, D., Conway, R.L., St-Onge, J., Schwartzentruber, J.A., Gripp, K.W., Nikkel, S.M., et al. (2012). De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. Nat. Genet. *44*, 934–940.

Rocha, C., Papon, L., Cacheux, W., Marques Sousa, P., Lascano, V., Tort, O., Giordano, T., Vacher, S., Lemmers, B., Mariani, P., et al. (2014). Tubulin glycylases are required for primary cilia, control of cell proliferation and tumor development in colon. EMBO J. *33*, 2247–2260.

Roger, B., Al-Bassam, J., Dehmelt, L., Milligan, R.A., and Halpain, S. (2004). MAP2c, but Not Tau, Binds and Bundles F-Actin via Its Microtubule Binding Domain. Curr. Biol. *14*, 363–371.

Roll-Mecak, A. (2019). How cells exploit tubulin diversity to build functional cellular microtubule mosaics. Curr. Opin. Cell Biol. *56*, 102–108.

Roll-Mecak, A., and McNally, F.J. (2010). Microtubule-severing enzymes. Curr. Opin. Cell Biol. *22*, 96–103.

Roll-Mecak, A., and Vale, R.D. (2008). Structural basis of microtubule severing by the hereditary spastic paraplegia protein spastin. Nature *451*, 363–367.

Romaniello, R., Arrigoni, F., Bassi, M.T., and Borgatti, R. (2015). Mutations in α- and β-tubulin encoding genes: Implications in brain malformations. Brain Dev. *37*, 273–280.

Romero, D.M., Bahi-Buisson, N., and Francis, F. (2018). Genetics and mechanisms leading to human cortical malformations. Semin. Cell Dev. Biol. *76*, 33–75.

Roostalu, J., and Surrey, T. (2017). Microtubule nucleation: beyond the template. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *18*, 702–710.

Russell, S.A., and Bashaw, G.J. (2018). Axon guidance pathways and the control of gene expression. Dev. Dyn. *247*, 571–580.

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

Sauer, M.E., and Walker, B.E. (1959). Radioautographic Study of Interkinetic Nuclear Migration in the Neural Tube. Exp. Biol. Med. *101*, 557–560.

Scekic-Zahirovic, J., Sendscheid, O., El Oussini, H., Jambeau, M., Sun, Y., Mersmann, S., Wagner, M., Dieterlé, S., Sinniger, J., Dirrig-Grosch, S., et al. (2016). Toxic gain of function from mutant FUS protein is crucial to trigger cell autonomous motor neuron loss. EMBO J. *35*, 1077–1097.

Schenk, J., Wilsch-Bräuninger, M., Calegari, F., and Huttner, W.B. (2009). Myosin II is required for interkinetic nuclear migration of neural progenitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 16487–16492.

Schimizzi, G. V., Currie, J.D., and Rogers, S.L. (2010). Expression levels of a kinesin-13 microtubule depolymerase modulates the effectiveness of anti-microtubule agents. PLoS One *5*.

Schnütgen, F., and Ghyselinck, N.B. (2007). Adopting the good reFLEXes when generating conditional alterations in the mouse genome. Transgenic Res. *16*, 405–413.

Schnütgen, F., Doerflinger, N., Calléja, C., Wendling, O., Chambon, P., and Ghyselinck, N.B. (2003). A directional strategy for monitoring Cre-mediated recombination at the cellular level in the mouse. Nat. Biotechnol. *21*, 562–565.

Seeger, M.A., and Beattie, C.E. (1999). Attraction versus repulsion: modular receptors make the difference in axon guidance. Cell *97*, 821–824.

Seeger, M.A., and Rice, S.E. (2010). Microtubule-associated protein-like binding of the kinesin-1 tail to microtubules. J. Biol. Chem. *285*, 8155–8162.

Seltzer, L.E., and Paciorkowski, A.R. (2014). Genetic disorders associated with postnatal microcephaly. Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet. *166*, 140–155.

Sheen, V.L., Ganesh, V.S., Topcu, M., Sebire, G., Bodell, A., Hill, R.S., Grant, P.E., Shugart, Y.Y., Imitola, J., Khoury, S.J., et al. (2004). Mutations in ARFGEF2 implicate vesicle trafficking in neural progenitor proliferation and migration in the human cerebral cortex. Nat. Genet. *36*, 69–76.

Shimogori, T., and Ogawa, M. (2008). Gene application with *in utero* electroporation in mouse embryonic brain. Dev. Growth Differ. *50*, 499–506.

Shirasu-Hiza, M., Coughlin, P., and Mitchison, T. (2003). Identification of XMAP215 as a microtubule-destabilizing factor in Xenopus egg extract by biochemical purification. J. Cell Biol. *161*, 349–358.

Shu, T., Ayala, R., Nguyen, M.-D., Xie, Z., Gleeson, J.G., and Tsai, L.-H. (2004). Ndel1 Operates in a

Common Pathway with LIS1 and Cytoplasmic Dynein to Regulate Cortical Neuronal Positioning. Neuron *44*, 263–277.

Sicca, F., Kelemen, A., Genton, P., Das, S., Mei, D., Moro, F., Dobyns, W.B., and Guerrini, R. (2003). Mosaic mutations of the LIS1 gene cause subcortical band heterotopia. Neurology *61*, 1042–1046.

Silva, C.G., Peyre, E., Adhikari, M.H., Tielens, S., Tanco, S., Van Damme, P., Magno, L., Krusy, N., Agirman, G., Magiera, M.M., et al. (2018). Cell-Intrinsic Control of Interneuron Migration Drives Cortical Morphogenesis. Cell *172*, 1063–1078.e19.

Simó, S., and Cooper, J.A. (2013). Rbx2 Regulates Neuronal Migration through Different Cullin 5-RING Ligase Adaptors. Dev. Cell *27*, 399–411.

Simó, S., Jossin, Y., and Cooper, J.A. (2010). Cullin 5 Regulates Cortical Layering by Modulating the Speed and Duration of Dab1-Dependent Neuronal Migration. J. Neurosci. *30*, 5668–5676.

Smart, I.H. (1973). Proliferative characteristics of the ependymal layer during the early development of the mouse neocortex: a pilot study based on recording the number, location and plane of cleavage of mitotic figures. J. Anat. *116*, 67–91.

Song, Y., and Brady, S.T. (2015). Post-translational modifications of tubulin: pathways to functional diversity of microtubules. Trends Cell Biol. *25*, 125–136.

Song, Y., Kirkpatrick, L.L., Schilling, A.B., Helseth, D.L., Chabot, N., Keillor, J.W., Johnson, G.V.W., and Brady, S.T. (2013). Transglutaminase and polyamination of tubulin: posttranslational modification for stabilizing axonal microtubules. Neuron *78*, 109–123.

Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. Nat. Genet. *21*, 70–71.

Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., Mandelkow, E., and Mandelkow, E.-M. (2002). Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. J. Cell Biol. *156*, 1051–1063.

Stancik, E.K., Navarro-Quiroga, I., Sellke, R., and Haydar, T.F. (2010). Heterogeneity in ventricular zone neural precursors contributes to neuronal fate diversity in the postnatal neocortex. J. Neurosci. *30*, 7028–7036.

Stepanova, T., Slemmer, J., Hoogenraad, C.C., Lansbergen, G., Dortland, B., De Zeeuw, C.I., Grosveld, F., van Cappellen, G., Akhmanova, A., and Galjart, N. (2003). Visualization of microtubule growth in cultured neurons via the use of EB3-GFP (end-binding protein 3-green fluorescent protein). J. Neurosci. *23*, 2655–2664.

Sternberg, N., and Hamilton, D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination: I. Recombination between loxP sites. J. Mol. Biol. *150*, 467–486.

Stoetzel, C., Bär, S., De Craene, J.-O., Scheidecker, S., Etard, C., Chicher, J., Reck, J.R., Perrault, I., Geoffroy, V., Chennen, K., et al. (2016). A mutation in VPS15 (PIK3R4) causes a ciliopathy and affects IFT20 release from the cis-Golgi. Nat. Commun. *7*, 13586.

Sulimenko, V., Hájková, Z., Klebanovych, A., and Dráber, P. (2017). Regulation of microtubule nucleation mediated by γ-tubulin complexes. Protoplasma *254*, 1187–1199.

Takahashi, T., Nowakowski, R.S., and Caviness, V.S. (1995). The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. J. Neurosci. *15*, 6046–6057.

Tan, S.-S., Kalloniatis, M., Sturm, K., Tam, P.P.., Reese, B.E., and Faulkner-Jones, B. (1998). Separate Progenitors for Radial and Tangential Cell Dispersion during Development of the Cerebral Neocortex. Neuron *21*, 295–304.

Tan, S.S., Faulkner-Jones, B., Breen, S.J., Walsh, M., Bertram, J.F., and Reese, B.E. (1995). Cell dispersion patterns in different cortical regions studied with an X-inactivated transgenic marker. Development *121*, 1029–1039.

Tanaka, T., Serneo, F.F., Higgins, C., Gambello, M.J., Wynshaw-Boris, A., and Gleeson, J.G. (2004). Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. J. Cell Biol. *165*, 709–721.

Taverna, E., and Huttner, W.B. (2010). Neural Progenitor Nuclei IN Motion. Neuron *67*, 906–914.

Tian, G., Jaglin, X.H., Keays, D.A., Francis, F., Chelly, J., and Cowan, N.J. (2010). Disease-associated mutations in TUBA1A result in a spectrum of defects in the tubulin folding and heterodimer assembly pathway. Hum. Mol. Genet. *19*, 3599–3613.

Tian, G., Cristancho, A.G., Dubbs, H.A., Liu, G.T., Cowan, N.J., and Goldberg, E.M. (2016). A patient with lissencephaly, developmental delay, and infantile spasms, due to de novo heterozygous mutation of *KIF2A*. Mol. Genet. Genomic Med. *4*, 599–603.

Toropova, K., Zou, S., Roberts, A.J., Redwine, W.B., Goodman, B.S., Reck-Peterson, S.L., and Leschziner, A.E. (2014). Lis1 regulates dynein by sterically blocking its mechanochemical cycle. Elife *3*.

Tovey, C.A., and Conduit, P.T. (2018). Microtubule nucleation by γ-tubulin complexes and beyond. Essays Biochem. *62*, 765–780.

Trofimova, D., Paydar, M., Zara, A., Talje, L., Kwok, B.H., and Allingham, J.S. (2018). Ternary complex of Kif2A-bound tandem tubulin heterodimers represents a kinesin-13-mediated microtubule depolymerization reaction intermediate. Nat. Commun. *9*, 2628.

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

Tsai, J.-W., Lian, W.-N., Kemal, S., Kriegstein, A.R., and Vallee, R.B. (2010). Kinesin 3 and cytoplasmic dynein mediate interkinetic nuclear migration in neural stem cells. Nat. Neurosci. *13*, 1463–1471.

Tucker, R.W., Pardee, A.B., and Fujiwara, K. (1979). Centriole ciliation is related to quiescence and DNA synthesis in 3T3 cells. Cell *17*, 527–535.

Tyler, W.A., and Haydar, T.F. (2013). Multiplex genetic fate mapping reveals a novel route of neocortical neurogenesis, which is altered in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. J. Neurosci. *33*, 5106–5119.

Tymanskyj, S.R., Yang, B.H., Verhey, K.J., and Ma, L. (2018). MAP7 regulates axon morphogenesis by recruiting kinesin-1 to microtubules and modulating organelle transport. Elife *7*.

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

Ueno, M., Katayama, K., Yamauchi, H., Nakayama, H., and Doi, K. (2006). Cell cycle progression is required for nuclear migration of neural progenitor cells. Brain Res. *1088*, 57–67.

Uyanik, G., Morris-Rosendahl, D.J., Stiegler, J., Klapecki, J., Gross, C., Berman, Y., Martin, P., Dey, L., Spranger, S., Korenke, G.C., et al. (2007). Location and type of mutation in the LIS1 gene do not predict phenotypic severity. Neurology *69*, 442–447.

Uzquiano, A., Cifuentes-Diaz, C., Jabali, A., Romero, D.M., Houllier, A., Dingli, F., Maillard, C., Boland, A., Deleuze, J.-F., Loew, D., et al. (2019). Mutations in the Heterotopia Gene Eml1/EML1 Severely Disrupt the Formation of Primary Cilia. Cell Rep. *28*, 1596–1611.e10.

Valiente, M., and Marín, O. (2010). Neuronal migration mechanisms in development and disease. Curr. Opin. Neurobiol. *20*, 68–78.

Vanderluit, J.L., Ferguson, K.L., and Slack, R.S. (2006). Emerging Roles for the Retinoblastoma Gene Family. In Rb and Tumorigenesis, (Boston, MA: Springer US), pp. 81–105.

Verhey, K.J., and Hammond, J.W. (2009). Traffic control: regulation of kinesin motors. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 765–777.

Vitre, B., Coquelle, F.M., Heichette, C., Garnier, C., Chrétien, D., and Arnal, I. (2008). EB1 regulates microtubule dynamics and tubulin sheet closure in vitro. Nat. Cell Biol. *10*, 415–421.

Vogt, M.A., Ehsaei, Z., Knuckles, P., Higginbottom, A., Helmbrecht, M.S., Kunath, T., Eggan, K., Williams, L.A., Shaw, P.J., Wurst, W., et al. (2018). TDP-43 induces p53-mediated cell death of cortical progenitors and immature neurons. Sci. Rep. *8*, 8097.

Walczak, C.E., Gan, E.C., Desai, A., Mitchison, T.J., and Kline-Smith, S.L. (2002). The microtubule-destabilizing kinesin XKCM1 is required for chromosome positioning during spindle assembly. Curr. Biol. *12*, 1885–1889.

Wang, D., Zhu, H., Ye, Q., Wang, C., and Xu, Y. (2016). Prognostic Value of KIF2A and HER2-Neu Overexpression in Patients With Epithelial Ovarian Cancer. Medicine (Baltimore). *95*, e2803.

WANG, K., LIN, C., WANG, C., SHAO, Q., GAO, W., SONG, B., WANG, L., SONG, X., QU, X., and WEI, F. (2014). Silencing Kif2a induces apoptosis in squamous cell carcinoma of the oral tongue through inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway. Mol. Med. Rep. *9*, 273–278.

Watanabe, T., Kakeno, M., Matsui, T., Sugiyama, I., Arimura, N., Matsuzawa, K., Shirahige, A., Ishidate, F., Nishioka, T., Taya, S., et al. (2015). TTBK2 with EB1/3 regulates microtubule dynamics in migrating cells through KIF2A phosphorylation. J. Cell Biol. *210*, 737–751.

Weckhuysen, S., Marsan, E., Lambrecq, V., Marchal, C., Morin-Brureau, M., An-Gourfinkel, I., Baulac, M., Fohlen, M., Kallay Zetchi, C., Seeck, M., et al. (2016). Involvement of GATOR complex genes in familial focal epilepsies and focal cortical dysplasia. Epilepsia *57*, 994–1003.

Wee, K.B., Surana, U., and Aguda, B.D. (2009). Oscillations of the p53-Akt Network: Implications on Cell Survival and Death. PLoS One *4*, e4407.

Wilkie, A.O. (1994). The molecular basis of genetic dominance. J. Med. Genet. *31*, 89–98.

Wilsch-Bräuninger, M., Peters, J., Paridaen, J.T.M.L., and Huttner, W.B. (2012). Basolateral rather than apical primary cilia on neuroepithelial cells committed to delamination. Development *139*, 95–105.

Winding, M., Kelliher, M.T., Lu, W., Wildonger, J., and Gelfand, V.I. (2016). Role of kinesin-1–based microtubule sliding in Drosophila nervous system development. Proc. Natl. Acad. Sci. *113*, E4985–E4994.

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. Dev. Neurobiol. *76*, 1293–1307.

Wodarz, A., and Huttner, W.B. (2003). Asymmetric cell division during neurogenesis in Drosophila and vertebrates. Mech. Dev. *120*, 1297–1309.

Wong, M., and Roper, S.N. (2016). Genetic animal models of malformations of cortical development and epilepsy. J. Neurosci. Methods *260*, 73–82.

Wong, Y.L., Dietrich, K.A., Naber, N., Cooke, R., and Rice, S.E. (2009). The Kinesin-1 tail conformationally restricts the nucleotide pocket. Biophys. J. *96*, 2799–2807.

Wu, Q.-F., Yang, L., Li, S., Wang, Q., Yuan, X.-B., Gao, X., Bao, L., and Zhang, X. (2012). Fibroblast Growth Factor 13 Is a Microtubule-Stabilizing Protein Regulating Neuronal Polarization and Migration. Cell *149*, 1549–1564.

Xiang, H., Kinoshita, Y., Knudson, C.M., Korsmeyer, S.J., Schwartzkroin, P.A., and Morrison, R.S. (1998). Bax involvement in p53-mediated neuronal cell death. J. Neurosci. *18*, 1363–1373.

Yagensky, O., Kalantary Dehaghi, T., and Chua, J.J.E. (2016). The Roles of Microtubule-Based Transport at Presynaptic Nerve Terminals. Front. Synaptic Neurosci. *8*, 3.

Yamada, M., Toba, S., Yoshida, Y., Haratani, K., Mori, D., Yano, Y., Mimori-Kiyosue, Y., Nakamura, T., Itoh, K., Fushiki, S., et al. (2008). LIS1 and NDEL1 coordinate the plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein. EMBO J. *27*, 2471–2483.

Yamada, M., Hirotsune, S., and Wynshaw-Boris, A. (2010). The essential role of LIS1, NDEL1 and Aurora-A in polarity formation and microtubule organization during neurogensis. Cell Adh. Migr. *4*, 180–184.

Yau, K.W., van Beuningen, S.F.B., Cunha-Ferreira, I., Cloin, B.M.C., van Battum, E.Y., Will, L., Schätzle, P., Tas, R.P., van Krugten, J., Katrukha, E.A., et al. (2014). Microtubule Minus-End Binding Protein CAMSAP2 Controls Axon Specification and Dendrite Development. Neuron *82*, 1058–1073.

Yi, J.Y., Ori-McKenney, K.M., McKenney, R.J., Vershinin, M., Gross, S.P., and Vallee, R.B. (2011). High-resolution imaging reveals indirect coordination of opposite motors and a role for LIS1 in high-load axonal transport. J. Cell Biol. *195*, 193–201.

Yoshida, H., Kong, Y.-Y., Yoshida, R., Elia, A.J., Hakem, A., Hakem, R., Penninger, J.M., and Mak, T.W. (1998). Apaf1 Is Required for Mitochondrial Pathways of Apoptosis and Brain Development. Cell *94*, 739–750.

