Huntingtine et développement cortical

Julien Le Friec

▶ **To cite this version:**

Julien Le Friec. Huntingtine et développement cortical. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Grenoble Alpes, 2019. Français. NNT : 2019GREAV016 . tel-02372650

HAL Id: tel-02372650
https://theses.hal.science/tel-02372650

Submitted on 20 Nov 2019

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

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

Communauté
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : Neuroscience - Neurobiologie

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Julien LE FRIEC

Thèse dirigée par **Sandrine HUMBERT, DR2, INSERM U1216**

préparée au sein du **Grenoble Institut des Neurosciences (GIN)** dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Huntingtine et développement cortical

Thèse soutenue publiquement le **12 juin 2019,**

Membre du jury :
Madame Alexandra DURR
PU-PH ICM Hôpital Pitié Salpêtrière, Présidente du jury
Madame Juliette GODIN
CR IGBMC, Rapporteur
Monsieur Julien COURCHET
CR Institut NeuroMyoGene Lyon, Rapporteur
Monsieur Alain BUISSON
Professeur UGA, Examinateur
Madame Sandrine HUMBERT
DR2 INSERM U1216, Directrice de thèse

Membre invité :
Madame Monia BARNAT
CR INSERM U1216, Co-encadrante

Remerciements

Je remercie mes rapporteurs, **Juliette Godin** et **Julien Courchet**, pour avoir accepté de faire la lecture critique de mon manuscrit. Je tiens également à remercier **Alexandra Durr** et **Alain Buisson** pour avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse.

Sandrine, merci de m'avoir accueilli au sein de ton équipe. Tu m'as donné la chance énorme d'intégrer un groupe dynamique et productif sur tous les plans scientifiques. Notre collaboration aura été tumultueuse et pleine de rebondissements, mais elle m'aura donné énormément d'atouts pour l'avenir. J'espère réussir à tirer avantage de tous ce que j'ai appris ici. Encore merci.

Monia, je te remercie d'avoir pris en charge ma formation scientifique et technique. J'aurais beaucoup appris de toi sur les rouages d'un laboratoire, la méthode scientifique et j'espère avoir su « tirer le meilleur » de tes enseignements. Ton aide dans la correction du manuscrit m'a été très précieuse, dans la panade comme toujours avec moi ! Je garderai les bons souvenirs !

Fabienne, un grand merci pour les moments que tu m'as accordés même quand tu n'avais pas le temps. J'ai toujours apprécié les discussions avec toi et je n'oublierai jamais le « verbe » et le « mot » dont tu sais faire preuve. Que Stéphane Bern soit avec toi !

Nathalie, je t'ai fait vivre un enfer administratif sous plusieurs formes et tu as su garder ton calme avec moi en toute circonstance, merci merci merci !

Wilhelm, mon partenaire de pause de café, amateur de discussion intelligente (ou pas) et de sport (ou pas), je te remercie d'avoir été là. Ton soutien en testostérone a été d'une grande aide tout au long de la thèse.

Rémi, Barbara et **Sophie**, je n'aurai pas eu le temps de tisser des liens avec vous, mais sachez que j'ai apprécié travailler à vos côtés.

Mariacristina and **Chiara**, thank you for your help when I needed it, I hope that you will be able to forget my impressive muscles.

Elodie et **Maxime**, je vous remercie vivement pour vos conseils, votre écoute et les discussions que nous avons pu avoir.

Caroline, merci de m'avoir aidé dans la gestion de mes souris, tes gâteaux et ta recette de mousse au chocolat !

Eve, compagnon de bière, d'escalade et parfois de sortie quand tu m'oublies pas ! J'espère que tu vas finir vite et bien, qu'on puisse fêter ça ! Merci pour ton aide et ton soutien.

La machine à café, ma grande amie sans qui cette thèse aurait été bien plus dure.

Les zootechniciens, en particulier **Sylvain** et **Fabien**, pour les blagues potaches et leur aide dès que j'en avais besoin.

Je remercie toutes les autres personnes qui ont croisés ma route au cours de ces 3 années.

A ma famille, qui même si éloignée, a essayé de me soutenir au mieux. Sans vous tout aurait été plus difficile, merci d'être venu. En particulier, à Flora qui a fait l'effort de venir me voir aussi souvent que possible et a ardemment demandé à être cité ici …

Doris, la meilleure pour la fin, tu ne m'as peux être pas suivi mais tu es là maintenant et je n'en suis que plus heureux car je te suivrai aussi. Tu m'as soutenu et aidé dans les moments les plus difficiles et j'espère pouvoir te le rendre aussi bien. Ne lâche rien, ton tour viendra aussi !

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AKT : *Serine/threonine Kinase*

aIP : Progéniteur intermédiaire apical

AMPA-R : Amino-hydroxyl-methylisoazol-propionate récepteur

AP : Progéniteur apical

aPKC : *atypical Protein Kinase C*

AR : Acide rétinoîque

aRG : Cellule de la glie radiale apicale

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messager

ATP : Adénosine tri-phosphate

BAC : *Bacterial Artificial Chromosome*

BDNF : *Brain Derived Neurotrophic Factor*

bIP : Progéniteur intermédiaire

BLBP : *Brain Lipid Binding Protein*

BP : Progéniteur basal

bRG : Cellule de la glie radiale basale

cAMP : Adénosine monophosphate cyclique

CDK : *Cylin Dependant Kinase*

Coll. : collaborateur

CP : Plaque corticale

CRE : *Cyclin Recombinase*

CREB : *cAMP-reponse element binding protein*

C-ter : Extrémité C-terminal

CTIP2 : *Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor interacting protein 2*

CUX 1 : *Cut Like Homebox 1*

DLL1 : *Delta-Like 1*

E n : Jour de développement embryonnaire n

ESC : cellule souche embryonnaire

EUI : Electroporation *In Utero*

FEZF2 : *Fez Family Zinc Finger 2*

FGF : *Fibroblast Growth Factor*

GABA : Acide y-aminobutyrique

GAPDH : Glycéraldéhyde 3-phosphate dehydrogénase

GFAP : *Glial Fibrillary acidic protein*

GSK : *Glycogen synthase kinase*

HAP : *Huntingtin Associated Protein*

HAT : *Histone Acetyl Transferase*

HDAC *: Histone De-Acetylase*

HEAT : *Huntingtine Facteur d'élongation eucaryote 3 Protéine phosphatase A et TOR1*

HIP : *Huntingtin Interacting Protein*

HTT : Huntingtine

IFT : transport intraflagellaire

IP : Progéniteur intermédiaire

iPSC : cellule souche pluripotente induite

IUE : *In Utero Electroporation*

K : Lysine

Kb : Kilobase

KI : *Knock-In*

KO : *Knock-out*

LIS1 : *Lissencephaly 1*

MAP : *Microtubule Associated Protein*

MCI : *Mild Cognitive Impairment*

MH : Maladie de Huntington

Mib1 : *Mindbomb 1*

MNI : Migration nucléaire intercinétique

MSN : Neurone spinifère moyen

mHTT : Huntingtine mutante

NCAD : N-Cadhérine

NE : Cellule neuroépithéliale

NES : *Nuclear Export Signal*

NMDA-R : glutamate N-methyl-D-aspartate récepteur

NPC : Neurones de projection callosaux

NPCTh : Neurone de projection corticothalamique

NPSC : Neurone de projection sous-cérébrale

NRSF : *Neuron Restrictive Silencer Factor*

N-ter : extrémité N-terminal

P n : Jour de vie post-natal n

PAR : *Partition defective*

PAX6 : *Paired box 6*

Poly-A : Poly-adénylation

Poly-Q : Expansion poly-glutamine

PP : Préplaque corticale

PRC2 : *Polycomb Repressor complexe 2*

PRD : *Proline Rich Domain*

PSD : *Post-Synaptic Density*

RAB : *Ras-like Brain*

RG : Cellule de la glie radiale

SATB2 : *Special AT-Rich sequence binding protein 2*

SHH : *Sonic Hedge Hog*

shARN : *Short-hairpin ARN*

SOX : *SRY-box containing protein*

SP : *Sous plaque corticale*

TBR 1/2 : *T-Box Brain 1/2*

TCP : *Tyrosine Carboxy-Peptidase*

TTL : *Tyrosine ligase*

Tub : Tubuline

Q : Glutamine

VASH : *Vasohibin*

VBP : *VASH Binding Protein*

WNT : *Wingless*

YAC : *Yeast Artificial Chromosome*

ZI : Zone intermédiaire

ZM : Zone marginale ZV

ZO1 : *Zonula Occludens 1*

ZSV : Zone sous-ventriculaire

Avant-propos

La maladie de Huntington (MH) est une pathologie neurologique héréditaire qui entraine des déficits moteurs, psychiatriques et cognitifs. La MH est caractérisée par la dégénérescence des neurones corticaux et striataux du cerveau adulte. Cette maladie est causée par une mutation du gène codant la protéine Huntingtine (HTT; Huntingtine mutante : mHTT). Ceci conduit au gain de nouvelles fonctions toxiques de la mHTT mais aussi à la perte des fonctions normales de la HTT, d'où l'intérêt d'étudier la fonction de la HTT sauvage et mutée dans la MH. La MH se développant dans la plupart des cas à l'âge adulte, les rôles de la HTT et les conséquences de sa mutation ont principalement été étudiés à ce stade alors que: (1) HTT et mHTT sont exprimées très tôt lors de la vie embryonnaire, (2) l'expression de la mHTT restreinte au développement est suffisante pour induire des phénotypes caractéristiques de la MH chez l'adulte, (3) les porteurs de la mutation ont un volume intra-crânial réduit en phase pré-symptomatique. Ces observations soulèvent donc la question du rôle de la HTT dans le développement cérébral, et plus particulièrement dans celui du cortex, structure touchée par une dégénérescence massive. C'est dans ce contexte que notre équipe étudie le rôle de la HTT et les conséquences de sa mutation dans le développement embryonnaire et post-natal du cortex cérébral.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à deux aspects différents concernant la HTT et son implication dans le développement du cortex cérébral.

Dans un premier temps, en collaboration avec Barnat Monia, j'ai contribué à l'identification de la fonction de la HTT dans la migration radiale des neurones corticaux post-mitotiques en utilisant des modèles murins permettant l'inactivation génétique de la HTT dans ces neurones. Cette première étude a démontré le rôle clé de la HTT dans la migration neuronale ainsi que sa contribution à l'élaboration d'une lamination corticale normale et à l'acquisition d'une morphologie neuronale saine.

Secondement, j'ai caractérisé l'effet de la mutation de la HTT sur le développement cortical embryonnaire dans un modèle génétique intégré : zQ175, qui reproduit la physiopathologie de la maladie humaine. Dans cette étude, j'ai mis en évidence un effet différentiel de la mutation sur la neurogenèse corticale précoce et tardive, qui contribue *in fine* à l'émergence de défauts de lamination corticale aberrante à la naissance.