Yoshimura, T., Arimura, N., Kawano, Y., Kawabata, S., Wang, S., and Kaibuchi, K. (2006). Ras regulates neuronal polarity via the PI3-kinase/Akt/GSK-3β/CRMP-2 pathway. Biochem. Biophys. Res. Commun. *340*, 62–68.

Youn, Y.H., and Han, Y.-G. (2018). Primary Cilia in Brain Development and Diseases. Am. J. Pathol. *188*, 11–22.

Yuen, Y.T.K., Guella, I., Roland, E., Sargent, M., and Boelman, C. (2019). Case reports: novel TUBG1 mutations with milder neurodevelopmental presentations. BMC Med. Genet. *20*, 95.

Zanic, M., Stear, J.H., Hyman, A.A., and Howard, J. (2009). EB1 Recognizes the Nucleotide State of Tubulin in the Microtubule Lattice. PLoS One *4*, e7585.

Zechner, D., Fujita, Y., Hülsken, J., Müller, T., Walther, I., Taketo, M.M., Bryan Crenshaw, E., Birchmeier, W., and Birchmeier, C. (2003). β-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system. Dev. Biol. *258*, 406–418.

Zhadanov, A.B., Provance, D.W., Speer, C.A., Coffin, J.D., Goss, D., Blixt, J.A., Reichert, C.M., and Mercer, J.A. (1999). Absence of the tight junctional protein AF-6 disrupts epithelial cell-cell junctions and cell polarity during mouse development. Curr. Biol. *9*, 880–888.

Zhang, J., Li, S., Fischer, R., and Xiang, X. (2003). Accumulation of Cytoplasmic Dynein and Dynactin at Microtubule Plus Ends in *Aspergillus nidulans* Is Kinesin Dependent. Mol. Biol. Cell *14*, 1479–1488.

Zhang, R., Alushin, G.M., Brown, A., and Nogales, E. (2015). Mechanistic Origin of Microtubule Dynamic Instability and Its Modulation by EB Proteins. Cell *162*, 849–859.

Zhang, W., Yang, S.-L., Yang, M., Herrlinger, S., Shao, Q., Collar, J.L., Fierro, E., Shi, Y., Liu, A., Lu, H., et al. (2019). Modeling microcephaly with cerebral organoids reveals a WDR62–CEP170–KIF2A pathway promoting cilium disassembly in neural progenitors. Nat. Commun. *10*, 2612.

Zhang, X., Lei, K., Yuan, X., Wu, X., Zhuang, Y., Xu, T., Xu, R., and Han, M. (2009). SUN1/2 and Syne/Nesprin-1/2 Complexes Connect Centrosome to the Nucleus during Neurogenesis and Neuronal Migration in Mice. Neuron *64*, 173–187.

Zhang, Y., You, X., Liu, H., Xu, M., Dang, Q., Yang, L., Huang, J., and Shi, W. (2017). High KIF2A expression predicts unfavorable prognosis in diffuse large B cell lymphoma. Ann. Hematol. *96*, 1485–1491.

ZHANG, X., MA, C., WANG, Q., LIU, J., TIAN, M., YUAN, Y., LI, X., and QU, X. (2016). Role of KIF2A in the progression and metastasis of human glioma. Mol. Med. Rep. *13*, 1781–1787.

Zheng, B., Sage, M., Sheppeard, E.A., Jurecic, V., and Bradley, A. (2000). Engineering Mouse Chromosomes with Cre-loxP: Range, Efficiency, and Somatic Applications. Mol. Cell. Biol. *20*, 648–655.

Zhu, C., Zhao, J., Bibikova, M., Leverson, J.D., Bossy-Wetzel, E., Fan, J.-B., Abraham, R.T., and Jiang, W. (2005). Functional Analysis of Human Microtubule-based Motor Proteins, the Kinesins and Dyneins, in Mitosis/Cytokinesis Using RNA Interference. Mol. Biol. Cell *16*, 3187–3199.

Résultats annexes

Article 1

TUBG1 missense variants underlying cortical malformations disrupt neuronal locomotion and microtubule dynamics but not neurogenesis

Ekaterina L. Ivanova, **Johan G. Gilet**, Vadym Sulimenko, Arnaud Duchon, Gabrielle Rudolf, Karen Runge, Stephan C. Collins, Laure Asselin, Loic Broix, Nathalie Drouot, Peggy Tilly, Patrick Nusbaum, Alexandre Vincent, William Magnant, Valerie Skory, Marie-Christine Birling, Guillaume Pavlovic, Juliette D. Godin, Binnaz Yalcin, Yann Hérault, Pavel Dráber, Jamel Chelly & Maria-Victoria Hinckelmann.

Article publié dans *Nature communication* en 2019.

Résumé :

Des variants faux-sens hétérozygotes *de novo* dans le gène TUBG1 ont été lié à l'induction de malformations du développement cortical associées à une déficience intellectuelle et des crises d'épilepsie. Dans ce papier, nous avons étudié par le biais de l'électroporation *in-utero* et *in vivo*, comment quatre de ces variants affectent le développement cortical. En outre, nous avons démontré grâce aux fibroblastes de patients que les variants pathogènes de TUBG1 provoquent une perturbation de la dynamique des microtubules non reliée à des défauts majeurs fonctionnels ou structurels du centrosome. De plus, nous avons développé un modèle de souris knock-in pour la mutation Y92C, ce qui nous a permis d'évaluer les conséquences de cette mutation sur le développement cortical. Lors de cette étude, il a pu être démontré que bien que le positionnement centrosomal dans les neurones bipolaires lors de la migration neuronale est correct, les neurones ne parviennent pas à initier la locomotion. Pour finir, les animaux TUBG1$^{Y92C/+}$ présentent des anomalies neuro-anatomiques et comportementales et une susceptibilité accrue à l'épilepsie. A l'aide de cette étude nous montrons que les souris knock-in TUBG1 imitent partiellement le phénotype humain et représente donc un modèle pertinent pour la recherche sur la physiopathologie des malformations corticales. Mon travail dans cette étude a été focalisé sur l'étude de l'influence des mutations de TUBG1 sur la dynamique des microtubules par l'étude de la dynamique des comètes EB3. De plus, j'ai participé à la caractérisation du modèle souris knock-in TUBG1^{Y92C}.

nature COMMUNICATIONS

ARTICLE

https://doi.org/10.1038/s41467-019-10081-8 OPEN

TUBG1 missense variants underlying cortical malformations disrupt neuronal locomotion and microtubule dynamics but not neurogenesis

Ekaterina L. Ivanova[1,2,3,4], Johan G. Gilet[1,2,3,4], Vadym Sulimenko[5], Arnaud Duchon[1,2,3,4], Gabrielle Rudolf[1,2,3,4], Karen Runge[1,2,3,4], Stephan C. Collins[1,2,3,4,6], Laure Asselin[1,2,3,4], Loic Broix[1,2,3,4], Nathalie Drouot[1,2,3,4], Peggy Tilly[1,2,3,4], Patrick Nusbaum[7], Alexandre Vincent[1,2,4], William Magnant[1,2,4], Valerie Skory[1,2,3,4], Marie-Christine Birling[8], Guillaume Pavlovic[8], Juliette D. Godin[1,2,3,4], Binnaz Yalcin[1,2,3,4], Yann Hérault[1,2,3,4], Pavel Dráber[5], Jamel Chelly[1,2,3,4,9,10,11] & Maria-Victoria Hinckelmann[1,2,3,4,11]

De novo heterozygous missense variants in the γ-tubulin gene *TUBG1* have been linked to human malformations of cortical development associated with intellectual disability and epilepsy. Here, we investigated through in-utero electroporation and in-vivo studies, how four of these variants affect cortical development. We show that *TUBG1* mutants affect neuronal positioning, disrupting the locomotion of new-born neurons but without affecting progenitors' proliferation. We further demonstrate that pathogenic *TUBG1* variants are linked to reduced microtubule dynamics but without major structural nor functional centrosome defects in subject-derived fibroblasts. Additionally, we developed a knock-in *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mouse model and assessed consequences of the mutation. Although centrosomal positioning in bipolar neurons is correct, they fail to initiate locomotion. Furthermore, *Tubg1*$^{Y92C/+}$ animals show neuroanatomical and behavioral defects and increased epileptic cortical activity. We show that *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice partially mimic the human phenotype and therefore represent a relevant model for further investigations of the physiopathology of cortical malformations.

[1] Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 67400 Illkirch, France. [2] Centre National de la Recherche Scientifique, UMR7104, 67400 Illkirch, France. [3] Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1258, 67400 Illkirch, France. [4] Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France. [5] Institute of Molecular Genetics of the Czech Academy of Sciences, Vídeňská 1083, 142 20 Prague, Czech Republic. [6] Université de Bourgogne, SVTE, Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France. [7] Service de Biochimie et de Génétique Moléculaire, Hôpital Cochin, AP-HP, Paris 75014, France. [8] CELPHEDIA, PHENOMIN, Institut Clinique de la Souris (ICS), 1 rue Laurent Fries, F-67404 Illkirch-Graffenstaden, France. [9] Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France. [10] Laboratoire de Diagnostic Génétique, Hôpitaux Universitaire de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France. [11] These authors jointly supervised this work: Jamel Chelly, Maria-Victoria Hinckelmann. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.-V.H. (email: hinckelm@igbmc.fr)

The proper formation of the six-layered structure of the mammalian cortex depends on three highly regulated processes: proliferation of progenitor cells, migration of post-mitotic neurons and their maturation. Two main proliferative zones generate the majority of cortical neurons: the dorsal ventricular zone, where projection neurons are born, and the medial and caudal ganglionic eminences, where interneurons are generated. Projection neurons will then migrate radially along radial glial fibers[1], while interneurons will migrate tangentially over longer distances and independently of radial glial cells[2]. Alterations in these finely coordinated processes can lead to neurodevelopmental disorders including malformations of cortical development (MCDs), recognized as a frequent cause of epilepsy and intellectual delay[3].

Over the past decades, genetic studies have identified numerous causative mutations in subjects with MCDs and have greatly advanced our knowledge about the mechanisms and biological pathways involved in cortical formation and the pathophysiological mechanisms of MCDs[4,5]. These studies have outlined the importance of microtubules in every step of cortical development. Mutations in tubulins (TUBA1A, TUBB2B, TUBB3) and microtubule-associated proteins (LIS1, DCX, KIF2A, KIF5C, DYNC1H1) have been linked to a large spectrum of cortical malformations[6,7]. Moreover, microtubule organizing centers (MTOCs) such as the centrosome are highly implicated in the proper cerebral development, since multiple MCD-causing variants have been identified in proteins localizing at this organelle. Pathogenic variants in the pericentriolar and centrosomal proteins *CDK5RAP2*, *CENPJ*, *CEP135*, *WDR62*, *CEP152*, *ASPM*, and *STIL* have been discovered in subjects with primary microcephaly[8–13].

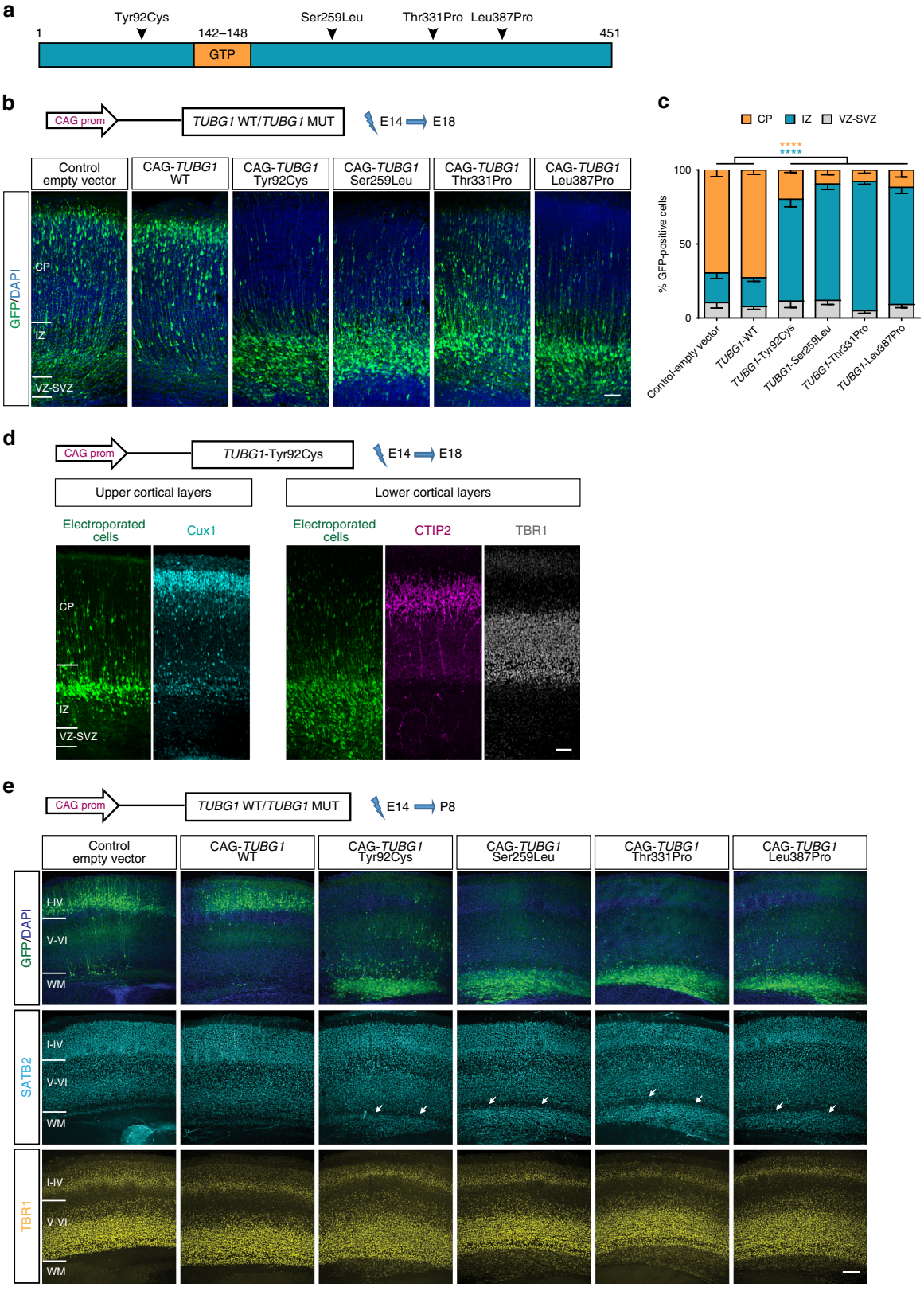
As far as centrosomal proteins are concerned, we have previously reported three missense variants in the γ-tubulin gene *TUBG1*, in subjects with posterior predominant pachygyria, corpus callosum abnormalities and microcephaly for two of the patients, associated with epilepsy and developmental delay[14]. A recent study reports four additional heterozygous pathogenic *TUBG1* variants in subjects with similar clinical features and posterior cortical malformations[15]. In mammalian cells, γ-tubulin is highly conserved and often encoded by two genes. For instance, human γ-tubulin 1 and γ-tubulin 2 (TUBG1 and TUBG2) show, respectively, 98.9 and 97.6% amino acid sequence identity with the corresponding mouse isoforms[16]. *TUBG1* is thought to be ubiquitously expressed while expression of *TUBG2* appears to be restricted to the brain[16,17]. Both isoforms are concentrated at the centrosome[18–20]. Gamma-tubulin is a component of two characterized complexes γ-TuCs: the γ-tubulin small complex (γTuSC) and the γ-tubulin ring complex (γTuRC)[21]. γTuSC consists of a γ-tubulin dimer associated with one molecule of each GCP2 and GCP3. Multiple γTuSCs associate with other proteins (GCP4, GCP5, and GCP6) to form γTuRCs, which are recruited to MTOCs where they serve as template for microtubule nucleation[22–24]. Both γ-tubulin 1 and γ-tubulin 2 are found in γ-TuCs[20] and reportedly shown to nucleate microtubules[19]. However, the degree of their functional redundancy remains to be elucidated.

Here, we investigated the consequences of four human MCDs-related *TUBG1* variants (Tyr92Cys, Ser259Leu, Thr331Pro, and Leu387Pro) on cortical development by using in utero electroporation and a knock-in *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mouse model. We show that pathogenic *TUBG1* variants affect neuronal positioning by disrupting neuronal migration without a major effect on progenitor proliferation. Our results suggest that disease-related *TUBG1* variants exert their pathogenicity by affecting microtubule dynamics rather than centrosomal positioning or nucleation ability. Additionally, we report cortical and hippocampal neuroanatomical anomalies in our *Tubg1*$^{Y92C/+}$ animals, associated with behavioral alterations and susceptibility to epilepsy.

Results

***TUBG1* pathogenic variants alter neuronal positioning**. Subjects with *TUBG1* pathogenic variants present with abnormal cortical thickness and layering, suggesting neuronal mispositioning arising from alterations during cortical development. To investigate the effect of pathogenic *TUBG1* variants on neuronal positioning in vivo, we used in utero electroporation to induce overexpression of the four pathogenic variants (Fig. 1a) under the control of a CAG promoter, together with a GFP-encoding reporter in progenitors. We confirmed co-expression of the fluorescent reporter with all *TUBG1* pathogenic variants and their stable overexpression, by immunohistochemistry in electroporated neurons and immunoblot in Neuro2a cells (Supplementary Fig. 1a–d). Mice cortices were electroporated at E14.5 and the distribution of electroporated cells was analyzed after 4 days. In brain sections expressing the control-empty vector, the majority of the electroporated neurons were positioned within the upper layers of the cortical plate (CP). Overexpression of human WT-*TUBG1* showed a normal pattern of distribution. On the contrary, cells expressing any disease-related variant were mainly localized in the intermediate zone (IZ), with almost no electroporated cells reaching the CP (Fig. 1b, c). Arrested neurons express Cux1, an upper cortical layer marker, while they are negative for deep layer markers (CTIP2, TBR1) (Fig. 1d), suggesting they are committed to upper-layers cortical projection neurons. Default in positioning persists at both early (P8) and relatively mature postnatal stages (P20). Similarly to our data at E18.5, abnormally localized cells in the white matter express only upper-layer markers (Fig. 1e and Supplementary Fig. 1e). This indicates that the phenotype is not a transient phenomenon and is probably due to an arrest rather than a delay in neuronal migration.