L'introduction de ce manuscrit se divise en trois parties qui couvrent les sujets abordés au cours de ma thèse. La première partie rassemble les informations autour de la MH. Dans la seconde partie, je passe en revue les fonctions de la HTT, les effets qu'entraine sa mutation et j'y décris les principaux modèles animaux utilisés pour étudier la MH. La troisième partie aborde les informations essentielles concernant l'architecture du cortex cérébral ainsi que sa formation durant la vie embryonnaire et post-natale. Enfin, la quatrième partie passe en revue

les données connues concernant les fonctions de la HTT durant le développement du cortex cérébral. En particulier, j'expose les données bibliographiques qui ont favorisé l'émergence de l'hypothèse que la MH est un trouble neurodéveloppemental.

Cette dernière hypothèse a été étayée par mon travail de thèse. Premièrement, la HTT est un acteur essentiel de la polarisation des neurones post-mitotiques et nous observons que la mHTT perd sa fonction dans ce processus. L'absence de HTT conduit à un défaut de migration et entraine une morphologie neuronale atrophiée. De plus, j'ai apporté une vue plus globale de l'effet de la mutation de la HTT sur la neurogenèse corticale. En effet, la mHTT, en dérégulant l'activité mitotique des progéniteurs neuronaux dans les stades précoces du développement embryonnaire, contribue à désorganiser la lamination corticale post-natale. En parallèle, la mutation induit la perte de la fonction qu'exerce la HTT sauvage dans la migration radiale et affecte tout particulièrement les neurones générés tardivement. Enfin, la mutation ralentie la maturation neuronale.

Table des matières : Huntingtine et développement cortical

INTRODUCTION 15

CHAPITRE 1 : LA MALADIE DE HUNTINGTON 16

1. Des danses à la Chorée de Huntington 17

1.1. Les danses de Saint Guy 17

1.2. La caractérisation de la maladie de Huntington 18

2. La maladie de Huntington 19

2.1. Nomenclature et patients 19

2.2. Les symptômes moteurs 19

2.3. Les symptômes cognitifs 20

2.4. Les symptômes psychiatriques 21

2.5. Prévalence 22

3. La neurodégénérescence 23

3.1. Le striatum 23

3.2. Le cortex cérébral 25

4. Le gène de la Huntingtine et sa mutation pathologique 26

4.1. Identification du gène de la Huntingtine (HTT) 26

4.2. La mutation de la Huntingtine 27

CHAPITRE 2 : LA HUNTINGTINE 29

1. Généralités 30

2. Transcription du gène de la HTT 30

2.1. Polyadénylation différentielle du transcrit 30

2.2. Epissage alternatif 31

3. Structure de la Huntingtine 32

4. Modifications de la protéine 33

4.1. Ubiquitination et Sumoylation 33

4.2. Palmitoylation 34

4.3. Acétylation 34

4.4. Phoshorylation 34

5. Les rôles de la Huntingtine 35

5.1. La transcription 35

5.2. Dynamique intracellulaire 35

5.3. Division cellulaire 36
5.4. Survie cellulaire 37
5.5. Autophagie 38
5.6. Ciliogenèse 38
6. Conséquences de la mutation de la HTT : gain et perte de fonction 39
6.1. Clivage de la HTT 39
6.2. Agrégation et cytotoxicité 39
6.3. Transcription 42
6.4. Excitotoxicité 43
6.5. Défauts mitochondriaux 43
6.6. Dynamique et transport intracellulaire 44
7. Les modèles de la maladie de Huntington 46
7.1. Les modèles lésionnels 46
7.2. Modèles génétiques animaux 46
7.2.1. Caenorhabditis Elegans (*C. Elegans*) 46
7.2.2. Drosophila melanogaster 46
7.2.3. Modèles murins 47
7.2.3.1. Les souris transgéniques 47
7.2.3.2. Les souris Knock-In 48
7.2.2.3. Les modèles de perte de fonction 49
7.2.4. Les mini-porcs knock-in 50
CHAPITRE 3 : NEUROGENESE CORTICALE EMBRYONNAIRE 51
1. Le cortex cérébral 52
1.1. Les aires corticales 52
1.2. La lamination corticale 53
2. La neurogenèse corticale embryonnaire 54
2.1. Les progéniteurs neuronaux : les acteurs de la neurogenèse corticale 56
2.1.1. Les progéniteurs apicaux (AP) 56
2.1.1.1. Les cellules neuroépithéliales (NE) 57
2.1.1.2. Les cellules de la glie radiaire apicale (aRG) 57
2.1.1.3. Les progéniteurs intermédiaires apicaux (aIP) 58
2.1.2. Les progéniteurs basaux (BP) 59
2.1.2.1. Les progéniteurs intermédiaires basaux (bIP) 59
2.1.2.2. La glie radiaire basale (bRG) 59

2.1.3. Modes de division 60
2.2. Nature des divisions cellulaires et devenir des progéniteurs 61
2.2.1. Fuseau mitotique et orientation 61
2.2.2. Ségrégation des déterminants cellulaires 62
2.2.2. Domaine basal 64
2.3. Mécanismes régulant le devenir des progéniteurs neuronaux 64
2.3.1. Migration nucléaire intercinétique 64
2.3.2. Le pied apicale 66
2.3.2.1. Les jonctions apicales 66
2.3.2.2. Le cil primaire 68
2.4. Facteurs intrinsèques et extrinsèques 69
2.4.1. Les facteurs intrinsèques 69
2.4.1.1. Régulation de la transcription 69
2.4.1.2. Les facteurs épigénétiques 70
2.4.1.3. Ubiquitination 71
2.4.2. Les facteurs extrinsèques 71
2.4.2.1. La voie Sonic Hedgehog 71
2.4.2.2. La voie Wingless 72
2.4.2.3. La voie FGF 74
2.4.2.4. L'acide rétinoique 74
2.4.3. Environnement de la zone ventriculaire 74
2.4.3.1. Contacts entre progéniteurs : la voie Notch 74
2.4.3.2. Feedback des neurones post-mitotiques 76
2.4.3.3. Action de la microglie et des vaisseaux sanguins sur la différenciation 76
3. Les neurones post-mitotiques 78
3.1. Le modèle d' « inside-out » 78
3.2. Générer la diversité neuronale 79
3.3. La migration neuronale 81
3.3.1. La translocation somatique 81
3.3.2. La locomotion 81
3.3.3. La nucléokinèse 82
3.3.4. Les mécanismes moléculaires régulant la migration neuronale 82
3.3.4.1. Régulation de la dynamique des microtubules 83

3.3.4.2. Voies de signalisation impliquées dans la migration 85
3.3.4.3. Les voies régulant la dynamique intracellulaire 87
3.3.4.5. Rôle de la plaque sous-corticale 88
3.4. Axonogenèse 88
3.4.1. Maturation moléculaire des neurones post-mitotiques 88
3.4.2. Polarisation axonale 90
3.5. Dendritogenèse 92
CHAPITRE 4 : LA MALADIE DE HUNTINGTON, UN TROUBLE DU NEURODEVELOPPEMENT ? 95
1. Expression de la HTT sauvage et mutée lors du développement embryonnaire et post-natale 96
2. Apports des modèles in vitro 96
3. Déplétion de la HTT pendant le développement 99
4. La mutation de la HTT pendant le développement 100
5. Objectifs des travaux de thèse 101
5.1. Le rôle de la HTT dans les neurones post-mitotiques 102
5.2. Effets de la mutation hétérozygote pendant la neurogenèse corticale 102
RESULTATS 104
ARTICLE 1 : La transition multipolaire-bipolaire des neurones corticaux post-mitotiques régulée par la Huntingtine est cruciale pour la morphologie neuronale post-natale. 105
ARTICLE 2 : L'effet différentiel de la génération précoce ou tardive de neurones corticaux conduit à une lamination corticale périnatale aberrante dans le modèle zQ175. 162
DISCUSSION 191
1. Huntingtine et neurogenèse corticale 191
1.1. Polarité apico-basale des progéniteurs neuronaux 192
1.2. Orientation du fuseau 192
1.3. Cycle cellulaire et migration inter-cinétique 193
1.4. Impact différentiel de la mutation de la HTT au cours du développement cortical 196
2. Huntingtine dans les neurones post-mitotiques 197
2.1. Migration radiale 197
2.2. dendritogenèse 198
2.3. Axonogenèse 199

3. La maladie de Huntington un trouble du neurodéveloppement? 199
4. Conclusion 201
ANNEXE 202
ARTICLE 3 : Identification de la CarboxyPeptidase de la Tubuline et son implication dans la différenciation neuronale. 203
BIBLIOGRAPHIE 249

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : LA MALADIE DE HUNTINGTON

1. Des danses à la Chorée de Huntington

1.1. Les danses de Saint Guy

Si le terme médical « chorée », qui désigne une agitation involontaire et irrépressible d'allure dansante, n'est apparu qu'au XVe siècle, elle a été d'abord connue sous le nom de danse de Saint Guy (Figure 1).

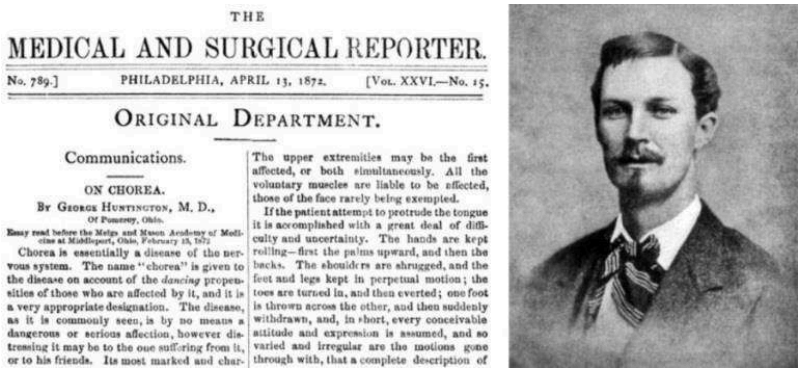
Figure 1 : Dessin d'un jeune garçon atteint de Danse de Saint Guy (chorée)

La première mention de « chorée » et des mouvements involontaires associés date du moyen-âge en l'an 1021 à Kölbigk en Rhénanie germanique. Il y est fait état de 18 hommes et femmes dansant et chantant sans pouvoir s'arrêter près d'une église (Figure 2). Certains en seraient morts de fatigue tandis que d'autres furent atteints de tremblements pour le reste de leur vie. A l'époque, ces gens sont décrits comme possédés, notamment à cause de leurs hallucinations, cris et appels au meurtre de prêtres : ils sont souvent accusés de pratiquer la sorcellerie. Ce phénomène s'étant répandu de façon « épidémique », des amendes de 6 schillings à qui dansait mais aussi des traitements par exorcisme virent le jour afin de traiter ces âmes égarées.

Figure 2 : Pèlerins de la Saint Jean dansant à Meuleenbeck (Gravure Pieter Brueghel)

Leur trouble ne pouvait s'expliquer par un phénomène somatique quelconque mais semblait être lié à différents affects socio-culturels, tels que les périodes de crises (famine, guerre). Les patients atteints de maladie de Huntington auraient pu être masqués par ce phénomène pendant des années.

En effet, des études généalogiques de familles atteintes ont établi que de potentiels patients ont été victimes de chasse aux sorcières en Nouvelle-Angleterre et Angleterre. Les célèbres procès des sorcières de Salem en 1692 font état de 30 exécutions par pendaison et crémation, parmi celles-ci, 7 femmes auraient des liens de parenté directs avec des familles atteintes de la maladie de Huntington.



THE

MEDICAL AND SURGICAL REPORTER.

No. 789.] PHILADELPHIA, APRIL 13, 1872. [Vol. XXVI.—No. 15.

ORIGINAL DEPARTMENT.

Communications.

ON CHOREA.

By George Huntington, M. D.,

Of Pomeroy, Ohio.

Essay read before the Meigs and Mason Academy of Medicine at Middleport, Ohio, February 13, 1872

Chorea is essentially a disease of the nervous system. The name "chorea" is given to the disease on account of the *dancing* propensities of those who are affected by it, and it is a very appropriate designation. The disease, as it is commonly seen, is by no means a dangerous or serious affection, however distressing it may be to the one suffering from it, or to his friends. Its most marked and characteristic feature is the involuntary and irregular muscular movements. These generally commence in the face, one side usually preceding the other, and the muscles of the eye, mouth, and tongue are the first to be affected. The movements of the face are peculiar, and are such as to attract the attention of the most casual observer. The patient is unable to look at you for any length of time, the eyes being rapidly turned from one object to another, and the mouth is kept constantly in motion, the lips being protruded, drawn back, or twisted from side to side, in a manner that is ludicrous in the extreme. The upper extremities may be the first affected, or both simultaneously. All the voluntary muscles are liable to be affected, those of the face rarely being exempted.

If the patient attempt to protrude the tongue it is accomplished with a great deal of difficulty and uncertainty. The hands are kept rolling—first the palms upward, and then the backs. The shoulders are shrugged, and the feet and legs kept in perpetual motion; the toes are turned in, and then everted; one foot is thrown across the other, and then suddenly withdrawn, and, in short, every conceivable attitude and expression is assumed, and so varied and irregular are the motions gone through with, that a complete description of

Figure 3 : Première page de la revue décrivant la chorée de Huntington (1872) et photographie de George Huntington.

1.2. La caractérisation de la maladie de Huntington

La première caractérisation détaillée de la « chorée de Huntington » est publiée en 1872 par un jeune médecin américain de 22 ans : George Huntington. Ce dernier publie une communication dans « *The Medical and Surgical Reporter* » dans laquelle il établit en trois paragraphes les trois signes distinctifs de la chorée. Il offre alors la première description d'une chorée qui portera désormais son nom (Figure 3) (Huntington 1872).

Premièrement, il fait état du caractère héréditaire de la chorée, mettant en avant que si une personne développe cette chorée, il y a forcément un parent et un aïeul qui la présentent. De plus, si l'individu porteur a des enfants, il y a de fortes chances que parmi eux, un des enfants soit atteint. Cependant, si un des enfants n'est pas atteint au cours de sa vie, il n'aura jamais de descendance atteinte.

Deuxièmement, il insiste sur les atteintes psychiatriques des patients. Il met en avant la progression de la « folie » chez ses patients, ainsi que leur tendance suicidaire. De plus, par la description de deux hommes mariés et atteints de la chorée, il souligne les troubles de désinhibition conduisant à une hyperactivité sexuelle extra-conjugale.

Dans une troisième partie, il met en avant l'âge d'apparition tardif de la chorée. D'après ses observations, aucun patient ne présente de troubles choréiques avant 30 à 40 ans. Cette observation est singulière car elle différencie cette chorée des autres chorées connues.

Avec cette description, G. Huntington posa ainsi les bases cliniques permettant d'identifier la chorée de Huntington par les troubles moteurs, psychiatriques, cognitifs et son caractère héréditaire.

2. La maladie de Huntington

2.1. Nomenclature et patients

La maladie de Huntington (MH) est caractérisée par une triade de symptômes moteurs, cognitifs et psychiatriques. Elle est due à une mutation transmise de façon héréditaire et selon un mode dominant. Pour ces raisons, on considère qu'un patient porteur de la mutation mais ne présentant pas de symptômes moteurs est dans la phase pré-manifeste. La phase pré-manifeste se décompose en deux parties. La première est la phase dite asymptomatique. La seconde est la phase prodromale durant laquelle le patient commence à montrer un déclin moteur et cognitif. Les porteurs ayant développé les symptômes moteurs sont considérés comme atteints par la MH : ils entrent dans la phase manifeste ou symptomatique (Bates 2015). La phase symptomatique de la maladie est constituée de 3 stades : précoce, intermédiaire et tardif, en corrélation avec la progression de la maladie et la sévérité des symptômes (Bates 2015). Une faible proportion des patients (5%) sont atteints d'une forme plus rare appelé maladie de Huntington Juvénile. Cette forme est caractérisé par une apparition des symptômes très précoce avant 20 ans (Quarrell 2012).

2.2. Les symptômes moteurs

Les symptômes moteurs constituent une part importante du diagnostic clinique de la MH. Ils apparaissent généralement entre 35 et 40 ans. Si la description initiale insistait sur la chorée, la liste des symptômes moteurs a depuis été supplémentée par la dystonie, mouvement involontaire distinct de la chorée, l'akinésie ou l'incapacité à effectuer certains mouvements, et enfin la bradykinésie, un ralentissement des mouvements associé à une perte de leur finesse. Des troubles oculomoteurs et une impersistance motrice ont depuis été décrits (Walker 2007).

Les symptômes moteurs apparaissent de façon progressive au cours de la phase symptomatique de la maladie. Dans les stades précoces, les patients présentent bradykinésie et dystonie ; ces dernières correspondent à une perte de coordination, des mouvements

involontaires, des spasmes et à l'apparition d'une rigidité musculaire. Les patients présentent des problèmes d'équilibre et souffrent de chutes à répétition.

Le stade intermédiaire est décrit par l'aggravation des symptômes déjà présents et par l'émergence de nouveaux troubles tels que la chorée et l'akinésie. Ces troubles sont accompagnés d'une altération de la dextérité, de la déglutition et de la parole.

Le stade tardif est caractérisé par l'aggravation sévère des symptômes précédents ce qui est fortement invalidant pour les patients. Le caractère progressivement invalidant des troubles moteurs est associé à des difficultés à s'alimenter chez les patients conduisant à une perte de poids croissante.

Si la progression des troubles moteurs n'est pas une cause directe de mortalité chez les patients, les troubles de la déglutition entraînent des complications majeures, notamment à cause des « fausses routes » lors de l'ingestion d'aliments, conduisant à des infections pulmonaires sévères et à la mort.

2.3. Les symptômes cognitifs

Les troubles cognitifs débutent discrètement lors de la phase asymptomatique qui précède l'apparition des symptômes moteurs chez une partie des patients. Ces symptômes cognitifs passent souvent inaperçus à cause du manque d'outils de mesures standardisées. Cependant, selon l'échelle MCI (pour « *Mild Cognitive Impairment* »), on estime que 40% des patients pré-symptomatiques présentent des troubles cognitifs (Paulsen, 2011). Ces troubles s'aggravent progressivement et aboutissent, au stade le plus avancé de la maladie, à une démence dite « sous-corticale ». Cette démence implique des zones spécifiques du cerveau (substance blanche, ganglions de la base, thalamus et hypothalamus) et met également en cause les connections entre les régions corticales et les noyaux gris centraux (Montoya 2006). Cette démence, très progressive, apparait essentiellement sous la forme d'un ralentissement de la pensée, de troubles de la mémoire et de l'attention (principalement des fonctions exécutives impliquées dans la réalisation des tâches complexes). Des troubles impliquant la cognition visuelle tels que la discrimination faciale, la perception visuo-spatiale et la mémoire visuelle ont par ailleurs été décrits chez les porteurs de la mutation non symptomatiques et pendant les phases précoces de la maladie (Jason 1988; Gomez-Tortosa 1996; Wolf 2014; Labuschagne 2016).

2.4. Les symptômes psychiatriques

Les troubles psychiatriques constituent la part la plus versatile des symptômes chez les patients atteints de la MH. Ces troubles incluent, entre autres, la dépression, l'irritabilité, l'apathie, des troubles obsessionnels, la paranoïa, la psychose et la persévération.

La prévalence des troubles psychiatriques est estimée entre 33 et 76% (van Duijn 2007). La variabilité des estimations s'explique par la diversité des outils d'analyse de ces troubles dans les différentes études. De façon générale, l'apparition de ces troubles et leur intensité est considérablement variable entre les patients ce qui s'explique très certainement par les facteurs de prédispositions génétiques mais aussi par des facteurs environnementaux.

Une étude longitudinale réalisée sur une cohorte de 2440 individus durant 10 ans montre que les patients pré-symptomatiques présentent 19 des 24 troubles psychiatriques testés. Cette étude a aussi montré que la sévérité des troubles augmente progressivement à l'approche de la phase symptomatique. Les troubles psychiatriques sont donc présents bien avant l'apparition des symptômes moteurs (Epping 2016).

La dépression constitue le trouble psychiatrique le plus fréquent. La dépression est observée chez les patients prodromaux et dans les phases précoces de la maladie Sa fréquence oscille entre 33 et 69% en fonction des paramètres utilisés pour l'observer (van Duijn 2007). Elle se caractérise par l'observation des troubles de l'humeur, la perte d'intérêt, perte et gain de poids, la culpabilité, perte de concentration et les tentatives de suicide (Epping 2011). De façon intéressante, elle touche aussi bien le patient que sa famille. En effet, les individus non porteurs de la mutation proche d'un patient montrent une sensibilité accrue à la dépression. Différentes études se sont intéressées à l'impact de la maladie sur l'environnement familial. Dans les faits, les profondes modifications du quotidien des patients, en lien avec la progression des symptômes, favorisent considérablement les comportements dépressifs (Bates 2015). Cependant, les porteurs de la mutation exhibent une prévalence encore plus élevée (Julien 2007).

2.5. Prévalence

La MH est une maladie rare comptant environ 6 000 patients en France. Les études incluant les paramètres génétiques et cliniques estiment la prévalence de la maladie de Huntington à 10,6-13,7 individus pour 100 000 personnes, soit 1 pour 7 300 dans la population occidentale (Fisher et Hayden 2014) (Figure 4).