Given the similarity between *TUBG1* and *TUBG2*, we characterized their expression profile during cortical development. *Tubg1* mRNA levels in mouse cortices remain relatively constant throughout embryonic development, whereas *TUBG2* mRNA levels are low during early embryonic stages and progressively increase starting from E16.5 (Supplementary Fig. 2a). Additionally, we investigated a possible functional redundancy of the two isoforms during cortical development. First, we tested whether TUBG1 and TUBG2 can recover the phenotype shown to be associated to TUBG1 knock-down[14] by co-electroporating sh-*Tubg1* with either *TUBG1*, *TUBG2* or pathogenic *TUBG1*. Overexpression of *TUBG1* or *TUBG2* alone did not induce a particular phenotype in neuronal positioning (Supplementary Fig. 2b). Inversely, downregulation of *Tubg1* leads to misplacement of neurons, which at E18.5 are mainly localized in the IZ. This phenotype was significantly recovered when WT-*TUBG1* was expressed but barely modified by *TUBG2* co-expression, and even accentuated by co-electroporation of TUBG1-Tyr92Cys (Supplementary Fig. 2c). We then performed a series of complementation experiments by co-electroporating the Tyr92Cys *TUBG1* variant with increasing concentrations of either *TUBG1* or *TUBG2*. Co-electroporation of either isoforms leads to a rescue in the neuronal positioning defect, nonetheless, while a significant restauration of the phenotype was obtained with *TUBG1*, rescue with TUBG2 was only partial and dose-dependent (Supplementary Fig. 2d). However, *TUBG2* rescue was significant for other mutants (Supplementary Fig. 2e). Altogether, these results suggest limited functional overlap between the two isoforms during cortical development.



Post-mitotic processes underlie abnormal positioning. To better understand mechanisms underlying the observed positioning defects, we studied the effects on progenitor cells and on post-mitotic neurons. We first analyzed whether *TUBG1* pathogenic variants affect proliferation by evaluating the percentage of mitotic progenitors. For three of the variants, no difference in mitotic index was observed. However, the Thr331Pro variant increased in the number of VZ progenitors in mitosis (Supplementary Fig. 3a). To determine whether this is due to an increased number of cells entering mitosis or a decreased number of cells exiting the cell cycle, we performed a cell cycle exit assay (Supplementary Fig. 3b), focusing on two of the variants,

Fig. 1 Pathogenic variants in *TUBG1* alter neuronal positioning. **a** Linear representation of TUBG1 polypeptide. Black arrows indicate relative position of the four investigated mutations. **b** Coronal sections of E18.5 brains electroporated at E14.5 with either a control-empty vector, the WT form or one of the four *TUBG1* mutated forms and co-electroporated with a GFP-encoding reporter (green), stained with DAPI (blue) Scale bar 50 µm. **c** Percentage of fluorescent cells in three different regions: CP, IZ, VZ/SVZ. Data from at least three embryos per condition were analyzed with Two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test, $^{****}p < 0.0001$, compared to control-empty vector or TUBG1 wild type overexpression. **d** Coronal sections of E18.5 brains electroporated at E14.5 with the Tyr92Cys variant and stained for the upper-layer marker Cux1 (cyan), deep layers markers CTIP2 (magenta), TBR1 (gray) and DAPI (blue). Scale bar 50 µm. **e** Coronal sections of P8 brains electroporated at E14.5 with either a control-empty vector or one of the four mutant *TUBG1* forms. Sections were stained for the upper-layer marker SATB2 (cyan), lower layer marker TBR1 (yellow) and with DAPI (blue). White arrows show ectopic $SATB2^+$ cells in the white matter (WM). Scale bar 250 µm. CP, cortical plate; IZ, intermediate zone; VZ/SVZ, ventricular zone/subventricular zone. Data are represented as mean ± s.e.m. Source data are provided in the Source Data file

Tyr92Cys presenting no proliferation alteration and Thr331Pro, with an increased mitotic index. We observed that the Thr331Pro variant induced a decrease in the number of progenitors exiting the cell cycle with a tendency of increasing the progenitors having undergone S-phase (Edu+), suggesting a prolonged cell cycle, while no significant alterations were observed for the Tyr92Cys variant (Supplementary Fig. 3b–e). Also, we performed Pax6/Tbr2 immunolabelling and observed no alteration in the percentage of apical ($Pax6^+/Tbr2^-$) and intermediate ($Pax6^-/Tbr2^+$) progenitors, nor in the percentage of generated neurons ($Pax6^-/Tbr2^-$) (Supplementary Fig. 3f), suggesting that *TUBG1* variants do not affect the balance between proliferative and neurogenic divisions of progenitor cells. Finally, we analyzed the structure of radial glial fibers and confirmed for all conditions, they are correctly formed and attached to the pial surface (Supplementary Fig. 3g). Altogether, these data indicate no major effect of three out of the four studied variants on progenitor cells.

In view of these results, we studied the pathogenicity of *TUBG1* variants specifically in post-mitotic neurons. We electroporated WT or *TUBG1* human pathogenic variants under the control of the weak neuron-specific promoter Doublecortin (DCX)[25] to avoid overexpression (Supplementary Fig. 4a), with a strong NeuroD-GFP reporter, and studied neuronal positioning at E18.5. Brain sections expressing either control-empty vector or *TUBG1*-WT showed normal distribution of electroporated cells (Fig. 2a, b). However, for pathogenic variants, a large proportion of electroporated cells was accumulated in the IZ, and this accumulation was less severe for Thr331Pro variant. Interestingly, for all mutant forms, many electroporated cells were abnormally located in the lower layers of the CP (Fig. 2c). We also confirmed persistence of the phenotype at early (P3 and P8) and at relatively mature postnatal stages (P21). Yet again, mispositioned neurons express upper rather than deep cortical layer markers (Supplementary Fig. 4c–e). Together, these data support the idea of a disrupted neuronal migration, possibly due to defects in post-mitotic processes.

We also assessed neuronal positioning in the hippocampus by in utero electroporation of the ammonic neuroepithelium at E14.5. Neurons electroporated with WT-*TUBG1* were found exclusively within the pyramidal layer at P8 (Fig. 2d). Neurons electroporated with *TUBG1*-Tyr92Cys were however partially located within the stratum oriens. NeuN and CTIP2 staining revealed they were differentiated into mature pyramidal neurons (Fig. 2d and Supplementary Fig. 4f). Thus, *TUBG1* variants affect migration of pyramidal neurons both in the neocortex and the hippocampus.

Disease-causing variants affect neuronal migration dynamics. To further understand disrupted neuronal positioning, we studied neuronal migration using time-lapse videomicroscopy to follow the dynamics in morphology and locomotion of migrating neurons exiting the ventricular zone. We focused our studies on the Tyr92Cys and the Thr331Pro variants. For both, we observed a strikingly reduced number of neurons in the locomotion phase compared to control-empty vector and WT-*TUBG1*, with the majority of neurons remaining immobilized at the edge of the IZ (Fig. 3a, b and Supplementary movies 1–4). We measured the speed and pausing for migrating neurons and observed no major differences for average locomotion velocity compared to WT (Fig. 3c). Nonetheless, expression of the Tyr92Cys variant increased pausing and time spend in pause (Fig. 3d, e). We observed that the majority of arrested neurons presented a bipolar morphology which was maintained throughout the 10 h of recording. However, we did not detect any defects in morphology transition preceding the migration process (Fig. 3f, g).

Given the importance of TUBG1 in the organization of the centrosome and the key role of this organelle for neuronal migration, we examined centrosome dynamics in both migrating and non-migrating neurons in mouse cortices by co-electroporation with the PACT-mKO1 construct allowing labelling of the centrosome (Fig. 3h). No differences in centrosome positioning were observed for migrating neurons between the control and pathogenic *TUBG1*. Most of these migrating neurons display the centrosome ahead of the nucleus within the leading process followed by a forward displacement of the soma (Fig. 3i). On the other hand, centrosome localization in non-migrating neurons differs between control and *TUBG1*-Tyr92Cys conditions. While control neurons' centrosome is mainly localized randomly or behind the nucleus, for the Tyr92Cys variant there was an abrupt increase in cells with centrosome located ahead of the nucleus (from 10.4% in the control to 42.8% in Tyr92Cys condition) (Fig. 3j). Further analysis showed that these cells are mainly bipolar. Indeed, this configuration (non-migrating bipolar neurons with centrosome ahead of the nucleus) was only observed in 5% of control neurons but in over 50% of the Tyr92Cys neurons (Fig. 3k). Together, these results highlight a population of immobilized neurons that although adopting the correct bipolar morphology and correctly positioning their centrosome, fail to initiate glial-guided locomotion.

Disrupted locomotion linked to altered microtubule dynamics. We performed series of in cellulo experiments aiming to investigate a potential effect of *TUBG1* pathogenic variants on microtubule organization and dynamics. First, we analyzed the subcellular localization of recombinant TUBG1 using a *TUBG1*-RFP fusion construct. As shown in Supplementary Fig. 5a, all four variants are concentrated at the centrosome of differentiated Neuro2a cells and are also diffusely found in the cytosol, similarly to the WT.

We then analyzed microtubule organization in fibroblasts derived from a skin biopsy from two of the subjects (bearing the Tyr92Cys and the Thr331Pro variants) and compared them with three different unrelated control fibroblasts. We observed normal microtubule network with microtubule arrays emerging from

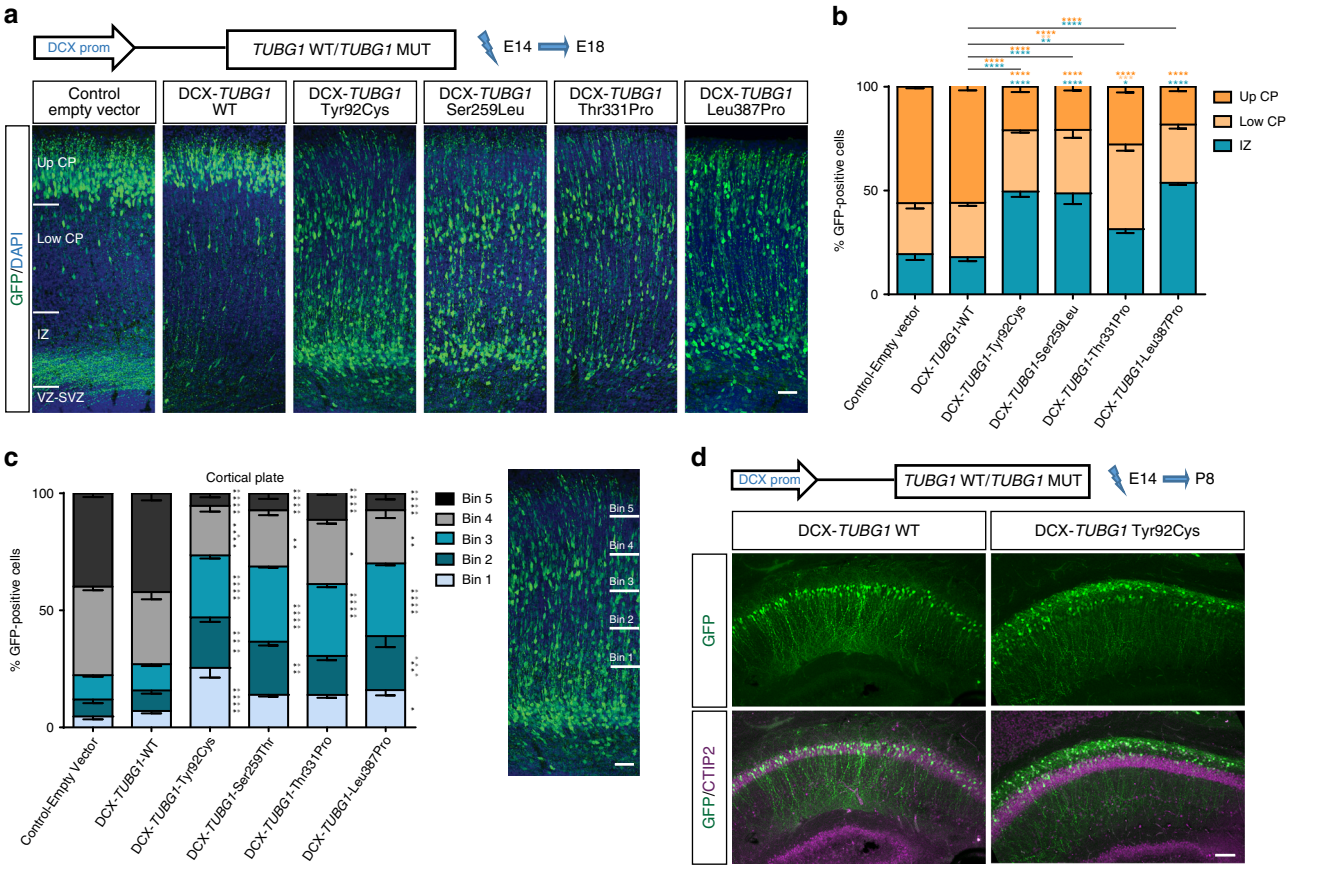
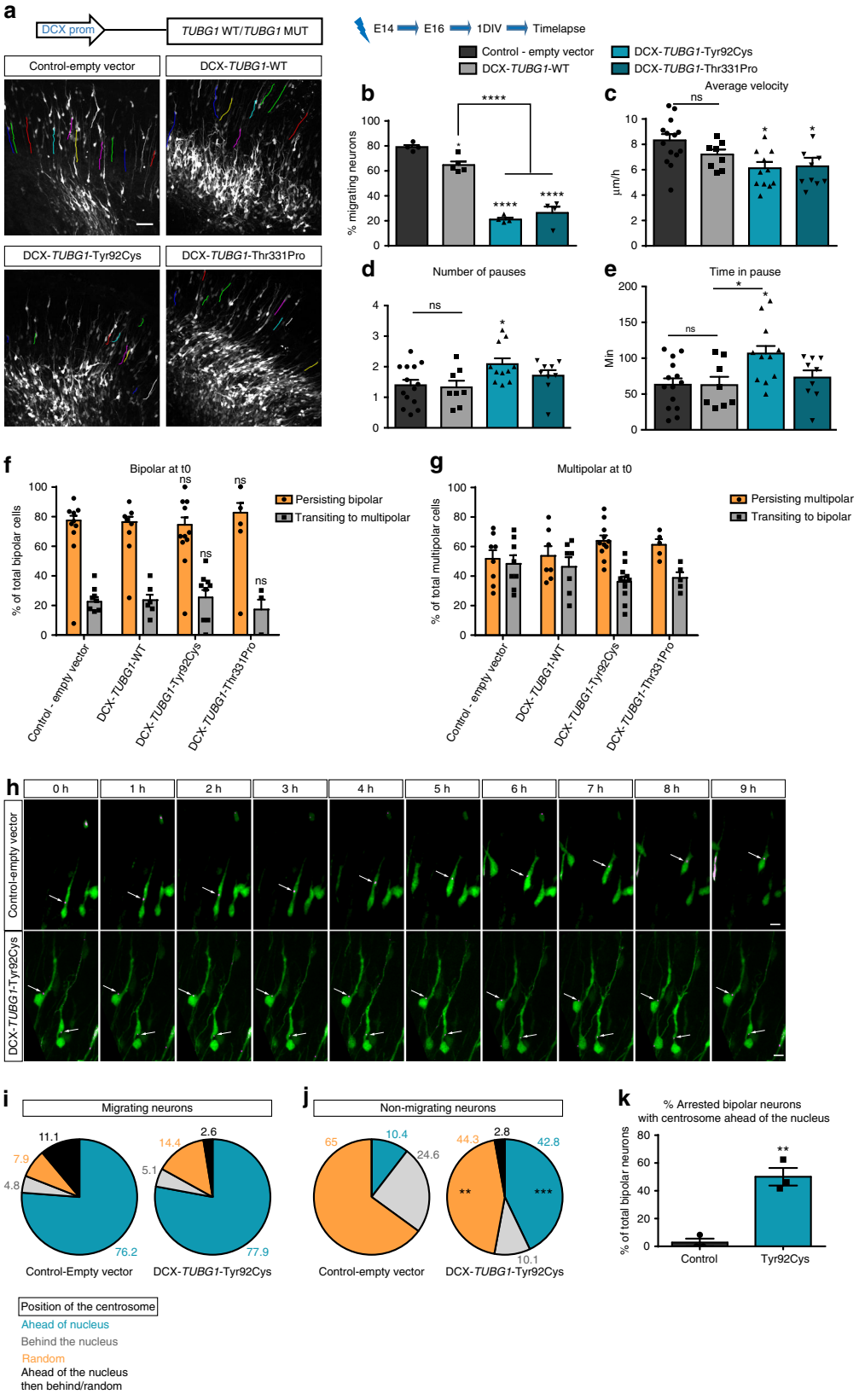


Fig. 2 Neuron-specific expression of *TUBG1* mutations affects neuronal positioning **a** Coronal sections of E18.5 brains electroporated at E14.5 with either a control-empty vector, WT-*TUBG1* or one of the four mutated forms of *TUBG1* under the control of a neuron-specific DCX promoter and co-electroporated with a reporter construction encoding for GFP under the control of a neuron-specific NeuroD promoter (green). Sections were stained with DAPI (blue). CP, cortical plate; IZ, intermediate zone; VZ/SVZ, ventricular zone/subventricular zone. Scale bar 50 µm. **b** Quantification of fluorescent neurons in three different regions: up CP, down CP, and IZ for at least four electroporated embryos per group, Two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$, compared to control-empty vector or wild type TUBG1 overexpression. **c** Quantification of fluorescent neurons in the cortical plate. The image on the right shows the cortical plate divided in five equal sections (bins). Scale bar 50 µm. GFP-positive cells were counted in each bin for at least four embryos per condition, Two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$, black asterisks compared to control-empty vector and gray asterisks compared to TUBG1 wild type overexpression. **d** In utero electroporation of DCX-*TUBG1*-Y92C or WT together with GFP (green) in the ammonic neuroepithelium at E14.5. Images show coronal sections of the CA1 region of the hippocampus at P8 counterstained with CTIP2 marker (magenta). Scale bar 150 µm. Data are represented as mean ± s.e.m. Source data are provided in the Source Data file

centrosomes (Fig. 4a). Fibroblasts did not present any shape or morphology abnormalities. However, after induced depolymerization, we saw that newly nucleated microtubules were shorter and with less organized structure in affected subjects' fibroblasts, compared to longer and straight control microtubules (Fig. 4b, c). Furthermore, we used these cells to analyze the centrosomal structure and organization by electron microscopy. We observed no significant difference in patients' fibroblasts compared to control ones (Supplementary Fig. 5b).

We then investigated the effect of *TUBG1* variants on microtubule dynamics using videomicroscopy after transfecting plus end-binding protein EB3-GFP in HeLa cells[26]. Though overexpression of WT-*TUBG1* led to a slight decrease in microtubule dynamics, we observed a more drastic decrease in microtubule polymerization rate for the three variants Tyr92Cys, Ser259Leu and Thr331Pro (Fig. 4d, e and Supplementary movies 5–10) significantly different from both control-empty vector and wild type overexpression. Similar results were obtained with subject-derived fibroblasts bearing the Tyr92Cys and the Thr331Pro variants (Fig. 4f, g and Supplementary movies 11–15). These data show that *TUBG1* mutations decrease microtubule dynamics which could pave the way to better explain the altered locomotion phenotype.