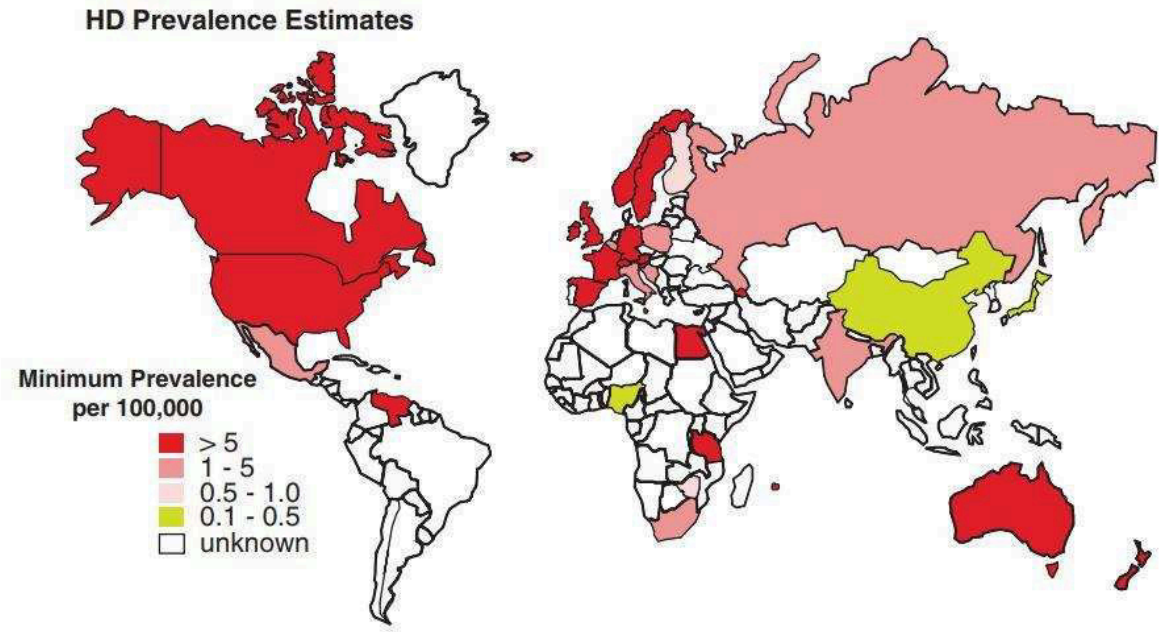


***Figure 4** : Prévalence de la maladie de Huntington et sa distribution dans le monde (Warby 2011).*

Si la MH est considérée comme endémique à toutes les populations, elle montre une fréquence plus élevée dans les populations caucasiennes ayant des ancêtres européens. Au Japon, à Hong Kong et Taïwan, la prévalence de diagnostic est seulement de 1 à 7 pour 100 000, soit 10 fois moins qu'en Europe. En Afrique du Sud, les descendants de colons blancs ont une prévalence plus élevée que les individus noirs et métissés (Hayden 1980). Le même effet est observé au Canada où les descendants directs de colons ont une fréquence de diagnostic de 17,2 pour 100 000, tandis que les descendants de populations précoloniales ne présentent qu'une fréquence de 2 pour 100 000 (Fisher et Hayden 2014). Enfin, il existe des isolats ethniques présentant une fréquence élevée en Tasmanie et au Maracaibo au Venezuela où une centaine d'individus porteurs ont pu être reliés à un individu fondateur (Wexler 2004).

3. La neurodégénérescence

La caractéristique histologique principale des patients atteints par la maladie de Huntington est une neurodégénérescence sévère du striatum et du cortex cérébral, associée à un élargissement des ventricules cérébraux. La neurodégénérescence est si massive que les patients peuvent perdre jusqu'à 25% du poids cérébral dans les stades les plus avancés (Vonsattel & DiFiglia 1998). L'analyse morphométrique de coupe coronal a montré une perte de 50% du volume des structures atteintes (de la Monte 1988, Figure 5).

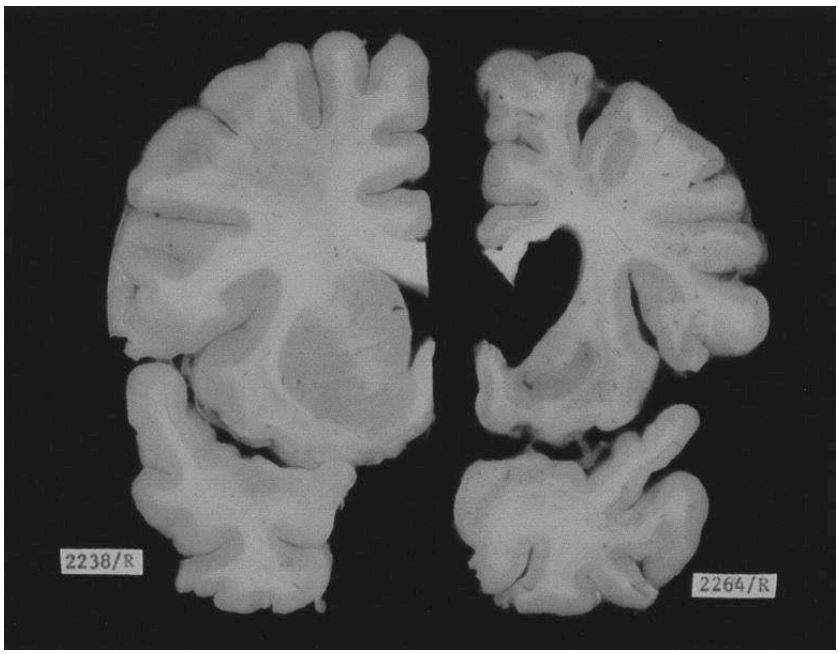


Figure 5 : Coupe coronal de cerveaux post-mortem d'un individu sain (gauche) et d'un patient MH (droite) (Alexi 2000).

3.1. Le striatum

Anatomie. Le striatum fait partie des ganglions de la base et se compose du Noyau Caudé et du Putamen. Le striatum est composé majoritairement de neurones épineux moyens (MSN). qui sont les premiers neurones à dégénérer dans la MH (Cepeda 2007). Ces neurones inhibiteurs relarguent de l'acide γ-amino butyrique (GABA) au niveau de leurs synapses terminales. Ils ont de longs axones, un corps cellulaire de taille moyenne et des dendrites spinifères (Kemp et Powell 1971).

Voie directe et indirecte : On considère deux types de MSNs en fonction de l'expression à la membrane des récepteurs à la dopamine D1 ou D2. Et dans les voies de régulation dans lesquelles ils sont impliqués (vois directe et indirecte)

Les MSNs de la voie directe expriment le récepteur D1 (MSN de type-D1) tandis que les MSNs de la voie indirecte sont du type-D2. Il existe une sous population minoritaire exprimant à la fois les récepteurs D1 et D2. Au niveau de leur sensibilité aux neurotransmetteurs, les deux sous-types de MSNs D1 et D2 présentent des similitudes et des disparités. En effet, ils expriment tous deux les récepteurs au glutamate N-methyl-D-aspartate récepteur (NDMA-R) et amino-hydroxyl-methylisoazol-propionate récepteur (AMPA-R), les récepteurs cholinergiques muscariniques (M1 et M4) et le récepteur au cannabinoïde CB1. En revanche, seuls les MSNs de type-D1 expriment le récepteur à l'adénosine A1 et aux peptides dynorphine et substance P. Les MSNs de type-D2 expriment quant à eux le récepteur à l'adénosine A2A et à l'enképhaline (Cepeda 2007).

La voie directe, qui implique les MSNs de type-D1, aboutit à l'excitation du thalamus, sa cible terminale et promeut les comportements associatifs ainsi que l'initiation du mouvement. Cette voie directe implique la stimulation du striatum par le cortex. La stimulation des MSNs de type-D1 du striatum permet d'inhiber les neurones du globus pallidus interne (GPi). Les neurones du GPi, alors inactifs, ne peuvent plus exercer leur action inhibitrice sur le thalamus. Les neurones thalamiques sont par conséquent actifs et peuvent stimuler en retour les neurones du cortex cérébral et renforcer l'excitation de ces derniers.

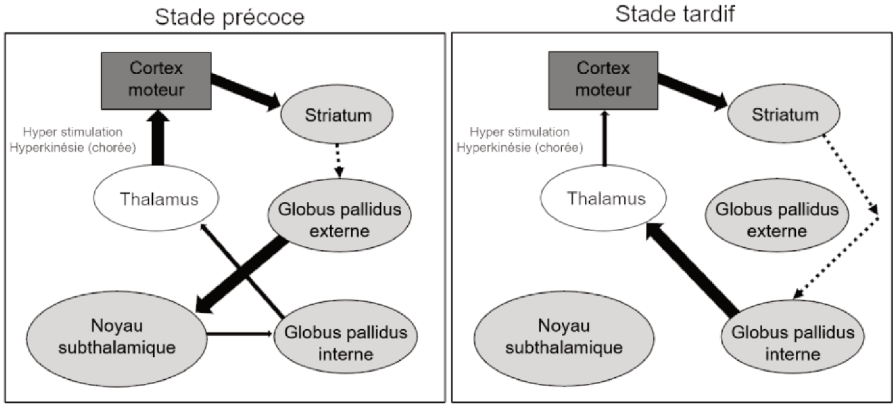


Figure 6 : Voies directe et indirecte dans le contexte de la maladie de Huntington.

La voie indirecte, qui implique les MSNs de type-D2, renforce l'inhibition des comportements associatifs et elle permet de ne pas exécuter de mouvements involontaires. Pour cela, elle maintient l'inhibition du thalamus, empêchant ainsi une sur-stimulation du cortex cérébral. Pour se faire, le striatum inhibe le globus pallidus externe (GPe) qui lui-même inhibe le noyau sub-

thalamique. Cela permet d'activer les neurones excitateurs sub-thalamiques, qui projettent sur le GPi et le stimulent. Le GPi est alors actif et maintient l'inhibition du thalamus ce qui réduit l'excitation du cortex générée par le thalamus (Figure 6).

En condition pathologique : Les MSNs sont les neurones les plus sensibles à la neurodégénérescence. Les MSNs de type-D2 de la voie indirecte dégénèrent en premier ce qui conduit à une augmentation de l'activation de la voie thalamo-corticale et une augmentation des mouvements involontaires (Sieradzan & Mann 2001). Par la suite, les MSNs de type-D1 de la voie directe sont affectés induisant l'hypokinésie observée aux stades avancés de la maladie. (Reiner 1988; Albin 1992; Richfield 1995; Berardelli 1999; Vonsattel 1985).

3.2. Le cortex cérébral

Nous aborderons plus en détail la description du cortex cérébral dans le chapitre 3.

Bien que le striatum soit la région où l'atrophie est la plus marquée, le cortex cérébral, structure du système nerveux central impliquée, entre autres, dans les fonctions cognitives supérieures, est également atteint au cours de la MH. (Rosas 2002; Aylward 2007). Le cortex permet l'élaboration de réponses adaptées à l'environnement et est particulièrement développé chez l'être humain. Décrire les différents types de cortex. Il est doté d'une organisation histologique très élaborée en 6 couches de neurones numérotées de I à VI. Les neurones qui composent le cortex cérébral sont à 80% glutamatergiques, et selon leur couche d'appartenance et leur identité moléculaire projettent leurs axones dans des structures corticales ou sous-corticales (Molyneaux 2007). De nombreuses régions du cortex cérébral, plus précisément le gyrus cingulaire et les cortex frontal, moteur, temporal et occipital, dégénèrent dans la MH (Cudkowicz et Kowall 1990; Macdonald 1997; Macdonald et Halliday 2002; Thu 2010). A l'échelle cellulaire, la neurodégénérescence touche principalement les neurones des couches III, V et VI (Hedreen 1991; Thu 2010; Rosas 2008). De façon intéressante, les neurones de la couche VA, dans lesquels l'expression de la Huntingtine est enrichie (Fusco 1999), sont impliqués dans la voie cortico-striatale, autrement dit dans des connexions directes avec les neurones du striatum, qui lui aussi dégénère massivement. Renforçant hypothèse de l'origine corticale de la dégénérescence striatale. En parallèle, les couches III et VI, également affectées par la dégénérescence.