Finally, we investigated the capacity of mutant mouse Tubg1 (mTubg1) to form γ-tubulin complexes by performing immunoprecipitations with anti-TagRFP antibody from extracts of Neuro2A cells expressing either mTubg1-TagRFP (WT control) or its pathogenic variants. Western blots were immunostained for RFP, GCP2 (marker for γTuSC), GCP4 (marker for γTuRC) and total γ-tubulin. Results revealed quantitative differences in proteins co-precipitated with mTubg1-TagRFP. When compared with WT, lower amounts of GCP2, GCP4, and γ-tubulin were associated with mutated variants of mTubg1-TagRFP, while similar amounts of TagRFP-tagged γ-tubulins were detected in all samples (Fig. 4h, Supplementary Fig. 5c, d). Reciprocal immunoprecipitation with anti-GCP2 antibody confirmed reduced association of mutated variants with GCP2 (Fig. 4i). Similar amounts of co-precipitated GCP2, GCP4, and endogenous γ-tubulin were detected in all samples. Altogether, these results suggest that mutant recombinant TUBG1 has a decreased ability to dimerize and to form γ-tubulin complexes.



Knock-in *Tubg1*$^{Y92C/+}$ embryos show abnormal cortical layering. To further study the effects of *Tubg1* variants in vivo, we generated a constitutive knock-in mouse model (*Tubg1*$^{Y92C/+}$) bearing the first identified disease-causing mutation Tyr92Cys. In this model, the Tyr92Cys variant is constitutively expressed at a heterozygous state on the C57 black 6 (C57BL/6 N) genetic background (Supplementary Fig. 6a). To validate our model, we performed RT-PCR, and subsequent qPCR and Sanger sequencing, as well as immunoblots. We confirmed heterozygous presence of the mutation and comparable mRNA levels between

Fig. 3 Real-time recordings of migrating cortical neurons. **a** Locomotory paths (colored lines) of electroporated neurons recorded during time-lapse imaging. Scale bar 50 µm. **b**–**e** Percentage of migrating neurons ($n = 4$ independent time-lapse experiments per group) (**b**), average migration velocity ($n \geq 8$ independent time-lapse experiments per group) (**c**), average number of pauses ($n \geq 8$ independent time-lapse experiments per group) (**d**), and total time spent in pause ($n \geq 8$ independent time-lapse experiments per group) (**e**) during the 10 h of recording. Data were analyzed with One-way ANOVA with Tukey's post hoc test, $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{****}p < 0.0001$ compared to control-empty vector; $^{****}p < 0.0001$ compared to DCX-*TUBG1*-WT. **f** Percentage of electroporated bipolar cells persisting bipolar or transitioning to multipolar morphology in 10 h recordings ($n = 4$ independent experiments per group). Comparisons were made to control-empty vector and TUBG1 wild type overexpression. **g** Percentage of electroporated multipolar cells persisting multipolar or transitioning to bipolar morphology in 10 h recordings ($n = 5$ independent experiments per group). Comparisons were made to control-empty vector and TUBG1 wild type overexpression, Two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. **h**–**k**. Centrosome positioning in migrating and non-migrating neurons. **h** Sequences of images during time-lapse recording of bipolar neurons co-electroporated with GFP (green) and the centrosomal marker PACT-mKO1 (magenta) together with either control or *TUBG1*-Tyr92Cys. Centrosome is indicated by white arrows. Scale bar 10 µm. Quantification of centrosome positioning in migrating (**i**) and non-migrating (**j**) neurons. Neurons were divided in four different categories according the position of their centrosome during the time-lapse recording: ahead of the nucleus, behind the nucleus, random relative to the nucleus, ahead of the nucleus in the beginning of the recording and then behind it or random. Data are represented as pie charts for either migrating or non-migrating neurons. Two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$. **k** Percentage of arrested electroporated bipolar neurons with the centrosome ahead of nucleus, $n \geq 3$ independent time-lapse experiments per group, Unpaired *t*-test, $p = 0.0024$, compared to control-empty vector. Histograms represent mean ± s.e.m. Source data are provided in the Source Data file

mutant and WT allele, as well as stability of the protein (Supplementary Fig. 6b–e). *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice were born in the expected Mendelian ratios and developed normally with a usual lifespan. Interestingly, both male and female mice exhibited subfertility.

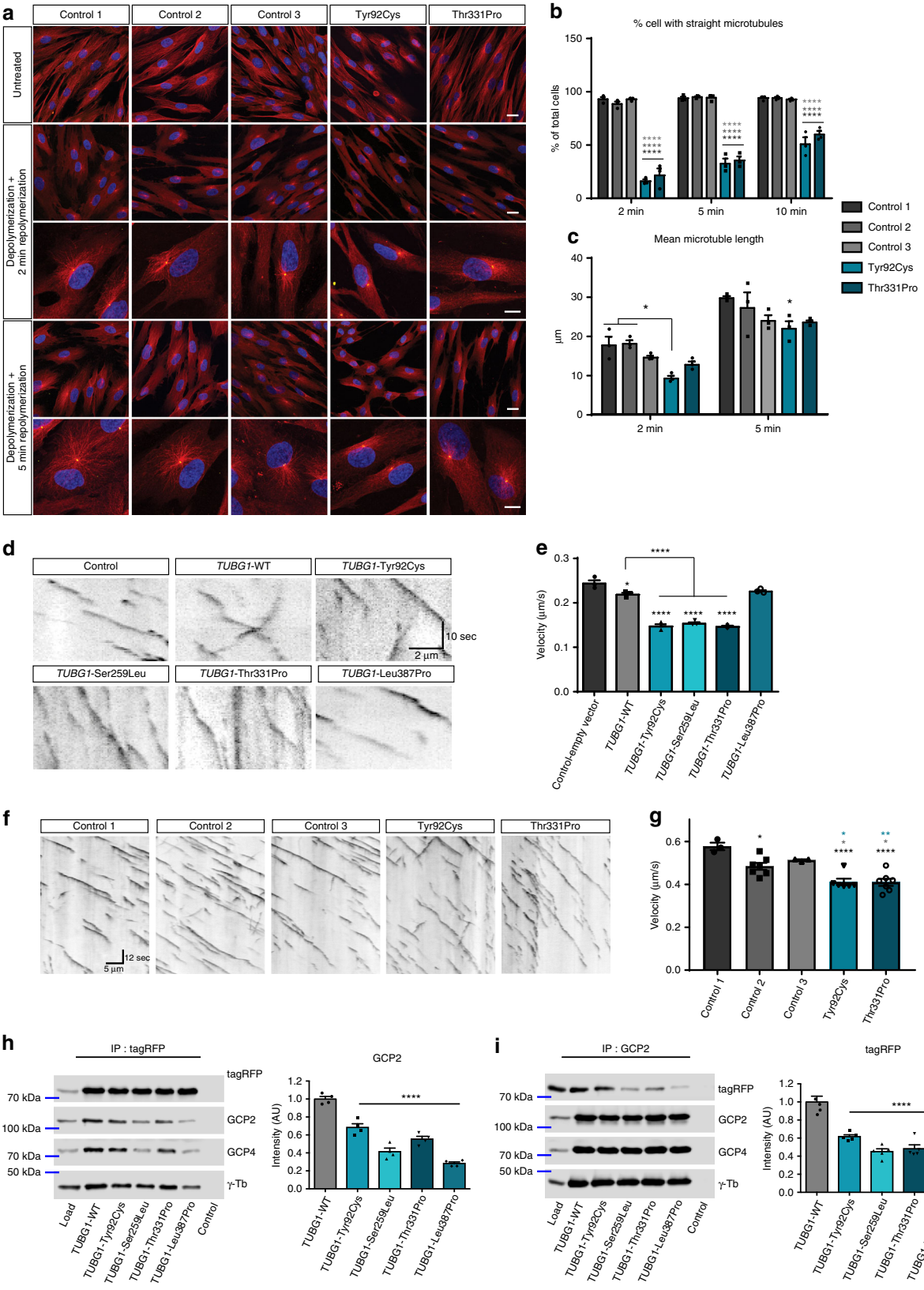
Since in utero electroporation results showed a major effect of disease-causing *TUBG1* variants on neuronal migration, we first investigated whether *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice display layering anomalies at embryonic stages. We analyzed thickness of the CP and different layers by immunohistochemistry on E18.5 brains (Fig. 5a). While we observed no difference in total CP thickness between the WT and *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice, a more detailed analysis revealed an increase in layer V thickness with a concomitant reduction of layer VI in *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice. Additionally, CTIP2 staining showed that *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice present with visibly abnormal organization of layer V, which is larger and with lower cell density, while it presents with a more compact organization in control mice. On the other hand, we also observed a small population of heterotopic SATB2^{+} cells at the interphase of the IZ and the CP of mutant embryos (Fig. 5b). Given this observation, we assessed neuronal migration by labelling a cohort of progenitors with EdU at E14.5 and examining their localization four days after in the SVZ/VZ, the IZ and in the six layers of the CP that we divided in five equal bins (Fig. 5c). We observed a higher percentage of EdU-positive cells in the IZ at the limit with layer VI with a corresponding depletion of cells in bins 3, 4, and 5 of the CP (Fig. 5d). Arrested cells appeared as a visible band in section images and were positive for SATB2 (Fig. 5e), consistent with our previous observations.

We then analyzed cell proliferation in WT and mutant embryonic brains. We found no significant differences in progenitors' proliferation in any of the studied developmental stages (E12, E14, E16) (Supplementary Fig. 7a). Quantification of the pool of apical and intermediate progenitors as well as newborn neurons in the VZ/SVZ at E14 and E16 revealed no differences between the wild type and knock-in mice (Supplementary Fig. 7b, c).

Finally, we studied the dynamics of radial migration by time-lapse recordings in WT and *Tubg1*$^{Y92C/+}$ organotypic brain cultures. We observed that the pathogenic variant leads to a significant reduction in the percentage of migrating neurons exiting the IZ (Fig. 5f, g and Supplementary movies 16–17). Moreover, while there were no defects in the velocity of migration, neurons from *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice paused more often and for longer periods of time (Fig. 5h–j). We could not observe any defects in neuronal polarity transition before migration (Fig. 5k, l). Arrested neurons mainly exhibit the bipolar morphology required to initiate radial migration, with a significantly increased number of them containing the centrosome ahead of the nucleus (Fig. 5m). In line with our in utero electroporation data, together these results suggest that cortical layering defects related to TUBG1 mutations result from altered neuronal migration. Neurons bearing Tyr92Cys mutation adopt the correct morphology and centrosome localization, but appear unable to initiate locomotion.

***Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice exhibit neuroanatomical defects**. Using a recently developed robust approach for the assessment of 166 brain parameters across 22 distinct brain regions[27] (Supplementary Dataset 1), we analyzed neuroanatomy in 16-weeks-old male *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice by systematically quantifying the same sagittal brain region at Lateral + 0.60 mm. Overall size anomalies were identified in mutant mice with a reduction in size of all assessed parameters when compared to WT littermates (Fig. 6a). Total brain area was significantly reduced by 14.8%, concomitantly with smaller cortices (−14.1%, Fig. 6b). Importantly, area and thickness of the secondary motor cortex decreased by 10 and 9%, respectively (Fig. 6c). Additional assessment of the thickness of cortical layers revealed a significant decrease of 23% in the width of layer I and a decrease of 20% in layer VI. By contrast, thickness of layer V increased by 11% but did not reach the level of statistical significance ($P = 0.1$). Noteworthy, we were unable to delineate the boundary between layers II-III and V in two knock-in mice, possibly due to abnormal laminar disorganization. White matter structures were also decreased and included for example the fimbria of the hippocampus (−18%, $P = 0.0052$) and the anterior commissure (−26%, $P = 0.017$). The cerebellum was one of the most severely affected structures exhibiting a decreased size of 27% (Fig. 6b). Interestingly, our analysis additionally showed an abnormal organization of the hippocampal CA1 region with presence of heterotopic neurons in the stratum oriens region positioned above the pyramidal layer. Positive staining for the neuronal marker NeuN, suggested they are differentiated hippocampal pyramidal neurons (Fig. 6d). No defects in interneurons number nor distribution were found in *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice (Supplementary Fig. 8).

The time scale of *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mouse microcephaly was further investigated through a similar morphological screen at postnatal day 0 (P0). Relying on the adult brain screen, we performed morphometric analysis for 11 distinct brain regions (Supplementary Dataset 2). However, we were unable to detect a global microcephaly, and observed no visible heterotopia in the



hippocampus (Supplementary Fig. 9a). Further analysis showed that this hippocampal anomaly only becomes apparent at early post-natal stages but not before birth of pups (Supplementary Fig. 9b) consistent with the previously described slower, post-natal neuronal migration in the hippocampus[28].

***Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice show behavioral and epileptic anomalies.** Given the neuroanatomical abnormalities observed in the *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice, and the fact that cognitive function is impaired in subjects with MCDs, we tested whether this correlates with behavioral abnormalities by performing a battery of tests allowing

Fig. 4 *TUBG1* mutations alter microtubule dynamics and γ-tubulin complexes **a** Microtubules (red) and TUBG1 (yellow) staining in subject-derived fibroblasts, without treatment and after microtubule depolymerization and subsequent repolymerization. Scale bars 20 µm (upper panels) and 10 µm (lower panels). **b**, **c** Quantification of the percentage of cells presenting with straight and organized microtubules (**b**) and microtubule mean length (**c**), Two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test, $*p < 0.05$, **** < 0.0001, compared to controls. **d**, **e** Microtubule dynamics in HeLa cells transfected with EB3 and different *TUBG1* constructs. **d** Kymographs show EB3 trajectories in time (*y*, sec) and space (*x*, µm). Scale bar $Y = 10$ s, $X = 2$ µm. **e** Histograms represent mean velocity of EB3 comets, $n = 3$ independent experiments, one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test, $*p < 0.05$, $****p < 0.0001$ compared to control-empty vector or wild type overexpression. **f**, **g** Microtubule dynamics in subject-derived fibroblasts. **f** Representative Kymographs of dynamic EB3 comets in different controls and mutant fibroblasts. Kymographs are calibrated in time (*y*, sec) and space (*x*, µm). Scale bar $Y = 12$ s, $X = 10$ µm. **g** Quantification of EB3 mean velocity, $n \geq 3$ independent experiments, one-way ANOVA with Dennett's post hoc test, $*p < 0.05$ compared to control fibroblasts. **h**, **i**. Immunoprecipitations in Neuro2a cells expressing tagRFP-tagged mouse *Tubg1* (WT control) or its mutated variants. **h** Left: representative immunoblot after immunoprecipitation with anti-tagRFP antibody. Right: densitometric quantification of immunoblots stained against GCP2. Relative intensities of samples with mutated Tubg1-TagRFP normalized to WT control and to tagRFP levels in individual samples. **i** Left: representative immunoblot for immunoprecipitation with anti-GCP2 antibody. Right: densitometric quantification of immunoblots stained against RFP. Relative intensities of samples with mutated Tubg1-TagRFP normalized to WT control and to GCP2 levels in individual samples. Controls in left panels contained proteins A without antibodies incubated with the cell extracts, $n = 5$ independent experiments, one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test, $****p < 0.0001$. All data are presented as mean ± s.e.m. Source data are provided in the Source Data file

to evaluate locomotor activity, repetitive behaviors, learning and memory and epileptic susceptibility. We observed a hyperlocomotion for *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice compared to WT littermates, with an increase in both travelled distance and rearing, in the repetitive behaviours (Fig. 7a, b) and in the circadian activity paradigms (Supplementary Fig. 10a–h). This finding was supported by an increased distance travelled in the open field (OF) assay (Supplementary Fig. 10i–k). Additionally, we performed a novel object recognition (NOR) task, based on the innate exploratory behaviour of mice[29], to assess their long-term memory capacity. *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice presented significantly impaired NOR performance, spent more time sniffing the two familiar objects (FO) during the training session and their recognition index (RI) was around zero, consistent with lack of preference for the novel object (NO) (Fig. 7c, d). Next, to challenge hippocampus mediated cognitive behaviours, we tested mice in a fear conditioning (FC) assay, exploring their associative memory[30]. When tested for either contextual or cued fear, *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice displayed significantly reduced immobility time suggesting impaired fear expression (Fig. 7e). No phenotype was observed for digging and grooming behaviors (Supplementary Fig. 10l, m), nor when we assessed short-term memory of KI mice in the Y-maze paradigm (Supplementary Fig. 10n, o).

Finally, we assessed epileptic activity in *Tubg1*$^{Y92C/+}$ animals. Superficial cortical EEG recordings were visually inspected to detect epileptiform discharge events. Spontaneous cortical spike-waves were observed in all *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice but not in WT controls. No spontaneous seizure was recorded in both strains. We therefore challenged animals with the seizure-provoking agent PTZ to determine their susceptibility to seizure. PTZ, an inhibitor of the γ-aminobutyric acid type 1 (GABAA) receptor, is the most widely used model of acute chemical induced seizures[31]. We administrated intraperitoneally a pro-convulsive dose of 30 mg kg^{-1} and recorded EEG during 30 min after drug administration. One minute after injection, generalized tonico-clonic seizure was recorded in all analyzed *Tubg1*$^{Y92C/+}$ but not in WT mice (Fig. 7f).

Overall, our behavioral analysis highlight reduced neurodevelopmental performances illustrated by an increased locomotor and rearing activities with impaired object recognition and associative learning. These results suggest that *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice exhibit common features of mouse models of intellectual disability. In addition, *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice showed abnormal epileptic activity. Altogether these findings are in agreement with the observed cortical and hippocampal abnormal structures and propose that *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice represent a relevant model that partially mimics human phenotype of MCDs.

Discussion

Gamma-tubulin is a major component of the centrosome in mammalian cells[32,33]. In mammals, two genes code for γ-tubulin —*TUBG1* and *TUBG2*, both localizing at centrosomes and nucleation competent[19]. Identification of *TUBG1* pathogenic variants in subjects with cortical malformations[14,34] led us to study the underlying mechanisms by performing a combination of in utero and in vivo functional studies. All 7 MCD-related identified variants in *TUBG1* are heterozygous missense variants, occurring de novo, suggesting that they exert their pathogenicity through a dominant mechanism, rather than through a loss of function. Up to date no truncating variants have been identified in *TUBG1*. This is in contrast with the other described variants in centrosomal proteins in subjects with primary microcephaly which are majorly at a homozygous state[35]. Furthermore, homozygous *Tubg1* knock-out mice present defects in mitosis during early embryogenesis and die at the morula/blastocyst stages, while heterozygous *Tubg1*$^{+/-}$ mice develop normally and present with no histological defects[16]. In agreement with this, our studies of *Tubg1*$^{+/-}$ mice showed no major neuroanatomical nor behavioral abnormalities (Supplementary Figs 6f, g and 11). Finally, our data from in utero electroporation suggest that WT-TUBG1 is able to partially rescue the mutation-induced defect, suggesting a possible dominant-negative mechanism of the variants. Altogether, these observations suggest that haploinsufficiency is not associated with neurodevelopmental pathologies in mice and therefore a knock-out model is not representative of disease-causing missense variants in *TUBG1*.