Si la neurodégénérescence corticale est présente dans toutes les aires du cortex cérébral, elle n'est pas uniforme (Thu 2010). Dans cette étude, Thu et collaborateurs montrent que les cortex moteur primaire et cingulaire antérieur subissent 27% et 34% de perte neuronale, respectivement. De plus, cette même étude a mis en évidence un lien de causalité entre le degré de neurodégénérescence de ces régions et l'apparition de symptômes moteurs et de troubles de l'humeur chez les patients atteints de la MH (Thu 2010). Enfin, différentes études

utilisant l'imagerie à résonnance magnétique et des approches histologiques ont soutenu que le cortex cérébral ne dégénérait pas de manière homogène lors de la maladie. En effet, l'amincissement cortical dû à la neurodégénérescence, semble débuter dans le lobe occipital, région qui contient les aires visuelles (Rosas 2002; Rosas 2008; Rüb 2015). Ceci pourrait notamment être une cause des troubles cognitifs visuels (Jason 1988; Gomez-Tortosa 1996; Wolf 2014; Labuschagne 2016).

En plus du striatum et du cortex, d'autres structures cérébrales sont sujettes à la neurodégénérescence comme l'hippocampe, le thalamus, le cervelet, l'hypothalamus et l'amygdale (Kassubek 2005; Vonsattel 1985). L'atrophie de l'hippocampe apparaît au stade tardif de la maladie avec une réduction de son volume variable selon les études de 9% à 20% (de la Monte 1988; Rosas 2003) et s'associes aux symptômes cognitifs (mémoire) et psychiatriques (troubles de l'humeur et dépréssion). Contrairement à l'hippocampe, la neurodégénérescence cérébelleuse est précoce (Rub 2013). Cependant, on connaît peu le rôle de cette structure dans la MH.

4. Le gène de la Huntingtine et sa mutation pathologique

Cent ans se sont écoulés entre la première description de la maladie par Georges Huntington en 1872 et la découverte du gène responsable de la maladie en 1993.

4.1. Identification du gène de la Huntingtine (HTT)

Ce sont à la fois le caractère héréditaire de la MH et les progrès de la génétique moléculaire qui ont permis d'identifier le gène muté à l'origine de cette maladie. Cette découverte a été faite dans la population vénézuélienne du lac Maracaibo où vit une large population de patients. Les analyses par recombinaison chromosomique ont permis d'établir que la mutation est contenue dans le chromosome 4 et plus précisément sur le bras court au locus 4p16.3 (Gusella 1983). Dix années supplémentaires furent nécessaires pour qu'un groupe de recherche collaborative (The Huntington's Disease Collaborative Research Group 1993) identifie le gène responsable de la maladie. Il est dans un premier temps appelé IT15 *(*pour *interesting transcript 15*) et sera par la suite renommé HTT comme le nom de la protéine qu'il code. Le gène de la HTT est composé de 67 exons répartis sur 180kb. Dans l'exon 1 se trouve une répétition polymorphique du triplet Cytosine-Adénosine-Guanine (CAG) codant pour une glutamine. Dans la MH, il est observé une expansion de polyglutamines (polyQ) anormale conduisant à une forme mutante de la HTT (mHTT).

4.2. La mutation de la Huntingtine

La mutation de la HTT réside donc dans la répétition anormale d'un triplet CAG qui est par nature polymorphique. Ce polymorphisme est hautement instable dans la population humaine et tout particulièrement chez les européens (Bates 2015). Le polymorphisme présente une distribution gaussienne dans la population saine allant de 7 à 35 répétitions, avec un mode à 17 répétitions. Les individus ayant entre 27 et 35 répétitions ne développent pas la maladie mais ont un risque plus élevé de transmettre la maladie à la descendance. Entre 36 et 39 répétitions, les individus ont une pénétrance réduite : L'apparition de la maladie n'est pas systématique et lorsqu'elle se développe, l'apparition des symptômes est plus tardive. A partir de 40 répétitions la pénétrance est totale et provoque systématiquement la MH (McNeil 1997; Rubinsztein 1996; Bates 2015) (Figure 7).

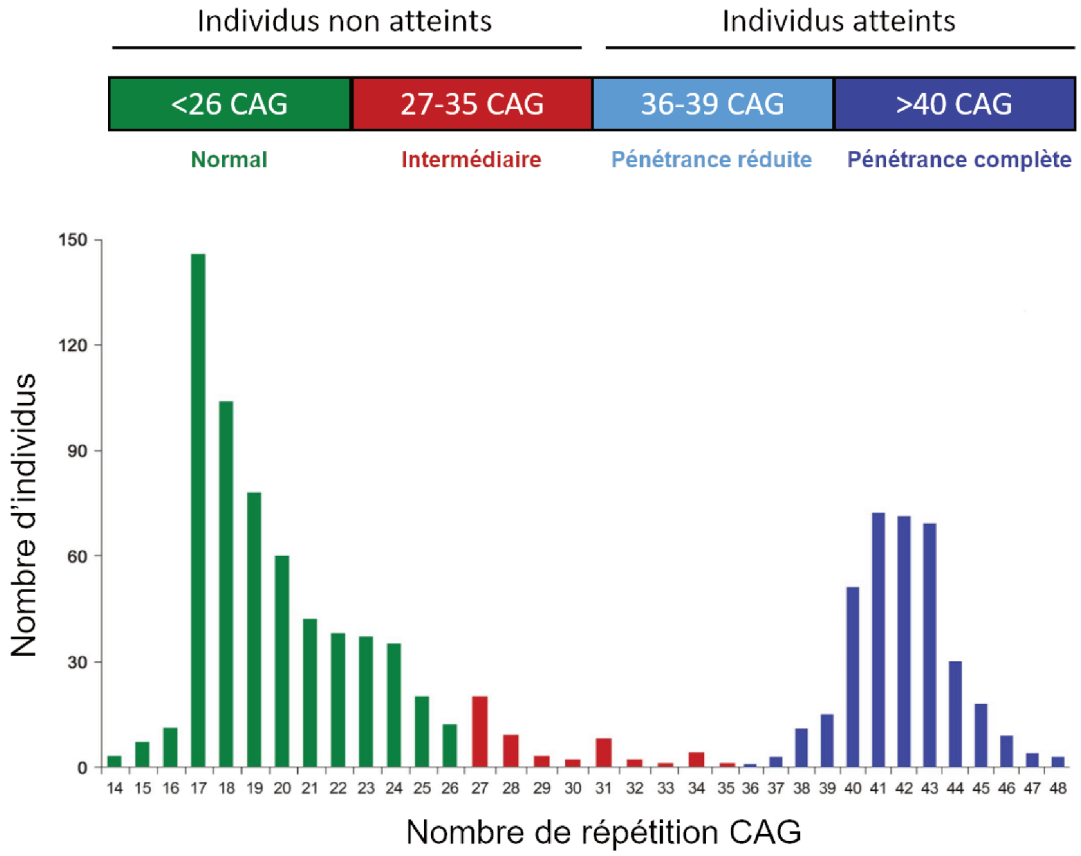


***Figure 7* : Maladie de Huntington pénétrance de la répétition CAG et distribution dans la population (adapté de Killoran 2013).**

Les répétitions de CAG sont très instables ; la répétition a tendance à s'allonger dans la descendance, en particulier dans le cas de transmission paternelle. Ce phénomène est qualifié d'anticipation paternelle (Ranen 1995).

Il existe une corrélation inverse entre l'âge d'apparition des symptômes et la longueur du polymorphisme (Andrew 1993) (Figure 8). Les répétitions CAG extrêmement longues,

supérieures à 60, conduisent à l'apparition de forme juvénile de la MH. Cette forme particulière de la maladie tend aujourd'hui à être considérée comme une maladie à part entière. En effet, ces patients développent des symptômes moteurs pendant l'enfance et l'adolescence et la progression de la maladie est plus rapide. De plus, ils subissent des crises d'épilepsie inhérente à la forme juvénile (Quigley, 2017). Si l'âge d'apparition des symptômes est bien corrélé avec la longueur du CAG, cette observation est en pratique moins facile à observer chez les patients ayant de courtes répétitions pathogéniques. Ceci suggère un effet environnemental qui pourrait modifier l'âge d'apparition ainsi que la sévérité des symptômes (Chao 2018).

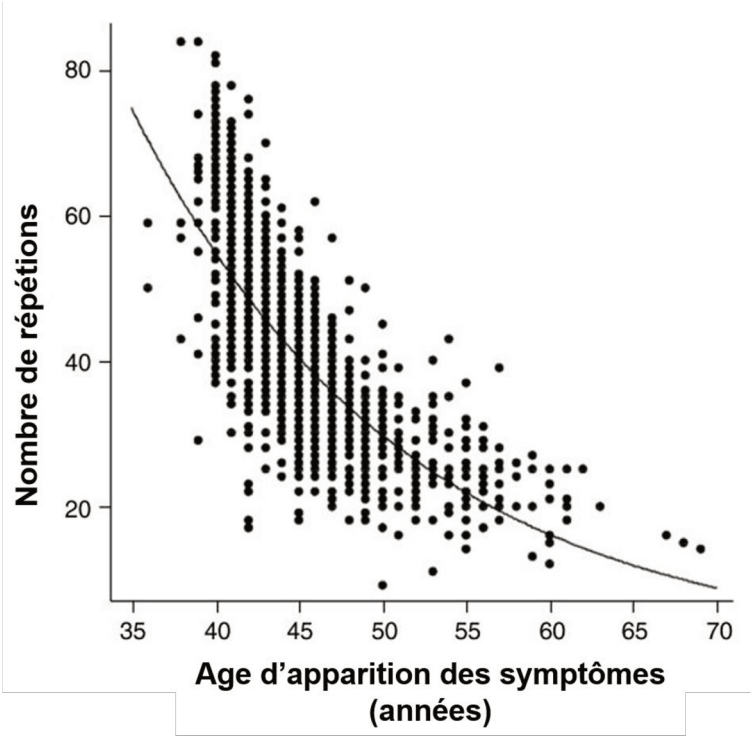


Figure 8 : Corrélation inverse entre l'âge d'apparition des symptômes et la longueur de la répétition (adapté de Gusella et MacDonald 2009)

La répétition est trouvée chez l'humain essentiellement à l'état hétérozygote signifiant que les malades ne portent qu'une seule copie de la *HTT* mutée. Cependant, quelques rares cas d'individus porteurs de la mutation à l'état homozygote ont été observés près du lac Maracaibo. Ces cas ne présentent pas de différences significatives quant à l'âge d'apparition des symptômes. Néanmoins, la progression de la maladie pourrait être accélérée (Lee 2012).

CHAPITRE 2 : LA HUNTINGTINE

1. Généralités

Très conservée de la drosophile jusqu'aux mammifères, elle est exprimée dans toutes les cellules du corps humain, mais son niveau d'expression varie en fonction des types cellulaires (Marques Sousa et Humbert 2013). Elle est fortement exprimée dans le cerveau mais également dans de nombreux autres tissus non neuronaux comme les testicules, les glandes mammaires, le placenta, le pancréas, le foie, le colon, les poumons et les muscles. Au sein même de ces tissus, l'expression de la HTT est mosaïque, avec un niveau plus élevé dans les cellules épithéliales que dans les cellules mésenchymateuse (Moreira Sousa et al. 2013).

La HTT est une grosse protéine soluble essentielle au fonctionnement des cellules. Elle est présente principalement dans le cytoplasme mais a la capacité d'entrer et de sortir du noyau (Kegel 2002). La HTT est associée à plusieurs organelles du noyau, réticulum endoplasmique et structures golgiennes (Hilditch-Maguire 2000; Hoffner 2002) jusqu'aux mitochondries et aux membranes (Panov 2002).

Elle est composée de 3144 acides aminés et a un poids moléculaire de 348 kDa. La répétition de CAG du gène *HTT* se situe en 5' de la région codante et se traduit par une expansion de glutamines (poly-Q) qui débute au 18ème acide aminé dans la région N-terminale (N-ter) de la protéine. Dans la HTT normale, cette expansion est en moyenne composée de 23 répétitions (Q^{23}). Si l'expansion Poly-Q normale n'a pas de fonction connue à ce jour, elle pourrait moduler la conformation tridimensionnelle de la protéine. Cette hypothèse est actuellement le sujet d'études.

2. Transcription du gène de la HTT

La transcription du gène de la HTT est un processus qui pour l'heure reste peu connu. Au cours des étapes de transcription, plusieurs isoformes d'acides ribonucléique messager (ARNm) peuvent être synthétisés et ce, grâce aux processus de polyadénylation différentielle du transcrit ainsi que de son épissage alternatif du transcrit.

2.1. Polyadénylation différentielle du transcrit

Le gène de la *HTT* est transcrit par l'ARN polymérase II : les ARNm naissants sont clivés et polyadénylés (PolyA) à trois sites différents dans la séquence 3' non traduite (3'UTR) ce qui génère trois ARNm. Le premier est un variant long d'une longueur de 13,7kb, le second un variant intermédiaire d'une longueur de 12,5kb et enfin le dernier,le plus court avec une longueur de 10,3kb (Romo 2017). Dans la cellule, les isoformes se localisent différemment, les variants court et long sont plus présents dans le noyau, tandis que l'intermédiaire est majoritairement dans le cytoplasme. Il est à noter que l'isoforme court a la plus longue durée de vie, en lien avec un PolyA plus long (Romo 2018). Ces différents types de polyadénylation

permettent une régulation fine de l'expression de la HTT dite « canonique » et il est intéressant de noter que ce processus est affecté par la MH.

A titre d'exemple, dans le cortex moteur humain, le variant long est représenté à 93%, l'intermédiaire à 1% et le court à 6%. En condition pathologique, les proportions sont modifiées : le fragment long n'est représenté qu'à 88%, l'intermédiaire à 3% et le court à 9%. Ces modifications des proportions en condition pathologique peuvent varier en fonction du tissu (Romo 2017; Romo 2018).

Dans le contexte de la MH, l'expression du fragment court est accrue dans le cortex et le striatum. Son rôle toxique en fait une cible de choix pour les thérapies visant à réduire l'expression de mHTT en ciblant les ARNm (Romo 2017).

2.2. *Epissage alternatif*

Les ARNm peuvent subir des modifications dîtes d'épissage au cours desquels les séquences introniques sont éliminées et les exons sont mis bout à bout en prévision de la traduction. Il existe des phénomènes d'épissage alternatif, par lesquels des exons peuvent également être éliminés : ceci permet de former des séquences protéiques différentes. Cet épissage alternatif est concomitant à polyadénylation.

Le gène de la HTT est constitué de 67 exons. Il peut être épissé de façon canonique et contenir tous les exons. Il peut aussi être épissé de façon alternative dans le but d'éliminer les exons 28 ou 29, d'éliminer les exons 34 à 44 ou afin de retenir la 28ème séquence intronique. Cependant, si l'existence de ces variants est avérée, leur traduction n'a pu être démontrée à ce jour (Romo 2018). L'ARNm de la HTT peut être différemment épissé en condition pathologique. Il a été montré que dans un modèle de la MH, le variant où l'exon 29 est éliminé subit une diminution drastique de 20% suggérant un rôle de ce dernier dans le processus physiopathologique (Hughes 2014). De plus, il existe un variant particulier dû à l'affinité accru du facteur d'épissage SRSF6 pour les expansions CAG présentes dans les ARNm codant la HTT mutante. Cette hyper-affinité conduit à la formation d'un ARNm tronqué composé de l'exon 1 et de l'intron 1. La production d'ARNm tronqué a été observée *in vitro*, sur tissus de patients *post-mortem* (Neueder 2017) et dans des modèles murins de la maladie (Gipson 2013; Sathasivam 2013). Il est associé à la production d'une protéine tronquée pathogène qui sera associée à de l'agrégation et à une toxicité accrue. Plus récemment, il a été proposé que la régulation de ce mécanisme d'épissage impliquait le facteur d'épissage SRSF6 pouvant servir de levier thérapeutique afin de limiter la production de fragment pathogène (Neueder 2018).

3. Structure de la Huntingtine

La structure de la HTT s'organise de façon linéaire en une série de domaines organisés et séparés par des séquences désorganisées (Figure 9). Les 17 premiers acides aminés constituent le fragment N-terminal (N-ter), très conservé chez les vertébrés (Tartari 2008). Ce fragment N-ter est composé d'une hélice alpha (α-hélice) hydrophobe permettant sa rétention dans le réticulum endoplasmique (Atwal 2007).

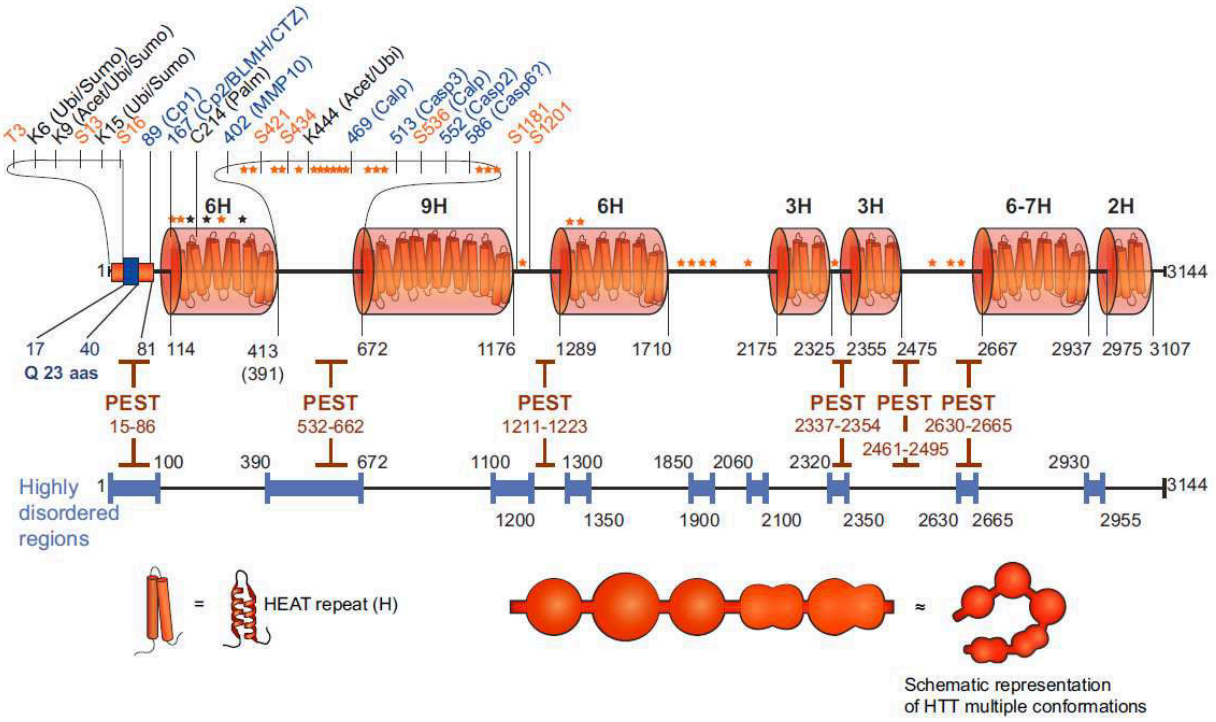


***Figure 9* : Structure de la HTT humaine.**
Les acides aminés en orange correspondent aux sites de phosphorylation identifiés par spectrométrie de masse et confirmés par différentes approches expérimentales. Les acides aminés en noir indiquent d'autres modifications que la phosphorylation et en bleu les différents sites de clivages connus. Les nombres annotés sur la structure linéaire correspondent aux limites des différents domaines (HEAT, PEST et région hautement désorganisée). Les régions fortement désorganisées ont été identifiées par prédiction des logiciels PONDR, DisEMBL et NORSp. (Ubi, Ubiquitine ; Sumo, Sumoyl ; Acet, Acetyl ; Palm, Pamitoyl ; MMP10, metalloprotéase 10 ; Calp, Capain ; Casp3/2/6, Caspase 3/2/6) (Saudou & Humbert 2015).

Il contient aussi une séquence d'export nucléaire (NES pour "*Nuclear Export Signal*"). Ce fragment est suivi par l'expansion PolyQ suivie par une région riche en proline (PRD pour "*Proline Rich Domain*") présente exclusivement chez les mammifères, suggérant ainsi une apparition récente dans l'évolution (Tartari 2008). Ce domaine est important pour les interactions de la HTT avec d'autres protéines, notamment avec les domaines Src Homology 3 (SH3) (Harjes et Wanker 2003; Neveklovska 2012).