We have developed a knock-in *Tubg1* mouse model with the aim to better mimic the human MCD phenotype. Our *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice present with altered cortical layering during embryonic stages in agreement with our in utero electroporation data showing an accumulation in the IZ of E14.5 born neurons expressing *TUBG1* pathogenic variants. At adult stage *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice present with a global microcephaly, abnormal cortical layering and defects in hippocampal organization. Correlating with these observations, *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice exhibit memory deficits in the NOR and the FC paradigms.

It is worth mentioning that several mouse models of MCDs related to abnormal neuronal migration present with anomalies in the hippocampal structure[36–38]. For example, heterozygous *Tubb2b* mice with a point variant, present with disorganized CA3 area, associated with cognitive defects and long-term potentiation deficits[39]. Similarly, the CA3 region of hemizygous *Dcx* mice showed heterotopic neurons in both the stratum radiatum and the stratum oriens with milder abnormalities in the CA2 and the CA1 regions[36]. Interestingly, neither of these mice are reported to

present major abnormalities in the neocortical architecture and lamination, even though these genes have been involved in neuronal migration in the neocortex using in utero electroporation[40,41]. Additionally, very few of MCD mouse models have been reported to have pathological epileptic seizures, although they do show cognitive deficits[42]. Our *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice exhibit increased susceptibility to PTZ-induced epileptic seizures originating in the neocortex and could therefore represent a relevant model to further investigate pathophysiological mechanisms underlying MCD-related epilepsy. It remains to be investigated whether they are due to an abnormal connectivity of the heterotopic pyramidal neurons. The ability of heterotopic

Fig. 5 *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice show abnormal cortical layering during development. **a** E18.5 cortices stained against SATB2 (gray), CTIP2 (magenta) and DAPI (blue). Vertical lines depict how cortical layers were considered for quantification, scale bar 50 µm. **b** Histograms represent the thickness of the cortical layers and CP (upper panel) and the cell density of layer V (lower panel). Data are from at least five embryos per condition, unpaired *t*-test, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$. Right image shows heterotopic SATB2^{+} cells. Scale bar 50 µm. **c** EdU staining in the cortex. Cortical plate was divided into five equal bins from the intermediate zone to the marginal zone. White arrows show EdU-positives cells accumulation in the IZ. CP, cortical plate; IZ, intermediate zone; VZ/SVZ, ventricular zone/subventricular zone. Scale bar 100 µm. **d** Quantification of EdU-positive cells in the specified regions, $n = 3$ embryos per group, Two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test, $*p < 0.05$, $***p < 0.001$. **e** Representative image of SATB2 staining in cortices of EdU injected *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice. Scale bar 50 µm. **f** Locomotory paths (colored lines) of electroporated neurons during time-lapse imaging. Scale bar 50 µm. **g** Percentage migrating neurons, $n = 3$ WT and $n = 4$ *Tubg1*$^{Y92C/+}$; **h** average migration velocity, **i** average number of pauses, and **j**. total time spent in pause, during the 10 h of recording, $n = 4$ independent experiments per group. Unpaired *t*-test, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ compared to wild type mice. **k** Percentage electroporated bipolar cells persisting bipolar or transitioning to multipolar morphology in 10 h recordings ($n = 3$ WT, $n = 4$ *Tubg1*$^{Y92C/+}$ independent experiments per group). **l** Percentage electroporated multipolar cells persisting multipolar or transitioning to bipolar morphology in 10 h recordings ($n = 3$ WT, $n = 4$ *Tubg1*$^{Y92C/+}$, independent experiments per group). **m** Percentage of arrested electroporated bipolar neurons with the centrosome ahead of nucleus, $n = 3$ WT, $n = 4$ *Tubg1*$^{Y92C/+}$ independent experiments per group. Unpaired *t*-test, $***p < 0.001$ compared to wild type mice. All data are presented as mean ± s.e.m. Source data are provided in the Source Data file

neurons to form one hand their classic afferent and efferent connections, and on the other, additional local connections has been discussed by Chevassus-au-Louis and Represa (1999)[43]. Authors point out that this could lead to dual connectivity patterns between regions that are not normally connected, inducing functional alterations such as epilepsy. Abnormal post-natal connectivity could additionally contribute to the global microcephaly, since this microcephaly appears postnatally in *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice. In line with this, for MCD patients with TUBG1 mutations, for whom HC size at birth was available, values appeared within the normal range (p.L387P, HC = 31 cm; p.Y92C, HC = 33 cm), but then progressed to severe reduction (p.L387P, HC = −5,5 SD; p.Y92C, HC = −4SD), suggesting a secondary microcephaly that mainly develops after birth. It would therefore be relevant to investigate whether the neuroanatomical abnormalities are due to additional defects in post-natal processes with the development of a conditional KI model allowing timed-regulated expression of *Tubg1*-Tyr92Cys. Overall, our *Tubg1*$^{Y92C/+}$ model presents with cortical and hippocampal malformations associated with a global microcephaly, behavioral alterations and epileptic susceptibility, all features that correlate with the phenotype of affected subjects making it an interesting model for gaining insight into the mechanisms of MCDs.

Gamma-tubulin is essential for the formation of mitotic spindle microtubules[44–48] but also for the coordination of mitotic events such as metaphase, anaphase and cytokinesis[49], so we expected to observe proliferation defects related to *TUBG1* pathogenic variants. The centrosome is known to be highly implicated in cell division where it plays a major role in organizing mitotic microtubules and variants in centrosomal components could be expected to affect primarily progenitor proliferation. Indeed, several mouse models with partial or complete loss of function of centrosomal proteins have been characterized with neurogenic defects and subsequent cell death leading to microcephaly, due to centrosome and mitotic spindle abnormalities[50,51]. Surprisingly, in our in utero electroporation experiments we saw that three of the *TUBG1* variants did not compromise proliferation of progenitor cells. Similarly, there were no disruptions in progenitor proliferation in *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice. These observations raise the question of whether the identified *TUBG1* mutations affect the overall structure or interactions within the centrosomal machinery. Interestingly, no structural defects were found in centrosomes and no subcellular mislocalization was observed for any of the four recombinant forms. Moreover, our videomicroscopy studies showed correct centrosome positioning in both migrating and non-migrating bipolar neurons, suggesting that the pathogenic phenotype is probably not related to the centrosomal function of TUBG1. Additionally, our EB3 studies showed reduced microtubule dynamics for three of the recombinant forms and a slight decrease that did not reach statistical significance for the Leu387Pro variant, probably due to a lack of sensitivity of the technique. Moreover, after complete depolymerization, newly nucleated microtubules were disorganized and shorter in human fibroblasts bearing the *TUBG1* variants. However, since no major abnormalities were observed in the overall organization of interphase microtubules without depolymerization, we hypothesize that microtubule nucleation properties of the centrosome are not affected and the observed deficiencies are rather due to altered microtubule dynamics. Immunoprecipitation assays showed that pathogenic forms co-precipitate with fewer γTuSC and γTuRC components, as well as with fewer γ-tubulin, suggesting a reduced capacity for mutant recombinant γ-tubulin to dimerize and to integrate these complexes. In addition to these observations, given the dominant mechanism of the variants, we hypothesize that mutant γ-tubulin affects the role of γ-TuCs and probably their interactions in regulating microtubule dynamics causing the pathogenic phenotype. Centrosome structure and γ-tubulin nucleating capacity do not seem to be affected by *TUBG1* variants, which could explain why mitotic processes and cell divisions are preserved. Our data suggests that disrupted neuronal migration could be related to additional non-centrosomal functions of γ-tubulin. In line with this hypothesis, centrosome-independent roles for γ-tubulin in the control of microtubule dynamics has been reported in *D. melanogaster*[52]. Authors show that γTuRCs localize along interphase microtubules and suggest they stabilize them by limiting catastrophe events at the plus tips. Similarly, in *S. pombe*, γ-tubulin has been suggested to cooperate with the kinesin-like protein *Pkl1p* to regulate the dynamics and organization of microtubules[53]. In HeLa cells, specific inhibition of γ-tubulin with gatastatin decreased the dynamics of interphase microtubules without affecting the overall microtubule network ant the number of growing microtubules[54]. In post-mitotic neurons, γTuRCs have been shown to participate in centrosome-independent microtubule nucleation mediated by Augmin complexes[55]. Finally, during cortical development, it was recently shown that acentrosomal microtubules nucleation controls neuronal morphology ensuring proper migration in vivo[56]. Altogether, this supports our results showing that pathogenic gamma-tubulin leads to reduced microtubule dynamics during interphase, and disrupts neuronal migration.

Methods

DNA constructs. Commercially available Human untagged *TUBG1* cDNA (NM_001070.3) cloned in pCMV6-XL5 vector (SC119462) was purchased from Origene. Variants (p.Tyr92Cys, p.Ser259Leu, p.Thr331Pro and p.Leu387Pro)

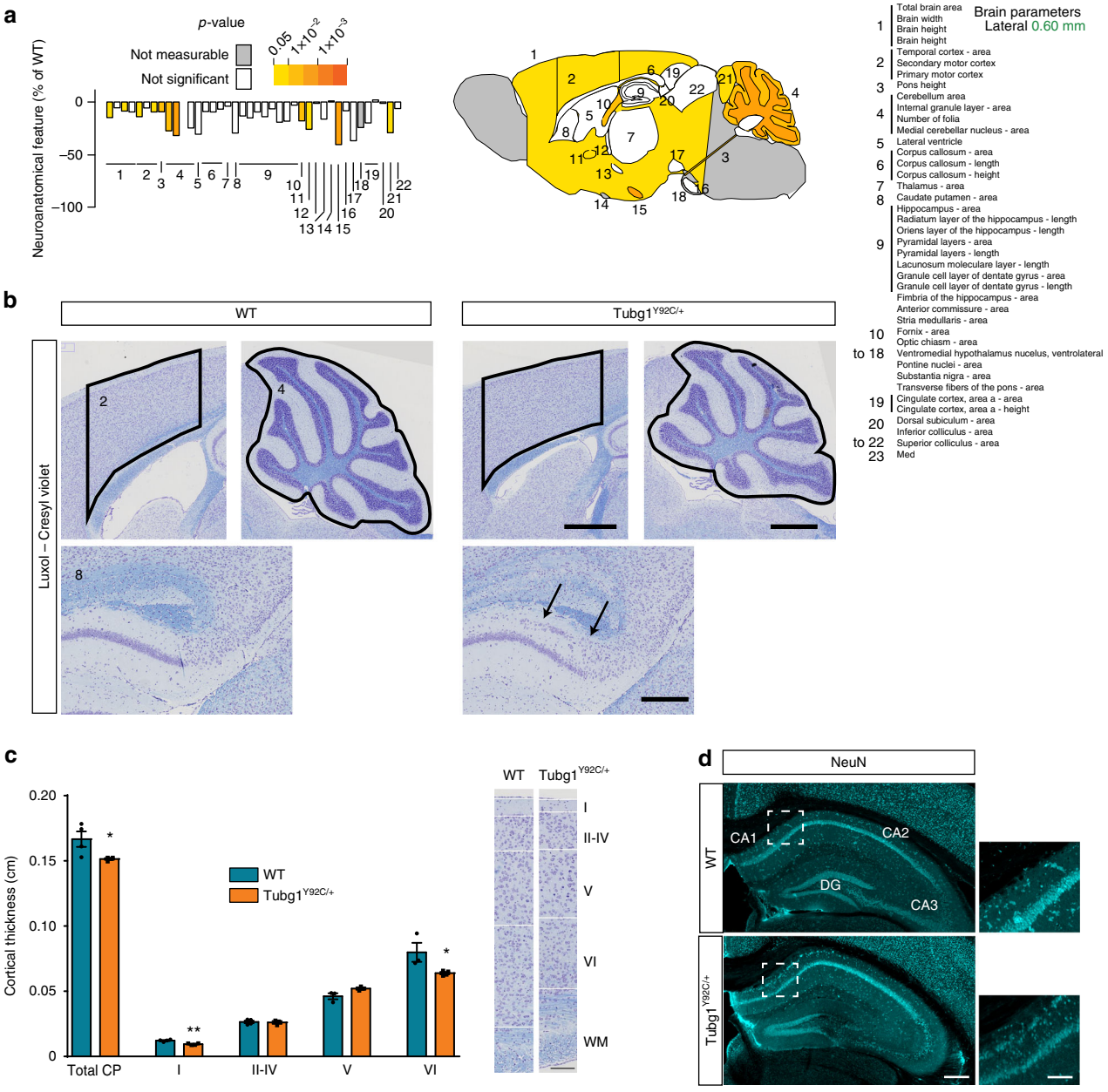
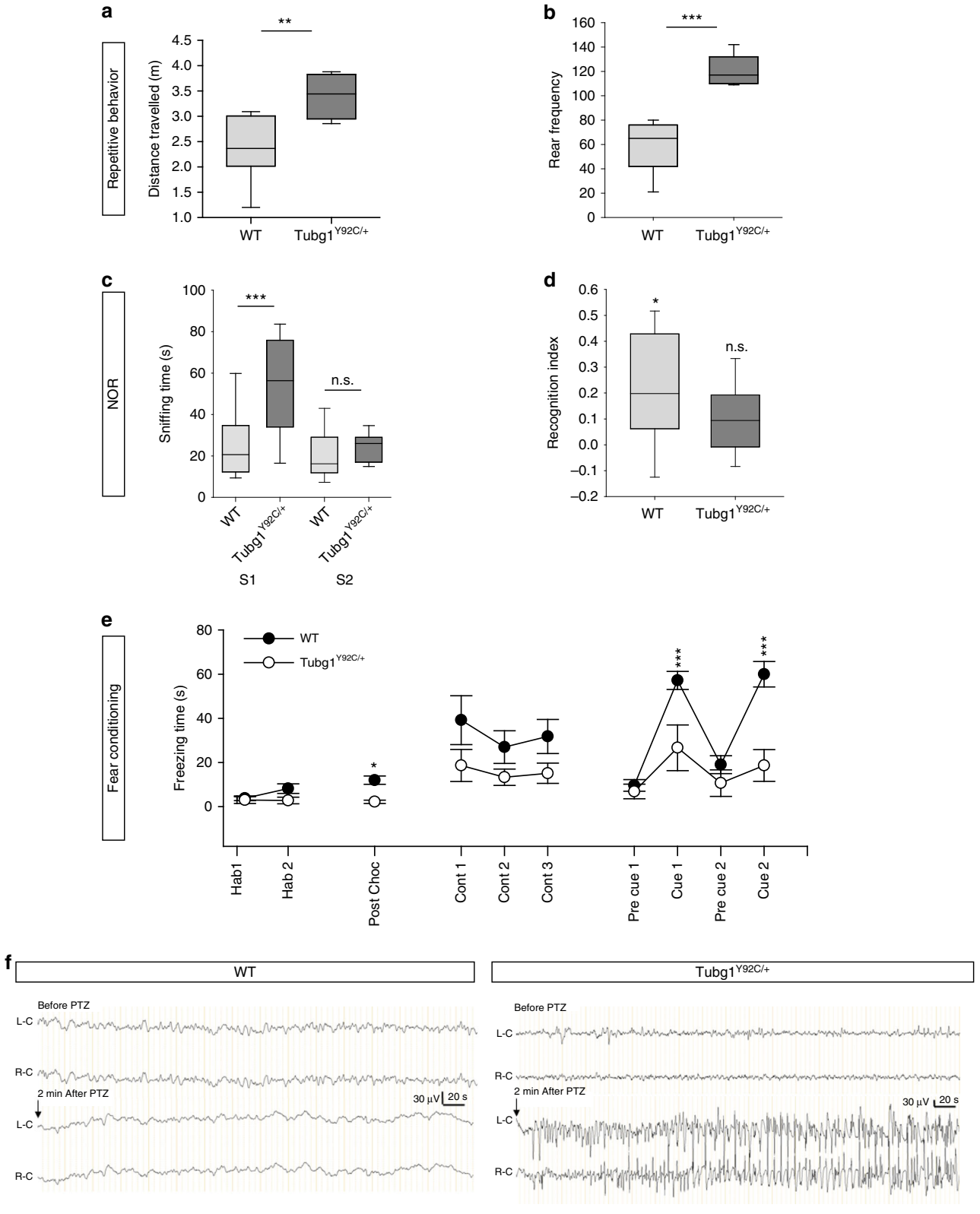


Fig. 6 Microcephaly and abnormal hippocampal organization in *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice. **a** Schematic representation of affected brain regions plotted in sagittal planes according to *p*-values. The right image represents a section at Lateral + 0.60 mm. White coloring indicates a *p*-value higher than 0.05 and gray shows not enough data to calculate a *p*-value. Histograms are showing the percentage decrease (minus scale) in size of measured brain regions as compared to the controls (100%). Numbers indicate assessed brain regions listed on the right; $n = 4$ 16-weeks-old male mice per group. **b** Sagittal sections of the hippocampus, the cortex and the cerebellum from control WT and *Tubg1*$^{Y92C/+}$ adult mice stained with cresyl violet/luxol blue. Black arrows indicate the hippocampal heterotopia. Scale bar 0.1 cm (upper panels), 200 µm (lower panel). **c** Cortical layers analysis (left panel) performed in sections of the secondary motor cortex in control WT and Tubg1$^{Y92C/+}$ adult mice stained with cresy violet/luxol blue, $n = 4$ mice per group, unpaired *t*-test, $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$. Data are presented as mean ± s.e.m. Source data are provided in the Source Data file. Representative images showing layers defects (right panel). Scale bar 150 µm. **d** Coronal sections of the hippocampus from control WT and *Tubg1*$^{Y92C/+}$ adult mice stained with NeuN, scale bar 300 µm. Higher magnification view of the region delimited with dotted square is shown on the right of each image, scale bar 100 µm

were introduced by site-directed mutagenesis using QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). WT and mutated cDNAs encoding human *TUBG1* were then inserted in the multiple cloning site of psiSTRIKE vector under the control of a CAG promoter. The DCX promoter from a DCX-IRES-GFP vector, kindly provided by U. Mueller (The Scripps Research Institute, CA, USA), was cut with SpeI and EcoRI and inserted into the psiSTRIKE vector, replacing the CAG promoter, resulting in a construct encoding the WT and mutated human *TUBG1* under a DCX promoter. Vector pmTubg1-TagRFP encoding mouse γ-tubulin 1 fused to Tag-RFP was prepared as described. Shortly, coding sequences of mouse Tubg1 were cut out from pmTubg1-FLAG vector by *Eco*RI/*Sal*I restriction enzymes and ligated into pCI-TagRFP[19] resulting in vector encoding TagRFP-tagged mouse γ-tubulin 1 (pmTubg1-TagRFP). Construct was verified by sequencing. Lentiviral vector pmTubg1-TagRF with puromycin resistance, encoding mouse γ-tubulin 1 fused to TagRFP was prepared as described[57]. Shortly, cassette encoding mouse γ-tubulin fused to TagRFP was digested out from pmTubg1-TagRFP construct[19] (see above) by *Eco*RI/*Not*I and ligated to pCDH-CMV-MCS-EF1-puro vector (System Biosciences) resulting in the lentiviral construct pmTubg1-TagRFP-puro. BLBP-GFP plasmid was kindly provided by N. Heintz (The Rockefeller University, NY, USA). The following plasmids were used as reporters for IUE experiments: a pCAGGS-IRES-Tomato (RFP) vector; a pCIG2-IRES-GFP vector, kindly provided by R.Belvindrah (INSERM, Paris, France); a NeuroD-GFP vector, kindly



provided by J. Godin (IGBMC, Strasbourg, France), a pSilencer-CAG-Venus-2 and a pCAG-mScarlet vectors, kindly provided by Julien Courchet (Institut NeuroMyoGene, Lyon). pCAG-PAKT-mKO bearing the pericentrin-AKAp450 centrosomal targeting (PACT) domain fused to Kusabira Orange was kindly provided by J. Godin (IGBMC, Strasbourg, France). All plasmid DNAs were prepared using the EndoFree plasmid purification kit (Macherey Nagel). Silencing experiments were performed using a sh-RNA sequence targeting mouse *Tubg1* mRNA (5′-TGAACCTGATAGCCACAGACCGCCTACAC-3′) that was cloned in the psiStrike vector under the control of a U6 promoter.

Antibodies. The following antibodies were used in this study: γ-tubulin (aa 38–53) GTU-88 (T6557, mouse, used at 1/10000 for WB and 1/1000 for IF/IHC, Sigma); Gamma-tubulin (434–451) TU-30 (ab27074, mouse, used at 1/1000, Abcam); GAPDH (MAB374, mouse, used at 1/1000, Chemicon); Cux1 (sc-13024, rabbit, used at 1/100, Santa Cruz); Cux1 (11733-AP, used at 1/100, Proteintech); GFP (A10262, chicken, used at 1/1000, ThermoFisher); CTIP2 (ab18465, rat, used at 1/500, Abcam); NeuN (MAB377, mouse, used at 1/500, Millipore); SATB2 (ab51502, mouse, used at 1/400, Abcam); TBR1 (ab31940, rabbit, used at 1/500, Abcam); Pax6 (PRB-278P, rabbit, used at 1/100, Eurogentec); Tbr2 (14–4875–80,

Fig. 7 *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice present with behavioral abnormalities **a**, **b** Repetitive behaviours. Distance travelled (**a**) and occurrences of rearing (**b**) numbered during 10 min of observation in a novel home-cage environment showing a significant increase for Tubg1$^{Y92C/+}$ mice. **c**, **d** Novel object recognition (NOR) task. Mice were allowed to explore an identical pair of objects, and after 24 h, they were presented with the familiar object and a new object. The sniffing time in seconds during the 14 min of the presentation and test session are represented in box plots. (TIT 24 h, nose close to the object <1 cm, L) (**c**). The recognition index (RI) (**d**) was calculated as the percentage of time sniffing time novel object (NO) minus the time sniffing the familiar object (FO) divided by the total time of sniffing. In box plots center line represents the median, end of boxes 25th and 75th percentile and whiskers 10th and 90th percentiles. **e** Fear conditioning test. Graphs plot the freezing during the different sessions of the test. The 4 min of habituation (Hab1 and 2) and the 2 min post choc. The 6-min context session (Cont 1, 2, and 3) was run 24-h after conditioning. The 8-min cue session was performed 5-hours after the context session. A sequence of 2-min with no cue (pre cue1 and 2) and 2 min with light/auditory (cue 1 and 2) conditioning stimulus were repeated twice. Data are presented as mean ± s.e.m., $n = 9$ mice per genotype. One-way ANOVA (**a**, **b**, and **d**) or Two-way ANOVA (**c**, **e**, and **f**) $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$. Source data are provided in the Source Data file. f. Representative EEG trace. Left panel: EEG recording before and after PTZ in WT mice without discharge activity. Right panel: *Tubg1*$^{Y92C/+}$ mice epileptiform discharge events before PTZ and generalized tonicoclonic seizure after PTZ. L-C: left cortex; R-C: right cortex. $n = 3$ adult mice from each genotype

rat, used at 1/200, eBioscience); PH3 (06–570, rabbit, used at 1/500, Millipore); Ki67 (NCL-L-Ki67-MM1, mouse, used at 1/500, Leica); Anti-tRFP (AB234, rabbit used at 1/5000 for WB, Evrogen); GCP4 (sc-271876, mouse, used at 1/1000 for WB, Santa Cruz); Anti-mouse antibody conjugated with HRP (W402B, goat, used at1/10000 for WB, Promega); Anti-rabbit antibody conjugated with HRP (W401B, goat, used at 1/100000 for WB, Promega). Anti-GCP2 antibody GCP2-01 (mouse monoclonal IgG2b) used for immunoprecipitation was described previously[58]; Anti-GCP2 antibody GCP2-02 (mouse monoclonal IgG1, in the form of hybridoma spent culture supernatant, used at 1/10 for WB) was described previously[58].

Cell culture. Mouse Neuroblastoma N2a and HeLa cells provided by the cell culture platform of the IGBMC (Strasbourg) are mycoplasma free (PCR test Venorgem) and have not been authenticated. N2a cells and subject's human fibroblasts cells were cultured in DMEM (Gibco) supplemented with 1 g L^{-1} of glucose, 5% foetal calf serum and gentamycine (DMEM-1 g L^{-1} glucose-5% FCS-gentamycine). Transfection was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and cells were then cultured for 48 h. N2a cells were used for differentiation assays 24 h after transfection by replacing the medium with DMED without serum and supplemented with 1 µM Retinoic acid. After 48 h cells were fixed in 4% PFA. For lentivirus production, HEK 293FT packaging cells (Invitrogen) were grown at 37 °C in 5% CO2 in DMEM supplemented with 10% FCS and antibiotics. The cells used for lentivirus production were at passage 4–15. For depolymerization assays, human fibroblasts were incubated with 5 µM nocodazole in DMEM for 1 h, at 4 °C. Medium was then replaced with preheated DMEM-1 g L^{-1} glucose-5% FCS-gentamycine. Cells were then fixed at different time points: 0, 5, and 5 min.

Lentiviral infection. Lentiviral infections were done as described previously[59]. Briefly, aliquots of 1.4 ml Opti-MEM medium (Invitrogen) were mixed with 21 µl of ViraPower Lentiviral Packaging Mix (Invitrogen), 14 µg lentiviral construct and 82 µl of Lipofectamine 2000. The mixture was incubated for 20 min at room temperature before it was added to semi-confluent HEK-293FT packaging cells in 150 cm^2 tissue- culture flask. After 3 days, viruses in culture supernatants were concentrated by centrifugation at 25,000 rpm for 2 h using JA-25.50 rotor (Beckman Coulter, Palo Alto, CA). The pellet was resuspended in 1 ml of culture medium and 0.2 ml aliquot was added to 7 ml of medium in 25 cm^2 tisue-culture flask with cells. The transfection mixture was replaced after 3 days with fresh complete medium containing 5 µg ml^{-1} puromycin. Stable selection was achieved by culturing cells for 1–2 weeks in the presence of puromycin.

Immunoprecipitation. To prepare extracts for immunoprecipitation, cells were rinsed twice in cold HEPES buffer (50 mM HEPES [pH 7.6], 75 mM NaCl, 1 mM MgCl2, and 1 mM EGTA) and extracted for 10 min at 4 °C with HEPES buffer supplemented with 1% Nonidet P-40 (extraction buffer), protease inhibitor mixture (Complete EDTA-free, Roche) and phosphatase inhibitors (1 mM Na_3VO_4, 1 mM NaF). The suspension was spun down (20000 × *g*, 15 min, and 4 °C) and supernatant was collected. Protein quantification in samples was assessed with a bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Thermo Scientific). Samples were diluted with TBST to the final protein concentration 0.6 mg ml^{-1}. Immunoprecipitations were performed as described elsewhere[60]. Extracts were incubated with Protein A beads (GE-Health Care) saturated with (i) rabbit antibody to TagRFP; (ii) monoclonal antibody GCP2–01 to GCP2; or (iii) immobilized protein A alone. 7.5% SDS-PAGE and immunoblotting were performed as described previously[61]. Bound primary antibodies were detected after incubation of the blots with HRP-conjugated secondary antibodies. HRP signal was detected with chemiluminescent reagents (Thermo Scientific) and the LAS 3000 imaging system (Fujifilm). AIDA image analyzer (ver.4) software (Raytest) was used for quantification of signals from immunoblots.

Western blot. Cells were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.7, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA and 1% Triton X-100) supplemented with proteases inhibitors (Roche). Mouse cortices were lysed in RIPA buffer supplemented with proteases inhibitors (Roche) using a syringe with an 18 G needle. Protein concentrations were determined with a Bradford assay. Equal amounts of lysates were then loaded on polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked in 5% milk solution or 2% BSA in TBS-0.1% Tween and then incubated with the primary antibodies overnight at 4 °C. HRP (horseradish)-conjugated secondary antibodies (Thermo Fischer) were used at 1:10000. Uncropped and unprocessed scans of blots can be found in Supplementary Fig. 12.

Electron microscopy. Samples were immersed in glutaraldehyde (2.5%) and paraformaldehyde (2.5%) in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4) and post-fixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated through graded alcohol (50, 70, 90, and 100%) and propylene oxide for 30 min each, and embedded in Epon 812. Semithin sections were cut at 2 µm on an ultra microtome (Leica Ultracut UCT) and ultrathin sections were cut at 70 nm and contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined at 70 kv with a Morgagni 268D electron microscope (Phillips, FEI Electron Optics, Eindhoven, the Netherlands). Images were captured digitally by Mega View III camera (Soft Imaging System).

EB3 tracking analyses. Patient's fibroblasts and HeLa cells were cultured in fluorodish™ FD35-100 (World Precision Instruments) and transfected with EB3-GFP plasmid using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) following manufacturer instructions. Live video-microscopy recording was performed using a Confocal Spinning disk—NikonTi—Roper iLas FRAP system equipped with a PLAN APO VC 60x objective (Nikon Instrument, Inc., Melville, USA) and driven by Metamorph 7.0 (Molecular Devices, LLC). Samples were maintained at 37 °C and 5% CO2 during acquisition. Images were collected with Photometrics Prime 95B™ Scientific CMOS Camera (PHOTOMETRICS) every 200 ms during 2 min. Movie assembly and time projections were done using ImageJ software (http://rsb.info.nih.gov/ij/, NIH). For generation and analyses of kymographs Image J plug-in kymotoolbox (Available on demand on http://www.bic.u-bordeaux.fr) was used. Kymographs were calibrated in time (*y* in sec) and space (*x* in µm) and analyses were performed manually by following EB3 comet trajectories. Mean speed was extracted by the plug-in.

qPCR. Total RNA was prepared in three independent isolations from the cortices of mouse embryos at different time points of development with TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific), and cDNA samples were synthetized with SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Quantitative PCR was performed in a LightCycler PCR instrument (Roche) using SYBR Green Master Mix (Roche). Reaction conditions were carried out for 50 cycles (10 min Initial denaturation 95 °C, 10 s at 95 °C, 15 s at 60 °C and 20 s at 72 °C), each qRT-PCR reaction was performed in triplicate and relative mRNA expression was normalized to GAPDH for Tubg1 and Tubg2 comparisons and to Actin for mouse models.

The following gene-specific primers were used for mouse γ-tubulin 1: Forward: 5′CCCAGGGAGAAAAAATCCACGAGGA3′; Reverse: 5′GAGCCCAAGCCAGAGCCTGTCC 3′; for mouse γ-tubulin 2: Forward: 5′GACCGAGAAGCAGATGGAG3′; Reverse: 5′CGTTCAGTCGCTCTAAGAGG3′.

For mouse model validation, the following primers were used between exons 1 and 4 for KI mice: Forward 5′GAGGAGCGATGCCGAGAGAA3′, Reverse 5′CATCTGCCTCCCGATCTATG3′ and between exons 10 and 11 for KO mice: Forward: 5′TCTCCTCGCTCTTCGAACGGA3′ and Reverse: 5′TCAATCAGCTGCTGCACAAT3′. The presence of the mutation in KI mice was verified by PCR on cDNA samples using Taq DNA Polymerase (Roche) using the same primers as those used for qPCR. PCR products were sent to GATC biotech for Sanger sequencing.

Immunohistochemistry and immunofluorescence. Free floating sections were blocked in 2% donkey serum in PBS-0.3% Triton-X and then incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies. Alexa-coupled secondary antibodies (Thermo Fischer) were used at 1/500. Nuclei were stained with a Hoechst solution (H3570, Life Technologies) for 20 min, used at 1/2000.

Neuro2a cells grown on glass coverslips were fixed in 4% PFA, blocked in 5% donkey serum in PBS-0.3% Triton-X and then incubated for 1 h with the primary antibodies. Alexa-coupled secondary antibodies (Thermo Fischer) were used at 1/500.

Human fibroblasts grown on glass coverslips were fixed in 3% PFA-PHEM buffer (60 mM Pipes, 25 mM Hepes, 5 mM EGTA, 1 mM MgCl, pH 7), post-permeabilized in 0.5% Triton X in PHEM for 4 min at 37 °C and post-fixed in ice cold methanol for 2 min on ice. Fibroblasts were then blocked in 5% donkey serum in PHEM-0.3% Triton-X and then incubated for 1 h with the primary antibodies. Alexa-coupled secondary antibodies (Thermo Fischer) were used at 1/500.

Images were acquired using a confocal microscope TCS SP8 X (Leica microsystems).

In utero electroporation. In utero electroporation was performed using timed pregnant Swiss mice (Janvier)[62]. Animal experimentations were performed at the IGBMC animal facilities. The study was conducted according to national and international guidelines (authorization numbers 2017062811273521 and 2017022316297963, French MESR) and the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on mouse experimentation (Comité d'éthique pour l'expérimentation animale (Strasbourg, France)). At E14.5 the pregnant mice were anaesthetized with isolflurane (2 l min^{-1} of oxygen, 3% isoflurane during induction and 2.5% during surgery). The uterine horns were exposed, and a lateral ventricle of each embryo was injected using pulled glass capillaries (Harvard Apparatus) with Fast Green (2 µg ml^{-1}; Sigma) combined with the DNA constructs prepared with EndoFree plasmid purification kit (Macherey Nagel) and a reporter vector at 1 µg $µ^{-1}$ l each. Plasmids were further electroporated into the neuronal progenitors adjacent to the ventricle by delivering five electric pulses at 50 V for 50 ms at 950 ms intervals using a CUY21EDIT electroporator (Sonidel). After electroporation, embryos were placed back in the abdominal cavity and development was allowed to continue until E16, E18, P3 ot P8. Embryo or pup brains were dissected and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS (Prosphate buffered saline) overnight and then sectioned at 80 µm slices using a VT1000S vibratome (Leica biosystems).

Time-lapse videomicroscopy. For time-lapse videomicroscopy, E16.5, embryo brains electroporated 2 days earlier, were dissected, embedded in 3% low-melt agarose (BioRad) diluted in HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, ThermoFisher Scientific) and sliced (300 µm) with a vibratome (Leica VT1000S, Leica Microsystems)[63]. Brain slices were cultured 16–24 h in semi-dry conditions (Millicell inserts, Merck Millipore), in a humidified incubator at 37 C in a 5% CO2 atmosphere in wells containing Neurobasal medium supplemented with 2% B27, 1% N2, and 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Life Technologies). Slice cultures were placed in a humidified and thermoregulated chamber maintained at 37 °C on the stage of an inverted confocal microscope. Time-lapse imaging was performed with a Leica SP8 X scanning confocal microscope equipped with a 25X objective. Forty to fifty successive 'z' optical planes were acquired every 0.5 µm and every 30 min during 10 h. Sequences were analyzed using Image J and the 'Manual Tracking' Plugin.

EdU labelling. E14.5 electroporated pregnant mice were intraperitoneally injected 24 h later with EdU (5-ethynyl-2′-deoxyuridine solution, Invitrogen) diluted in sterile normal saline at the dose of 40 mg EdU kg^{-1} of body weight. Brains from embryos were dissected and fixed at E16.5. EdU staining was performed using Click-iT EdU Alexa Fluor 647 Imaging Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Mouse model and genotyping. Heterozygous *Tubg1* knock-out and knock-in mice expressing the Tyr92Cys (*Tubg1*$^{Y92C/+}$) variant were generated in the Institut Clinique de la Souris (Celphedia, Phenomin, ICS, Illkirch). The targeting vector (shown in Supplementary Fig. 6) was constructed as follows. An 843 bps fragment encompassing part of Tubg1 exons 2 and 3 was amplified by PCR (from RP23-440M18 BAC containing Tubg1) in two steps to allow the introduction of the A > G point mutation in exon 3 and subcloned in an ICS proprietary vector. This mutation changes the TAC codon in a TCC codon leading in a tyrosine to cysteine mutation at position 92 (Y92C). The ICS vector has a flipped Neomycin resistance cassette as well a 2 LoxP sites, one is located 5′ of the 843 bps fragment and NeoR cassette and one 3′ of the flipped NeoR cassette. Two fragments corresponding to the 5′ (3.5 kb) and 3′ (3.5 kb) homology arms were amplified by PCR and subsequently subcloned in step1 plasmid to generate the final targeting construct. The linearized construct was electroporated in C57BL/6N mouse embryonic stem (ES) cells (ICS proprietary line). After G418 selection, targeted clones were identified by long-range PCR and further confirmed by Southern blot with an internal (Neo) probe and a 3′ external probe. Two positive ES clones were validated by karyotype spreading and microinjected into BALB/C blastocysts. Resulting male chimeras were bred with Flp deleter females showing maternal contribution[64]. Germline transmission with the direct excision of the selection cassette was achieved in the first litter. The initial allele comprising the floxed and mutated fragment represents the KI allele. The KO allele can be obtained subsequently by breeding the initial allele with a Cre deleter line. Genotyping was performed by standard short-range PCR, using the following primers: Lf, CCTCGCAATAAGGTCATAGCTTCGG; Mf, GTGATCCATTCCATCCTAAACTCCTC; Ef, GGAACGCTAAGGACGCA GTCTAG; Mqf, GAAGAACGAGATCAGCAGCCTCTGTTCC; Lxr, CATACAT TATACGAAGTTATCTGCAG; Lr, GGTAGGTTCCAAATAGCCAGTGGG; Mr, CTGTGCCCACCCACAGAGTTGAG; Mqr, TGCTAAAGCGCATGCTCCAGA CTGC and Er, GCCTTCCTTCTCCATTGCGCATTG. The position of the different primers used are represented in Supplementary Fig. 6a. To determine the genotype, the presence and size of PCR fragments were analyzed to detect: the presence of exon 3 (Mf/Mr); the presence of distal LoxP (Lf/Lr), excision of the selection marker (Ef/Er), 5′ part of the selection marker (Ef/Mqr); 3′ part of the selection marker (Mqf/Er); LoxP specific PCR (Lf/Lxr) and the excision of the floxed exon (Lf/Er) The presence of the point mutation was confirmed by Sanger sequencing on the first F1 animals.