La suite de la protéine est moins bien connue, principalement car l'exon1 contenant la mutation a retenu l'attention des recherches. Entre les acides aminés 69 et 3144, la séquence protéique comporte une alternance linéaire de domaines hautement organisés et désorganisés. On observe la présence de nombreuses répétitions HEAT (Huntingtine Facteur d'élongation eucaryote 3 Protéine phosphatase A et TOR1, en référence aux 4 protéines connues portant ce domaine). Les répétitions HEAT sont des structures formées de 2 α-hélices liées entre elles. Elles permettent l'apparition de solénoïde-α, structure courante dans les protéines du cytosol. La HTT comporte 36 répétitions HEAT (Palidwor 2009; Tartari 2008) qui s'agencent en 7 domaines HEAT. Ces répétitions HEAT de la HTT permettent des interactions inter et intramoléculaires. Ainsi, le domaine HEAT (507-1230) peut interagir avec le fragment N-ter (1-506) et le fragment C-ter (2721-3144) (Palidwor 2009). Ces arrangements ont notamment été identifiés comme participant à la conformation solénoïdale adoptée par la HTT entre les régions HEAT C-ter et N-ter favorisant l'interaction entre la HTT et HAP-40 (pour *Huntingtin Associated Protein*) (Guo 2018). Ces observations suggèrent que, grâce à ces interactions intramoléculaires, la HTT peut adopter de nombreuses conformations tridimensionnelles. Ainsi, plus de 100 structures tridimensionnelles différentes de la HTT ont été observées (Seong 2010). La possibilité d'adopter tant de conformations différentes rend la HTT capable d'interagir avec un grand nombre de protéines et d'agir comme une protéine d'échafaudage pour la formation de complexes. De plus, l'étude de variants mutants a montré que les caractéristiques structurales de la HTT sont modifiées par l'expansion polyQ ce qui peut conférer ainsi à la HTT mutée de nouvelles propriétés et/ou modifier ses propriétés normales (Vijayvargia 2016).

4. Modifications de la protéine

La HTT est la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles qui régulent son activité, son clivage et sa toxicité lorsqu'elle est mutée. L'étude de ces modifications constitue une approche pour comprendre les fonctions de la HTT normale et les conséquences de sa mutation.

4.1. Ubiquitination et Sumoylation

La HTT peut être ubiquitinée ou sumoylée par formation de liaison covalente avec une ou plusieurs protéines Ubiquitine (Ub) ou SUMO-1 (pour *small ubquitine-like modifier*) sur les résidus Lysine (K). Ces modifications ont surtout été identifiées sur les fragments N-ter de la HTT. On dénombre trois sites d'ubiquitination sur les sites K6, K9 et K15. L'ubiquitination de la HTT se fait par l'Ubiquitine Ligase E2-25K tandis que la sumoylation est opérée par la E3

Ligase (Kalchman 1996; Okamoto 2009; Subramaniam 2009). L'ajout de résidus Ub à la HTT permet son adressage vers le protéasome où elle est dégradée ce qui favorise la survie neuronale (Steffan 2004). Cependant, cette dégradation de la HTT mutée est altérée en condition pathologique conduisant à la production de signaux pro-apoptotiques et ainsi à la neurodégénérescence (Jana 2001). La HTT sumoylée est quant à elle plus stable réduisant l'agrégation de fragments N-ter. Cependant la sumoylation favorise l'internalisation de la HTT dans le noyau et accroît la neurodégénérescence (Steffan 2004).

4.2. Palmitoylation

La palmitoylation permet l'accrochage d'un acide palmitique (acide gras) à une Cystéine (C) ou moins fréquemment à une Sérine (S) ou Thréonine (T). La HTT peut subir cette modification notamment sur le résidu C214 par la protéine HIP14 (Huntingtin Interacting Protein 14) (Yanai 2006). De plus, la HTT module l'activité de la HIP14 dans les tissus neuraux (Huang 2011). Sans que cela ait été démontré, il est possible que la palmitoylation de la HTT permette de réguler son activité dans le transport vésiculaire. En effet, la palmytoylation est connue pour favoriser l'assemblage de complexes protéiques impliqués dans le transport vésiculaire. La HTT mutée est moins palmitoylée. De plus, l'inactivation de la protéine HIP14 qui permet la palmitoylation de la HTT reproduit des caractéristiques de la MH tels que l'atrophie striatale et des défauts moteurs chez la souris (Sanders et Hayden 2015).

4.3. Acétylation

La HTT peut aussi être acétylée sur la Lysine 444 par la HDAC (pour *Histone Deacetylase*). L'acétylation de la HTT induit sa dégradation par un processus d'autophagie. L'autophagie de la HTT aurait un effet neuroprotecteur en limitant les phénomènes d'agrégation et réduisant la toxicité de la protéine mutée (Jeong 2009).

4.4. Phoshorylation

La phosphorylation de la HTT est la modification post-traductionnelle qui a été à ce jour la plus étudiée. La phosphorylation est l'addition d'un résidu phosphate sur une Sérine ou Thréonine par l'activité d'une protéine Kinase. Ainsi, de nombreux sites de phosphorylation de la HTT (T3, S13, S16, S421, S434, S1181 et S1201) ainsi que certaines kinases ont été identifiés (AKT pour *Serine/Threonine Kinase*, GSK3 pour *Glycogen Synthase Kinase 3* et CDK5 pour *Cyclin Dependant Kinase*). Ces phosphorylations de la HTT permettent la régulation de ses fonctions dans différents processus cellulaires (Saudou et Humbert 2016). Ainsi, la S421 est la cible de la kinase AKT : Cette phosphorylation régule la toxicité de la protéine mutante (Humbert 2002). Cette même phosphorylation a aussi un rôle clé dans le transport vésiculaire. En effet, alors que la HTT mutée a perdu ses capacités de transport du facteur neurotrophique

BDNF (pour *Brain-Derived Neurotrophic Factor)*, la HTT mutée, lorsque phosphorylée en S421, retrouve sa fonctionnalité dans le transport du BDNF, ce qui favorise la survie neuronale (Zala 2008) (voir paragraphe dynamique et transport cellulaire).

Les S1181 et S1201 sont phosphorylées par la kinase CDK5 (Anne 2007). Ces phosphorylations ont un effet neuroprotecteur lorsqu'elles sont présentes sur la protéine mutée. De plus, la non phosphorylation de ces sites sur la HTT sauvage diminue l'anxiété et augmente la neurogenèse adulte hippocampique dans les modèles murins (Ben M'Barek 2013).

5. Les rôles de la Huntingtine

L'expression ubiquitaire de la HTT, sa localisation dans plusieurs compartiments subcellulaires, sa capacité à interagir avec de nombreuses protéines (Shirasaki 2012) et à adopter de multiples conformations suggèrent que la HTT est impliquée dans de nombreux processus cellulaires. En effet, La HTT est considérée comme une protéine d'échafaudage capable d'interagir avec de nombreux partenaires dans différents processus cellulaires : la transcription, le trafic cellulaire, l'endocytose, la survie et le métabolisme. .

5.1. La transcription

Bien que la HTT soit cytosolique, elle est capable de transloquer au et plusieurs de ces intéracteurs sont des facteurs de transcription. De nombreuses dérégulations transcriptionnelles ont été observées dans des cerveaux de patients post-mortem et dans différents modèles murin de la MH (Luthi-Carter 2000; Luthi-Carter 2002; Valor 2014). La HTT est impliquée dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes par sa capacité à établir des interactions avec de nombreux facteurs de transcription (Saudou et Humbert 2016). Ces facteurs incluent la protéine CREB (pour *cAMP-reponse element binding protein*) (Steffan 2000), le facteur NeuroD impliqué dans la différentiation neuronale (Marcora 2003) et le facteur de suppression de tumeur p53 (Steffan 2000). La HTT est par ailleurs un activateur de la transcription des gènes régulés par NRSF (pour *Neuron Restrictive Silencer Factor*), qui sont fortement impliqués dans le développement et la survie neuronale (Zuccato 2003). Le meilleur exemple étant le BDNF, dont la HTT sauvage promeut l'expression tandis qu'une réduction est observée dans les modèles de la MH (Zuccato 2001). Enfin, la HTT contribue au remodelage de la chromatine et a par conséquent un rôle dans la régulation de l'accessibilité à l'ADN (Seong 2010).

5.2. Dynamique intracellulaire

La HTT est impliquée dans l'endocytose, le trafic des endosomes, ainsi que dans le trafic et le recyclage vésiculaires. Ainsi, la HTT interagit avec les protéines HIP1 (pour *Huntintgtin*

Interacting Protein) et HIP12, toutes deux connues pour leur implication dans l'initiation de l'endocytose dépendante de la clathrine, qui permet l'invagination de la membrane cellulaire par la formation d'un réseau de clathrine (Legendre-Guillemin 2002; Waelter 2001). La HTT est également capable d'interagir avec les extrémités N- et C-terminales de la dynamine-1, protéine clé de la formation d'endosomes (El-Daher 2015). La HTT interagit avec la protéine GTPase Rab11, qui participe au recyclage des vésicules endocytées (Li 2008). Cette interaction est d'ailleurs un facteur déterminant de la polarité apico-basale des cellules épithéliales (Elias 2015). Enfin, la HTT est aussi connue pour interagir avec Rab5 et Rab8 (Shirazaki 2010) qui sont respectivement impliqués dans le trafic des endosomes précoces (Pal 2006) et du réseau trans-golgien (Faber 1998).

La HTT régule également le trafic vésiculaire. En effet, la HTT interagit avec la dynéine, moteur moléculaire antérograde, par la formation d'un complexe avec HAP1 (pour *Huntingtin-Associated Protein*), la dynactine et la kinésine KIF5C (Gauthier 2004; Caviston 2007; Twelvetrees 2010). Ainsi, la HTT augmente le transport antérograde de différentes organelles dans l'axone et les dendrites (Zala 2013; Virlogeux 2018), ainsi que de différents cargos tels que les protéines v-SNARE et VAMP7 (Colin 2008), le BDNF (Gauthier 2004) ou encore le récepteur au GABA (Twelvetrees 2010). Enfin, la phosphorylation S421 de la HTT permet de réguler l'orienter le transport vésiculaire en favorisant le transport rétrograde (Colin 2008).

Enfin, la HTT permet de maintenir un transport vésiculaire rapide en favorisant le maintien de la glycéraldéhyde 3-phosphate dehydrogénase (GAPDH) au plus près des moteurs moléculaires, permettant un apport local d'énergie qui alimente la machinerie de transport (Zala 2013). De plus, la HTT sert de support pour toutes les enzymes glycolytiques sur les vésicules et apport énergétique de la glycolyse suffisant pour le transport le long des microtubules (Hinckelmann 2016).

5.3. Division cellulaire

La HTT est exprimée dans les cellules pendant la division cellulaire et notamment pendant les phases de mitose dans des modèles neuronaux et non-neuronaux. De façon intéressante, elle est localisée au niveau des pôles du fuseau mitotique, sur les microtubules polaires et astraux. Pendant la mitose, la HTT facilite le recrutement de NUMA et LGN aux pôles du fuseau mitotique (Elias 2014; Godin 2010). Puis, elle facilite le transport d'un complexe dynéine/dynactine/NUMA/LGN vers le cortex cellulaire en périphérie de la cellule via son interaction avec la Kinésine-1. Ce complexe, une fois localisé au niveau du cortex cellulaire, génère des forces de traction sur les microtubules astraux et permet l'orientation du fuseau mitotique pendant la mitose (Elias 2014). La déplétion de HTT induit une mauvaise orientation de ce fuseau altérant le processus de différenciation des cellules filles générées notamment

lors de la division des cellules souches des glandes mammaires et au cours de la neurogenèse embryonnaire (Elias 2014; Godin 2010, Figure 10).