Mice were handled according to national and international guidelines (authorization number 2017022316297963, French MESR) and the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on mouse experimentation (Comité d'éthique pour l'expérimentation animale (Strasbourg, France)).

Neuroanatomical studies. Adult neuroanatomical studies were carried out using eight male mice ($n = 4$ per group) for *Tubg1* knock-in mice and 12 mice ($n = 3$ per group, male and female) for *Tubg1* knock-out mice. All mice were precisely 16-weeks-old. Mice were euthanized in a CO2 chamber and brains were dissected and fixed in 4% buffered formalin for 48 h, then transferred to 70% ethanol. Samples were embedded in paraffin using an automated embedding machine (Sakura Tissue-Tek VIP) and cut at a thickness of 5 µm with a sliding microtome (HM 450; Microm) in order to obtain sagittal brain region at Lateral +0.60 mm. The sections were then stained with 0.1% Luxol Fast Blue (Solvent Blue 38; Sigma-Aldrich) and 0.1% Cresyl violet acetate (Sigma-Aldrich) and scanned using NanoZoomer 2.0HT, C9600 series at 20x resolution. 166 brain parameters, made of area and length measurements as well as cell level features, were taken blind to the genotype across one precise sagittal section at Lateral +0.60 mm for *Tubg1* knock-in mice. For *Tubg1* knock-out mice, we measured 67 parameters across two coronal planes at Bregma +0.98 and Bregma −1.34 mm. Cortical layers were visually assessed based on neuronal differences in cytoarchitecture. Data were analyzed using a two-tailed Student *t*-test of equal variance to determine whether a brain region is associated with neuroanatomical defect or not. Similarly, neuroanatomical studies were carried out at postnatal day 0 ($n = 5$ WT and $n = 4$ Tubg1$^{Y92C/+}$ mice). Brain sections were cut exactly in the plane of the closest image to the section defined as critical section at Lateral +0.60 mm of the right hemisphere. Forty brain parameters, made of area and length measurements, were taken blind to the genotype.

Behavioral experiments. All mouse experimental procedures were performed in agreement with the EC directive 2010/63/UE86/609/CEE for the care and use of laboratory animals and every effort was made to minimize the number of animals used. The local animal care, use and ethic committee of the Institute of Genetics and of Molecular and Cellular Biology (IGBMC) approved the protocol under accreditation number 2017022316297963. One cohort of wild-type and mutant male mice were used for behavioural experiments (nine wt and nine *Tubg1*$^{+/-}$ in total, from 2.5 months ±1 week of age for the phenotyping). For all behavioural experiments, mice were kept in SPF conditions with free access to food and water. The light cycle was controlled as 12 h light and 12 h dark (lights on at 7:00 AM) and the tests were conducted between 9:00 AM and 4:00 PM. To produce experimental groups, only animals coming from litters containing a minimum of two male pups were selected. After weaning, male mice were gathered by litters in the same cage. Animals were transferred to the experimental room 30 min before each experimental test. Behavioural experimenters were blinded as to the genetic status of the animals. Tests were administrated in the following order, circadian activity, Y maze, OF, NOR, repetitive behaviours and FC with a maximum of one week in between two tests.

For the OF, the apparatus consisted of a white circular arena (52 cm diameter, 32 cm height) placed in a dimly lit testing room (30–40 lux). The mice were placed for 15 min in this arena for two successive sessions with 24 h of interval. During the sessions, mice were monitored using a video tracking system (Ethovision, Wageningen, The Netherlands), total distance travelled and time spent in the different zone of the arena (center, intermediate and peripheral) was recorded.

For circadian activity, spontaneous locomotor activity and rears were measured using individual boxes equipped with infra-red captors. Mice were tested for 45 h in order to measure habituation to the apparatus (two dark phase) as well as nocturnal and diurnal activities, represented by locomotor and rear activity. Results are expressed per 1 h periods.

For studying repetitive behaviour, mice were put individually into dimly lit (60 Lux) clean home-cages without pellets or water bottle. The occurrence of repetitive behaviours (rearing, jumping, digging, grooming) was observed for 10 min and scored using an ethological keyboard (Viewpoint, Labwatcher, France). This test was done only a cohort of nine WT and nine KI animals.

The NOR task was done 24 h after OF the session performed in the same apparatus. On Day 1, mice were placed in the test apparatus containing two identical objects and were free to explore them for 14 min (defined as a training session). The time spent exploring each object was manually scored and nose to the object at a distance <1.5 cm. After this acquisition phase, mice were returned to their home cage. After a waiting period of 24 h, mice were placed once again in the test apparatus with one FO (from the acquisition phase) and one NO. Mice were again free to explore the two objects for a 14 min period (defined as a test session) and time spent exploring each object was manually scored. Between trials and subjects, the different objects were cleaned with 70° ethanol in order to reduce olfactory cues. To avoid a preference for one of the two objects, the new one was different for the different animal groups and counterbalanced between genotype. It was also the case for the emplacement of the NO compared to the familiar one (left or right). For the retention phase, a RI was calculated as the percentage of time sniffing time NO minus the time sniffing the FO divided by the total time of sniffing, to assess memory performance. For this test, four WT mice were excluded because they did not come into contact with objects (sniffing time lower than 3 s).

FC (Contextual and Cued FC) experiments were conducted in four operant chambers (28 × 21 × 22 cm) with a metal bar floor linked to a shocker (Coulbourn Instruments, Allentown US). Chambers were dimly lit with a permanent house-light and equipped with a speaker for tone delivery and an infra-red activity monitor. The activity/inactivity behaviour was monitored continuously during the different session and data were expressed in duration of inactivity per 2 s. The experimental procedure consists of three sessions over 2 days. On day 1, for the conditioning session, the mouse was allowed to acclimate for 4 min, then a light/tone (10 kHz, 80-dB) conditioned stimulus (CS) was presented for 20 s and terminated by a mild foot shock unconditional stimulus (US) (1 s, 0.4 mA). After the foot shock, animals were left in the chamber for another 2 min. Total freezing time during the first 2 min and 4 min and 2 min immediately after foot shock was defined, respectively, as PRE1, PRE2 and POST. On Day 2, the context testing was performed by putting back the mice into the same chamber and allowing them to explore for 6 min without presentation of the light/auditory CS. The movement of the animal were monitored to detect freezing behaviour consequent to recognition of the chamber as the spatial context (contextual learning). The total freezing time was calculated by 2 min block as CONT2, CONT4 and CONT6. Finally, the cue testing was performed 5 h after the context testing. Animals were tested in modified conditioning chambers with walls and floor of a different colour and texture. The mouse was allowed to habituate for 2 min then presented to light/auditory cues for 2 minutes to evaluated conditioning fear. The total freezing time was calculated by 2 min block as PRECUE1, CUE1, PRECUE2, and CUE2.

The Y maze was made of three enclosed plastic arms, each 40 × 9 × 16 cm, set at an angle of 120° to each other, in the shape of a Y. The wall of the arm has different pattern to encourage spontaneous alternation behaviour (SAB). Animals were placed at the end of one arm (this initial arm was alternated within the group of mice to prevent bias of arm placement), facing away from the centre, and allowed to freely explore the apparatus for 6 min under moderate lighting conditions (70 lux in the centre-most region). The time sequences of entries in the three arms were recorded (arm entry was counted when mouse had all four paws inside the arm). Alternation was determined from successive entries of the three arms on overlapping triplet sets in which three different arms are entered. The number of alternations was then divided by the number of alternation opportunities namely, total arm entries minus one. In addition, total entries were scored as an index of locomotor activity.

Data were assessed for normality by Shapiro–Wilk test and for equality of variance by Brown–Forsythe test. If normality and equality of variance is assumed, we performed a one-way ANOVA analysis. In case of normality or equal of variance failure, we performed a one-way ANOVA on the rank (Kruskal–Wallis). By the same way, data from OF, NOR, and FC were assessed by repeated measure two-way ANOVA with genotype as between subject and session as within subject. All pairwise comparison was done with Tukey test in post hoc analysis. Also NOR RI was analysed with one sample *t*-test for determined a significant difference versus 0.

EEG recordings. Implantation of electrodes was done under general anesthesia (Propofol, Fentanyl, Domitor mixture 10 µL g^{-1}). Heterozygous *Tubg1*$^{Y92C/+}$ ($n = 3$) and C57Bl/6 wild-type littermate mice ($n = 3$) aged postnatal 12 weeks were implanted with stainless steel wire electrodes (Phymep, France). For each mouse, five single-contact electrodes were placed over the left and right fronto-parietal cortex. The electrodes were secured into the skull and soldered to a micro-connector that was fixed to the skull by acrylic cement. An electrode over the surface of the cerebellum served as ground for all derivations. All mice were allowed to recover for a period of 1 week before EEG recordings. Freely moving mice were then recorded in their housing transparent cage and were connected to a recording system. EEG signals were amplified with a band-pass filter setting of 0.1–70 Hz with a 64-channel system (Coherence, Natus) and sampled at 256 Hz. Recordings were performed during 1 h for evidence of spontaneous convulsive seizure. At the end of the recording period, animals were injected intraperitoneally with a convulsive dose of 30 mg kg^{-1} of pentylenetetrazole (PTZ; Sigma-Aldrich, Co), a $GABA_A$ receptor antagonist, to evaluate seizure threshold. EEG was recorded during 30 min after PTZ. Video-EEGs were reviewed offline for electrographic seizures.

Quantifications and statistical analysis. All experiments were done in at least three independent replicates and analysis were performed blinded to genotype or condition. All statistics were calculated with GraphPad Prism 6. Data are presented as mean ± sem. The experimental n, the test used and the statistical significance can be found in the figure legends. For in utero electroporation experiments cell countings were done in three different brain slices of at least three different embryos, pups or mice for each condition. Time-lapse recordings were performed in a minimum of three electroporated embryos per group. For all histological quantifications performed in *Tubg1*$^{Y92C/+}$ and *Tubg1*$^{+/-}$ mice three brain sections per brain of at least three different animals per condition were analyzed. Morphometric analysis of the knock-in and knock-out mice, a minimum of three animals were studied and analyzed in a single specific brain section. Experiments performed in cells (N2A, HeLA, Fibroblasts) were done independently at least three times. For EB3 comets, in each experiment 10 cells were analyzed and in each cell 15–30 comets were quantified. For re-polymerization, in each experiment around 100 cells were analyzed per condition. For behavioral analysis, 9 male mice of each genotype were used. Three mice of each genotype were used for EEG recordings and challenged with PTZ. A more detailed description of statistics is provided in Supplementary Dataset 3.

Reporting summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availiability

The source data underlying Figs. 1c; 2b, c; 3b–g, i–k; 4b, c, e, g–i; 5b, d, g–m; 6a, c; 7a–e; and Supplementary Figs. 1c, d; 2a–c, e, g, i; 3a, c–f; 4d; 5c, d; 6d–f; 7; 8; 9a; 10a–j, l–o; 11b–e are provided as a Source Data file. All other relevant data included in the article are available from the authors upon request.

Received: 15 May 2018 Accepted: 5 April 2019
Published online: 13 May 2019

References

1. Rakic, P. Specification of cerebral cortical areas. *Science* **241**, 170–176 (1988).
2. Anderson, S. A., Eisenstat, D. D., Shi, L. & Rubenstein, J. L. R. Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. *Science.* **278**, 15–18 (1997).
3. Guerrini, R. & Dobyns, W. B. Malformations of cortical development: clinical features and genetic causes. *Lancet Neurol.* **13**, 710–726 (2014).
4. Francis, F. et al. Human disorders of cortical development: from past to present. *Eur. J. Neurosci.* **23**, 877–893 (2006).
5. Barkovich, A. J., Guerrini, R., Kuzniecky, R. I., Jackson, G. D. & Dobyns, W. B. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. *Brain* **135**, 1348–1369 (2012).
6. Jaglin, X. H. & Chelly, J. Tubulin-related cortical dysgeneses: microtubule dysfunction underlying neuronal migration defects. *Trends Genet.* **25**, 555–566 (2009).
7. Bahi-Buisson, N. et al. The wide spectrum of tubulinopathies: what are the key features for the diagnosis? *Brain* **137**, 1676–1700 (2014).
8. Bond, J. et al. A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size. *Nat. Genet.* **37**, 353–355 (2005).
9. Hussain, M. S. et al. A truncating mutation of CEP135 causes primary microcephaly and disturbed centrosomal function. *Am. J. Hum. Genet.* **90**, 871–878 (2012).
10. Yu, T. W. et al. Mutations in WDR62, encoding a centrosome-associated protein, cause microcephaly with simplified gyri and abnormal cortical architecture. *Nat. Genet.* **42**, 1015–1020 (2010).
11. Guernsey, D. L. et al. Mutations in centrosomal protein CEP152 in primary microcephaly families linked to MCPH4. *Am. J. Hum. Genet.* **87**, 40–51 (2010).
12. Bond, J. et al. ASPM is a major determinant of cerebral cortical size. *Nat. Genet.* **32**, 316–320 (2002).
13. Kumar, A., Girimaji, S. C., Duvvari, M. R. & Blanton, S. H. Mutations in STIL, encoding a pericentriolar and centrosomal protein, cause primary microcephaly. *Am. J. Hum. Genet.* **84**, 286–290 (2009).
14. Poirier, K. et al. Mutations in TUBG1, DYNC1H1, KIF5C and KIF2A cause malformations of cortical development and microcephaly. *Nat. Genet.* **45**, 639–647 (2013).
15. Brock, S. et al. Tubulinopathies continued: refining the phenotypic spectrum associated with variants in TUBG1. *Eur. J. Hum. Genet.* **26**, 1132–1142 (2018).
16. Yuba-Kubo, A., Kubo, A., Hata, M. & Tsukita, S. Gene knockout analysis of two γ-tubulin isoforms in mice. *Dev. Biol.* **282**, 361–373 (2005).

17. Dráberová, E. et al. Differential expression of human γ-tubulin isotypes during neuronal development and oxidative stress points to a γ-tubulin-2 prosurvival function. *FASEB J.* **31**, 1828–1846 (2017).
18. Moudjou, M., Bordes, N., Paintrand, M. & Bornens, M. gamma-Tubulin in mammalian cells: the centrosomal and the cytosolic forms. *J. Cell. Sci.* **109** (Pt 4), 875–887 (1996).
19. Vinopal, S. et al. γ-Tubulin 2 nucleates microtubules and is downregulated in mouse early embryogenesis. *PLoS ONE* **7**, e29919 (2012).
20. Ohashi, T., Yamamoto, T., Yamanashi, Y. & Ohsugi, M. Human TUBG2 gene is expressed as two splice variant mRNA and involved in cell growth. *FEBS Lett.* **590**, 1053–1063 (2016).
21. Oegema, K. et al. Characterization of two related Drosophila γ-tubulin complexes that differ in their ability to nucleate microtubules. *J. Cell. Biol.* **144**, 721–733 (1999).
22. Knop, M. & Schiebel, E. Spc98p and Spc97p of the yeast gamma-tubulin complex mediate binding to the spindle pole body via their interaction with Spc110p. *EMBO J.* **16**, 6985–6995 (1997).
23. Kollman, J. M. et al. The structure of the gamma-tubulin small complex: implications of its architecture and flexibility for microtubule nucleation. *Mol. Biol. Cell.* **19**, 207–215 (2008).
24. Kollman, J. M., Merdes, A., Mourey, L. & Agard, D. A. Microtubule nucleation by γ-tubulin complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 709–721 (2011).
25. Wang, X., Qiu, R., Tsark, W. & Lu, Q. Rapid promoter analysis in developing mouse brain and genetic labeling of young neurons by doublecortin-DsRed-express. *J. Neurosci. Res.* **85**, 3567–3573 (2007).
26. Galjart, N. Plus-end-tracking proteins and their interactions at microtubule ends. *Curr. Biol.* **20**, R528–R537 (2010).
27. Collins, S. C. et al. A method for parasagittal sectioning for neuroanatomical quantification of brain structures in the adult mouse. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* **8**, e48 (2018).
28. Li, G. & Pleasure, S. J. The development of hippocampal cellular assemblies. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **3**, 165–177 (2014).
29. Bevins, R. A. & Besheer, J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat. Protoc.* **1**, 1306–1311 (2006).
30. Crawley, J. N. Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Res.* **835**, 18–26 (1999).
31. Loscher, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure* **20**, 359–368 (2011).
32. Oakley, C. E. & Oakley, B. R. Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of Aspergillus nidulans. *Nature* **338**, 662–664 (1989).
33. Gueth-Hallonet, C. et al. Gamma-Tubulin is present in acentriolar MTOCs during early mouse development. *J. Cell. Sci.* **105**, 157–166 (1993).
34. Donato, N. Di et al. Analysis of 17 genes detects mutations in 81 % of 811 patients with lissencephaly. *Genet. Med.* **20**, 1354–1364 (2018).
35. Faheem, M. et al. Molecular genetics of human primary microcephaly: an overview. *Bmc. Med. Genom.* **8**, 24–27 (2015).
36. Corbo, J. C. et al. Doublecortin is required in mice for lamination of the hippocampus but not the neocortex. *J. Neurosci.* **22**, 7548–7557 (2002).
37. Keays, D. A. et al. Mutations in α-Tubulin cause abnormal neuronal migration in mice and lissencephaly in humans. *Cell* **128**, 45–57 (2007).
38. Gstrein, T. et al. Mutations in Vps15 perturb neuronal migration in mice and are associated with neurodevelopmental disease in humans. *Nat. Neurosci.* https://doi.org/10.1038/s41593-017-0053-5 (2018).
39. Stottmann, R. W. et al. *Genes. Brain. Behav.* **16**, 250–259 (2016).
40. Bai, J. et al. RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nat. Neurosci.* **6**, 1277–1283 (2003).
41. Jaglin, X. H. et al. Mutations in the B-tubulin gene TUBB2B result in asymmetrical polymicrogyria. *Nat. Genet.* **41**, 746–752 (2009).
42. Wong, M. & Roper, S. N. Genetic animal models of malformations of cortical development and epilepsy. *J. Neurosci. Methods* **260**, 73–82 (2016).
43. Chevassus-au-Louis, N. & Represa, A. The right neuron at the wrong place: Biology of heterotopic neurons in cortical neuronal migration disorders, with special reference to associated pathologies. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 1206–1215 (1999).
44. Oakley, B. R., Oakley, C. E., Yoon, Y. & Jung, M. K. Gamma-tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in Aspergillus nidulans. *Cell* **61**, 1289–1301 (1990).
45. Stearns, T., Evans, L. & Kirschner, M. Gamma-tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell* **65**, 825–836 (1991).
46. Joshi, H. C., Palacios, M. J., McNamara, L. & Cleveland, D. W. Gamma-tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation. *Nature* **356**, 80–83 (1992).
47. Oakley, B. R. I. Centrosomes and Microtubule Nucleation. *Curr. Top. Dev. Biol.* **49**, 27–54 (2000).
48. Wiese, C. & Zheng, Y. A new function for the gamma-tubulin ring complex as a microtubule minus-end cap. *Nat. Cell Biol.* **2**, 358–364 (2000).
49. Hendrickson, T. W., Yao, J., Bhadury, S., Corbett, A. H. & Joshi, H. C. Conditional mutations in gamma-tubulin reveal its involvement in chromosome segregation and cytokinesis. *Mol. Biol. Cell.* **12**, 2469–2481 (2001).
50. Feng, Y. & Walsh, C. A. Mitotic spindle regulation by Nde1 controls cerebral cortical size. *Neuron* **44**, 279–293 (2004).
51. Mcintyre, R. E. et al. Disruption of mouse cenpj, a regulator of centriole biogenesis, phenocopies seckel syndrome. *PLoS Genet.* **8**, 1–18 (2012).
52. Bouissou, A. et al. γ-Tubulin ring complexes regulate microtubule plus end dynamics. *J. Cell. Biol.* **187**, 327–334 (2009).
53. Paluh, J. L. et al. A mutation in gamma-tubulin alters microtubule dynamics and organization and is synthetically lethal with the kinesin-like protein pkl1p. *Mol. Biol. Cell.* **11**, 1225–1239 (2000).
54. Chinen, T. et al. The γ-tubulin-specific inhibitor gatastatin reveals temporal requirements of microtubule nucleation during the cell cycle. *Nat. Commun.* **6**, 1–11 (2015).
55. Sánchez-Huertas, C. et al. Non-centrosomal nucleation mediated by augmin organizes microtubules in post-mitotic neurons and controls axonal microtubule polarity. *Nat. Commun.* **7**, 12187 (2016).
56. Cunha-Ferreira, I. et al. The HAUS complex is a key regulator of non-centrosomal microtubule organization during neuronal development. *Cell Rep.* **24**, 791–800 (2018).
57. Sulimenko, V. et al. Microtubule nucleation in mouse bone marrow–derived mast cells is regulated by the concerted action of GIT1/βPIX proteins and calcium. *J. Immunol.* **194**, 4099–4111 (2015).
58. Dráberová, E. et al. Overexpression and nucleolar localization of γ-tubulin small complex proteins GCP2 and GCP3 in glioblastoma. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **74**, 723–742 (2015).
59. Hájková, Z. et al. STIM1-directed reorganization of microtubules in activated mast cells. *J. Immunol.* **186**, 913–923 (2011).
60. Sulimenko, V. et al. Association of brain γ-tubulins with αβ-tubulin dimers. *Biochem. J.* **365,** 889–895 (2002).
61. Katsetos, C. D. et al. Altered cellular distribution and subcellular sorting of γ-tubulin in diffuse astrocytic gliomas and human glioblastoma cell lines. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **65**, 465–477 (2006).
62. Tabata, H. & Nakajima, K. Efficient in utero gene transfer system to the developing mouse brain using electroporation: visualization of neuronal migration in the developing cortex. *Neuroscience* **103**, 865–872 (2001).
63. Tielens, S., Godin, J. D. & Nguyen, L. Real-time recordings of migrating cortical neurons from GFP and Cre recombinase expressing mice. *Curr. Protoc. Neurosci.* **74**, 3.29.1–23 (2016).
64. Birling, M.-C., Dierich, A., Jacquot, S., Herault, Y. & Pavlovic, G. Highly-efficient, fluorescent, locus directed cre and FlpO deleter mice on a pure C57BL/6N genetic background. *Genesis* **50**, 482–489 (2012).

Acknowledgements

This work was supported by grants from the EU Seventh Framework Programme FP7 under the projects GENCODYS (COLLABORATION PROJECT-2009-2.1.1-1/241995 to H.S., Y.H. and J.C.) and DESIRE (grant agreement no. 602531 to J.C), the French state funds through the Agence Nationale de la Recherche under the projects ANR-15-CE16-0018-01, and the programme Investissements d'Avenir labelled [ANR-10-IDEX-0002-02, ANR-10-LABX-0030-INRT, to B.Y., J.G, J.C., Y.H., and ANR-10-INBS-07 PHENOMIN to Y.H.]. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish or manuscript preparation. This work was also supported in part by Grants 16–23702s (Vadym Sulimenko) and 18–27197s (Pavel Dráber) from the Grant Agency of the Czech Republic and by Institutional Research Support (RVO 68378050). We thank the Imaging Center of IGBMC (ici.igbmc.fr), in particular Basile Gurchenkov, Elvire Guiot and Erwan Grandgirard for their assistance in the microscope imaging experiments and Nadia Messaddeq from the electron microscopy platform for the data generated. We are grateful to the staff of the mouse facilities of the Institut Clinique de la souris (ICS) and Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) for their involvement in the project. We also thank the lab of David Agard (San Francisco, California), and in particular Axel Brilot for their assistance and suggestions. We thank Maria Osipenko for the analysis of cortical thickness in adult knock-in mice. We are grateful to Julien Couchet for providing us the pCAG-mScarlet and pSilencer-CAG-Venus-2 plasmids. We would like to acknowledge Mohammed Selloum and Hamid Meziane for their implication in the characterization of Tubg1$^{+/-}$ model.

Author contributions

E.L.I. conceived and designed the experiments, performed experiments and analyzed the data of IUE, Time-lapse, cellular studies in fibroblasts and N2a cells, immunohistochemistry studies in mice and wrote the manuscript. J.G.G. performed and analyzed EB3 studies in fibroblasts and immunohistochemistry studies in mice and reviewed the manuscript. Vad.S. conceived, designed, performed and analyzed the data of immunoprecipitation studies and reviewed the manuscript. A.D. performed and analyzed behavioral studies. G.R. performed and analyzed EEG studies. K.R. participated in IUE and Time-lapse studies. S.C.C. performed neuroanatomical studies. L.A. provided assistance with Time-lapse studies. L.B. provided assistance and contributed with suggestions. N.D, and P.T. provided technical assistance and prepared reagents. P.N. provided patient fibroblasts. W.M. and A.V. and Val.S. provided technical assistance and advice for in vivo studies in mice. J.D.G. provided assistance, contributed with suggestions and reviewed the manuscript. M-C.B. and G.P. participated in the development of the mouse model. B.Y. designed experiments related to neuroanatomical studies. Y.H. designed experiments related to behavioral studies and reviewed the manuscript. P.D. designed experiments related to immunoprecipitation studies, provided assistance, contributed with suggestions and reviewed the manuscript. J.C. conceived, coordinated and supervised the study. M-V.H. conceived, designed, performed and analyzed the data of proliferation and EB3 in HeLa cells studies, coordinated and supervised the study.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at https://doi.org/10.1038/s41467-019-10081-8.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Reprints and permission information is available online at http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/

Journal peer review information: *Nature Communications* thanks the anonymous reviewers for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2019

Article 2

DYNC1H1-causing MCD and SMA-LED mutations lead to alterations of dynein dependent processes in patients derived fibroblasts

Amandine Béry*, **Johan G. Gilet***, Nancy Vegas, Cyril Gitiaux, Pascal Sabouraud, Sarah Farcy, Camille Maillard, Saliha Lagsier, Maria Victoria Hinckelmann Rivas, Jamel Chelly, Alexandre D. Baffet, Nadia Bahi-Buisson

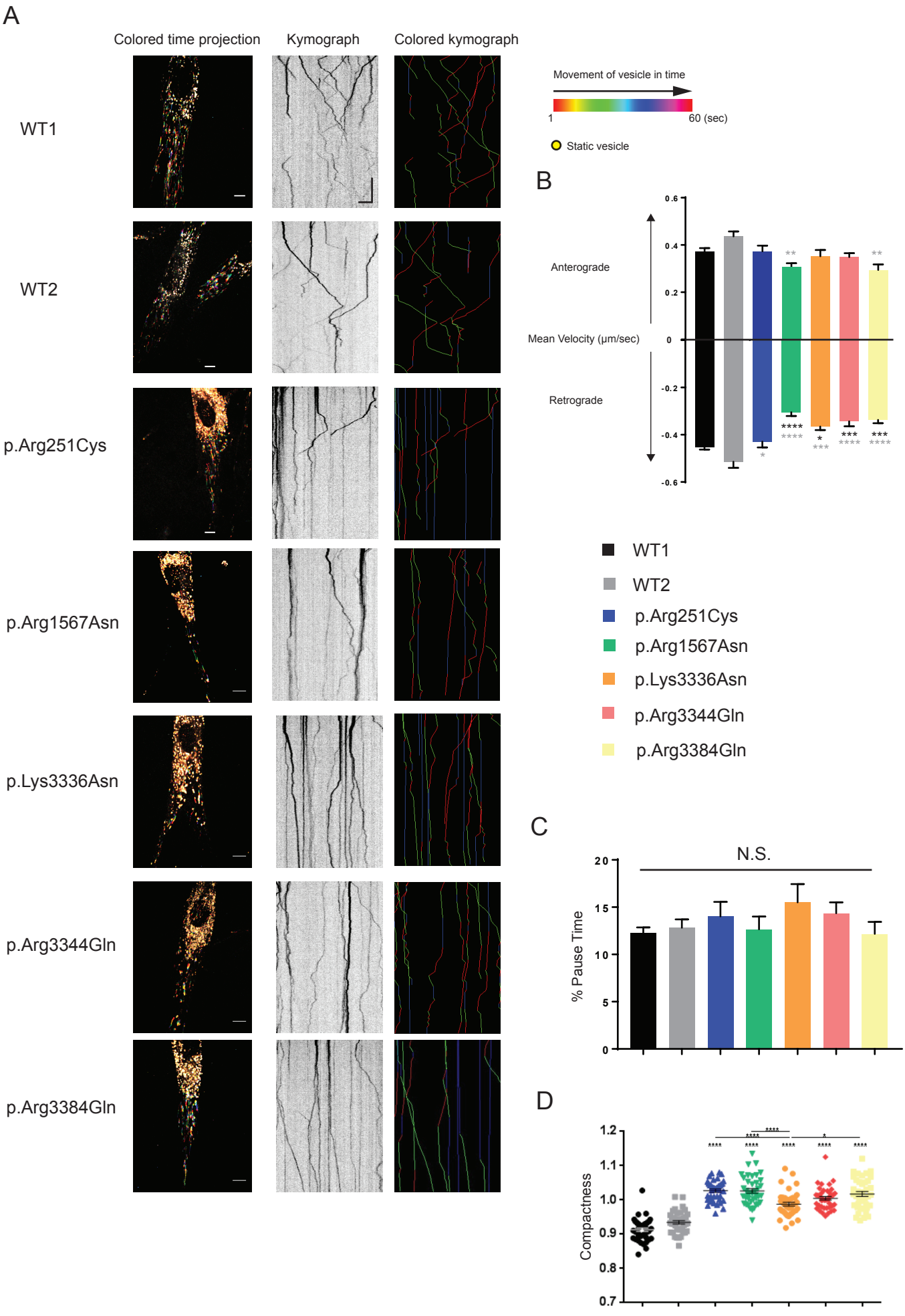
*Ces auteurs ont contribué de manière équivalente

Article en préparation pour une soumission fin 2019

Résumé :

Des mutations ponctuelles dans le gène codant pour la dynein cytoplasmic 1 heavy chain 1 (DYNC1H1), la principale protéine responsable du transport intracellulaire rétrograde sont associées à un large spectre de troubles neurologiques allant de malformations du développement cortical (MDC) à une atrophie musculaire spinale avec dominance inférieur (SMA-LED). DYNC1H1 code pour la chaine lourde de la dynéine cytoplasmique, une protéine motrice impliquée dans la division cellulaire, la migration et le transport intracellulaire de l'extrémité (+) vers l'extrémité (-) des microtubules. Bien que la cause de ce large spectre de maladie complexe reste inconnue, les données suggèrent que les mutations associées aux MDC sont situées dans le domaine moteur tandis que celles responsables de SMA-LED se concentrent dans le « tail domain ». Cependant pour la majorité des mutations aucune preuve directe d'un effet n'a été décrite. Dans cette étude, nous décrivons un nouveau cas de patient atteint de SMA-LED avec une nouvelle mutation (p.Arg251Cys), et nous réévaluons 4 patients précédemment décris. Ces études ont permis de mettre en évidence une diminution de la prolifération des fibroblastes de patient quel que soit la localisation de la mutation. De plus, l'étude du transport intracellulaire a permis de mettre en évidence une réduction significative du transport rétrograde uniquement pour les mutations localisées dans le domaine moteur de la protéine. Lors de cette étude j'ai développé et réalisé une technique d'analyse en temps réel du transport intracellulaire des lysosomes afin d'analyser ce phénomène dans les fibroblastes de patients. Ma contribution dans cette étude est illustrée par la figure ci-dessous.

Figure: Lysosome trafficking and positioning in the patient fibroblasts. (A) Colored time projection of acquisition from control and mutant fibroblasts illustrates movement of vesicles in time (each color represents vesicle position at different time points) (left panel, scale bar: 10µm). Middle and right panels show representative kymograph and colored trajectories of the different DYNC1H1 mutations; green color represents anterograde trajectories, red retrograde trajectories and blue represents pauses (Scale bar: 5µm and 5 sec). (B) Quantification of anterograde and retrograde mean velocity. (C) Lysosomes aggregation is reduced in all patients' fibroblasts. N is indicated under the plots and was from 4 experiments. Stars above symbols indicate the comparison between controls (WT1 in black, WT2 in grey) and each patient. Black lines on top shows differences between patient cell lines. Symbols: triangle for SMA-LED: p.Arg251CysSMA-LED in red and p.Arg1567GlnSMA-LED/MCD in pink; square for MCD: p.Lys3336AsnMCD in dark blue, p.Arg3344GlnMCD in blue and p.Arg3384GlnMCD in light blue; and circle for controls: WT1 in black and WT2 in grey. One-way ANOVA (*, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$; ****, $P<0.0001$). The error bars indicate one standard deviation about the mean.


A
Colored time projection
Kymograph
Colored kymograph
WT1
WT2
p.Arg251Cys
p.Arg1567Asn
p.Lys3336Asn
p.Arg3344Gln
p.Arg3384Gln
Movement of vesicle in time
1
60 (sec)
Static vesicle
B
Anterograde
Mean Velocity (μm/sec)
Retrograde
0.6
0.4
0.2
0
-0.2
-0.4
-0.6
WT1
WT2
p.Arg251Cys
p.Arg1567Asn
p.Lys3336Asn
p.Arg3344Gln
p.Arg3384Gln
C
N.S.
% Pause Time
20
15
10
5
0
D
Compactness
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7

Université de Strasbourg

Johan Gilet

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé STRASBOURG

Dérégulations neuro-développementales impliquées dans les malformations du développement cortical associées aux mutations du gène KIF2A : apport d'un modèle murin knock-in conditionnel.

Résumé

A l'aide d'études génétiques, notre équipe a identifié chez des patients avec des malformations du développement cortical, des mutations dans le gène *KIF2A*, une kinésine impliquée dans la dynamique des microtubules. Afin d'étudier dans un contexte physiologique l'impact de ces mutations sur le développement cortical, nous avons développé un modèle murin basé sur la technologie Cre-Lox exprimant conditionnellement la mutation p.His321Asp de KIF2A et nous permettant le contrôle de l'expression de celle-ci dans le temps et dans l'espace. Les premières analyses neuro-anatomiques et neuro-développementales des souris exprimant la mutation lors du développement embryonnaire nous ont permis de mettre en évidence une microcéphalie liée à une augmentation de la mort cellulaire par apoptose, mais aussi des anomalies de positionnement neuronal dans le cortex et l'hippocampe induites par une perturbation de la transition multipolaire-bipolaire des neurones. Des explorations phénotypiques nous ont permis de mettre en évidence des troubles comportementaux et une susceptibilité accrue à l'épilepsie chez la souris mutante. De plus, des analyses mécanistiques à l'aide des fibroblastes de patients et de la purification de la protéine mutante ont montré que la protéine mutante présente une incapacité à dépolymériser les microtubules induisant des perturbations de la dynamique de cette structure. Nous pensons que l'ensemble des résultats obtenus lors de ce projet de thèse pourra apporter une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans les malformations du développement cortical liées aux mutations dans le gène *KIF2A*.

Mots clés : KIF2A, malformations du développement cortical, cortex, hippocampe, épilepsie, dynamique des microtubules, modèle souris, knock-in conditionnel.

Summary

By using genetic studies, our team has identified in patients with malformations of cortical development, missense mutations in the *KIF2A* gene, a kinesin involved in microtubules depolymerization. In order to study in a physiological context the impact of these mutations on cortical development, we have developed a mouse model based on Cre-Lox technology conditionally expressing the KIF2A p.His321Asp mutation to allow the control of its expression in time and space. The first neuro-anatomical and neuro-developmental analysis of the mice expressing the mutation during embryonic development allowed us to highlight microcephaly linked to an increase in apoptotic cell death, but also neuronal positioning abnormalities in the cortex and the hippocampus induced by disruption of the multipolar-bipolar transition of neurons. Phenotypic explorations allowed us to highlight behavioral disorders and increased susceptibility to epilepsy in the mutant mouse. In addition, mechanistic analysis using patient fibroblasts and purification of the mutant protein have shown that the mutant protein can not depolymerize microtubules, inducing disturbances of the dynamics of this structure. We believe that all the results obtained during this thesis project will provide a better understanding of the pathophysiological mechanisms involved in malformations of cortical development related to mutations in the *KIF2A* gene.

Keywords: KIF2A, malformations of cortical development, cortex, hippocampus, epilepsy, microtubules dynamic, mouse model, conditional knock-in.