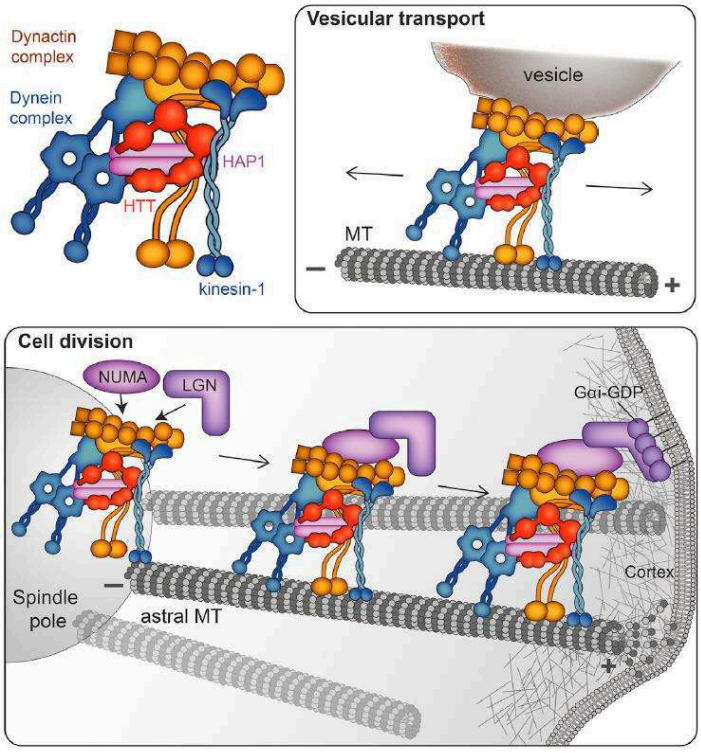


***Figure 10* : La HTT permet le recrutement de la dynéine et de la dynactine dans différents processus cellulaires.**
En haut : La HTT contrôle le transport des organelles de façon antérograde et rétrograde dans les dendrites et les axones des neurones. En bas : Pendant la mitose, la HTT est transportée au cortex cellulaire par la Kinésine où elle sert de protéine d'échafaudage pour le complexe dynéine/dynactine/NUMA/LGN dépendant de la kinésine (Saudou et Humbert 2016).

5.4. Survie cellulaire

L'expression de la HTT a un effet pro-survie pour les cellules en culture soumises à différents stress (Ho 2001; Leavitt 2006), tandis que sa déplétion induit une sensibilité à la mort cellulaire (Zhang 2006). Ces observations ont été confirmées *in vivo* par la surexpression de HTT sauvage dans des souris soumises à un stress excitotoxique ou à l'ischémie (Leavitt 2006 ; Zhang 2006). La neuroprotection procurée par la HTT est liée à son interaction avec les caspases 3 et 9 dont elle inhibe l'activation (Rigamonti 2001; Zhang 2006). Un autre mécanisme par lequel la HTT assure son effet neuroprotecteur est en lien avec le BDNF. En effet, la HTT régule aussi bien son expression (Zuccato 2001) que son transport axonal (Gauthier 2004). De plus, l'endocytose et le transport de TrkB (pour *Tropomyosin receptor*

kinase B), le récepteur du BDNF, dont l'intégrité est également nécessaire à la survie cellulaire, dépendent aussi de la HTT et du complexe qu'elle forme avec les moteurs moléculaires (Liot 2013).

5.5. Autophagie

La HTT joue un rôle clé dans la régulation de l'autophagie. L'autophagie est une voie essentielle contribuant à éliminer les protéines mal repliées, les agrégats protéiques et les organelles. La HTT est une protéine d'échafaudage permettant la formation du complexe spécifique de la macro-autophagie. Elle interagit avec p62 et facilite son association avec LC3 (récepteur de cargo pendant l'autophagie) et Ub-k63 (impliqué dans la formation et fusion des membranes). De ce fait, la HTT conduit les produits à éliminer vers l'autophagosome. De plus, la HTT favorise l'autophagie en se liant à ULK1, une kinase initiant l'autophagie (Rui 2015). Il existe plusieurs similarité entre la HTT et les protéines régulant l'autophagie dans la levure ce qui soutient l'hypothèse d'un rôle prépondérant de la HTT en tant que protéine assemblant le complexe d'autophagie (Ochaba 2014). Dans les neurones, l'autophagosome se forme en périphérie et doit être transporté vers le soma. La HTT avec son partenaire HAP1 favorise le transport axonal des autophagosomes (Wong & Holzbaur 2014). La suppression de l'expansion polyQ chez la souris conduit à une augmentation de l'autophagie et améliore la survie (Zheng 2010). De ce fait, le rôle de la HTT dans l'autophagie pourrait dépendre de l'expansion polyQ dont l'allongement contribuerait à modifier ses fonctions.

5.6. Ciliogenèse

La HTT est une protéine essentielle à la formation de cil primaire motile ou non. La HTT localisée à la base des cils primaires des neurones, des photorécepteurs ciliés et des cellules multi-ciliées (Haremaki 2015, Karam 2015, Keryer 2011). Elle est particulièrement abondante dans l'axonème, la structure centrale du cil primaire (Karam 2015). L'inactivation de la HTT chez la souris et dans le modèle xenope conduit à des défauts de formation du cil primaire et son atrophie (Haremaki 2015, Keryer 2011). Dans le modèle génétique murin *HdH*$^{Q111/Q111}$, l'effet inverse caractérisé par une hypertrophie ciliaire des cellules épendymaires a été observé (Keryer 2011). Dans le cil primaire, la HTT interagit avec HAP-1 et PCM1 (pour *pericentriolar material 1*) où elle permet le transport rétrograde de PCM1 (Haremaki 2015, Keryer 2011). Ce transport est assuré par la formation du complexe HAP-1/Dyneine/Dynactine (Keryer 2011). La localisation de la HTT à l'axonème serait notamment régulée par la phosphorylation du signal d'export nucléaire de sa région N-terminale (Maiuri 2013).

6. Conséquences de la mutation de la HTT : gain et perte de fonction

Comme précédemment énoncé, la HTT mutée arbore différentes conformations tridimensionnelles anormales qui altèrent ses fonctions normales et lui confèrent de nouvelles fonctions toxiques.

6.1. Clivage de la HTT

Bien que la HTT sauvage et mutante soit clivée par des protéases (Goldberg 1996), les conséquences du clivage de la HTT sauvage ne sont pas connues (Goffredo 2002). Cependant, il pourrait modifier l'activité de la HTT en inactivant certaines de ses fonctions. En effet, la protéolyse de la HTT induit des arrangements intramoléculaires de la protéine, ce qui augmente sa toxicité (El-Daher 2015). Il a été proposé qu'au niveau cytoplasmique, la génération de fragments C-ter altère l'activité de la Dynamin-1, ce qui interfère avec la dynamique du réticulum endoplasmique et l'autophagie (Martin 2014; El-Daher 2015).

Plusieurs protéases de la HTT sont désormais connues : il est en effet établi que les caspases 1, 3, 6 et 7, la calpaine, la cathépsine et la métalloprotéase MMP10 sont capables de cliver la HTT (Mende-Mueller 2001; Kim 2001; DiFiglia 2002; Gafni 2004; Gafni et Ellerby 2002; Hermel 2004). Cependant, certaines de ces protéases restent non identifiées.

Dans la pathologie, la HTT mutante est plus sujette à protéolyse, suggérant que l'activité des protéases est augmentée, ainsi que l'accessibilité du site de clivage de mHTT. Ce clivage est un phénomène clé de la pathologie et son inhibition est neuroprotecteur *in vivo* (Gafni 2004; Graham 2006).Ainsi, le clivage de la HTT mutée par la caspase-6 est considéré comme un prérequis aux dysfonctions neuronales et à la neurodégénérescence (Graham 2006; Wang 2015). Le clivage caspase-6 dépendant de la HTT mutée induit la production de fragments N-ter toxiques (Graham 2006). Une fois la HTT clivée, les fragments N-ter sont transloqués vers le noyau. Cet évènement conduit à l'apoptose neuronale en altérant la transcription génétique (Ross & Tabrizi, 2011; Saudou 1998; Valor, 2015). Par conséquent, des fragments de mHTT sont retrouvés dans des cerveaux post-mortem de patient (Mende-Mueller 2001). Il est maintenant connu que les fragments N-ter mutants sont suffisants pour reproduire des pathologies proches de la MH, tandis que des fragments plus longs se révèlent moins toxiques pour les cellules et les modèles animaux (de Almeida 2002; Karpuj 1999; Saudou 1998).

6.2. Agrégation et cytotoxicité

L'agrégation anormale et l'accumulation protéique sous forme d'inclusions nucléaires ou cytoplasmiques est un phénomène caractéristique des maladies neurodégénératives liées au vieillissement telles que les maladies de Parkinson, d'Alzheimer ou la sclérose latérale amyotrophique. Elle est aussi commune aux maladies dues à une expansion polyQ anormale

telle que la MH. Dans la MH, l'agrégation est positivement corrélée à la longueur de l'expansion polyQ. Ceci est probablement en lien avec les modifications conformationnelles de la région N-ter (Scherzinger 1999; Pandey 2018). L'agrégation est spécifique de la HTT mutée et précède l'apparition des symptômes et la neurodégénérescence (Ross 1997). Elle a été observée dans les modèles murins et les cerveaux de patients (Davies 1997). Les agrégats de mHTT sont présents dans le putamen, le noyau caudé et le cortex cérébral (Aronin 1999). A l'échelle cellulaire, ces agrégats sont observés dans le noyau et le cytoplasme des neurones et des cellules gliales (Gutekunst 1999; Jansen 2017).

L'effet de l'agrégation de la mHTT fait toujours débat : son statut est passé de cause très probable de la neurodégénérescence à phénomène neuroprotecteur (Bates 2003; Gong 2008). En effet, les agrégats sont retrouvés dans tous les types neuronaux, y compris ceux qui ne sont pas sensibles à la neurodégénérescence (tels que les interneurones) (Kuemmerle 1999). De plus, la mort des neurones n'est pas corrélée avec la présence d'agrégats (Arrasate 2004) et l'inhibition de l'agrégation favorise la mort neuronale (Saudou 1998). Enfin, les neurones ayant une grande quantité d'inclusions seraient plus susceptibles de survivre (Bodner 2006).

Si les agrégats ne sont pas directement liés à la mort cellulaire, ils peuvent néanmoins interférer avec la dynamique intracellulaire (figure 11). En effet, il a récemment été montré que les inclusions participeraient à déformer les membranes endoplasmiques dont celle du réticulum, contribuant à déréguler son activité (Guedes-Dias et Holzbaur 2017; Bauerlein 2017). Par ailleurs, les agrégats pourraient contribuer à propager la pathologie dans le cerveau en étant transmis entre cellules par voie trans-synaptique (Rosas 2002; Pearce 2015; Kim 2017).

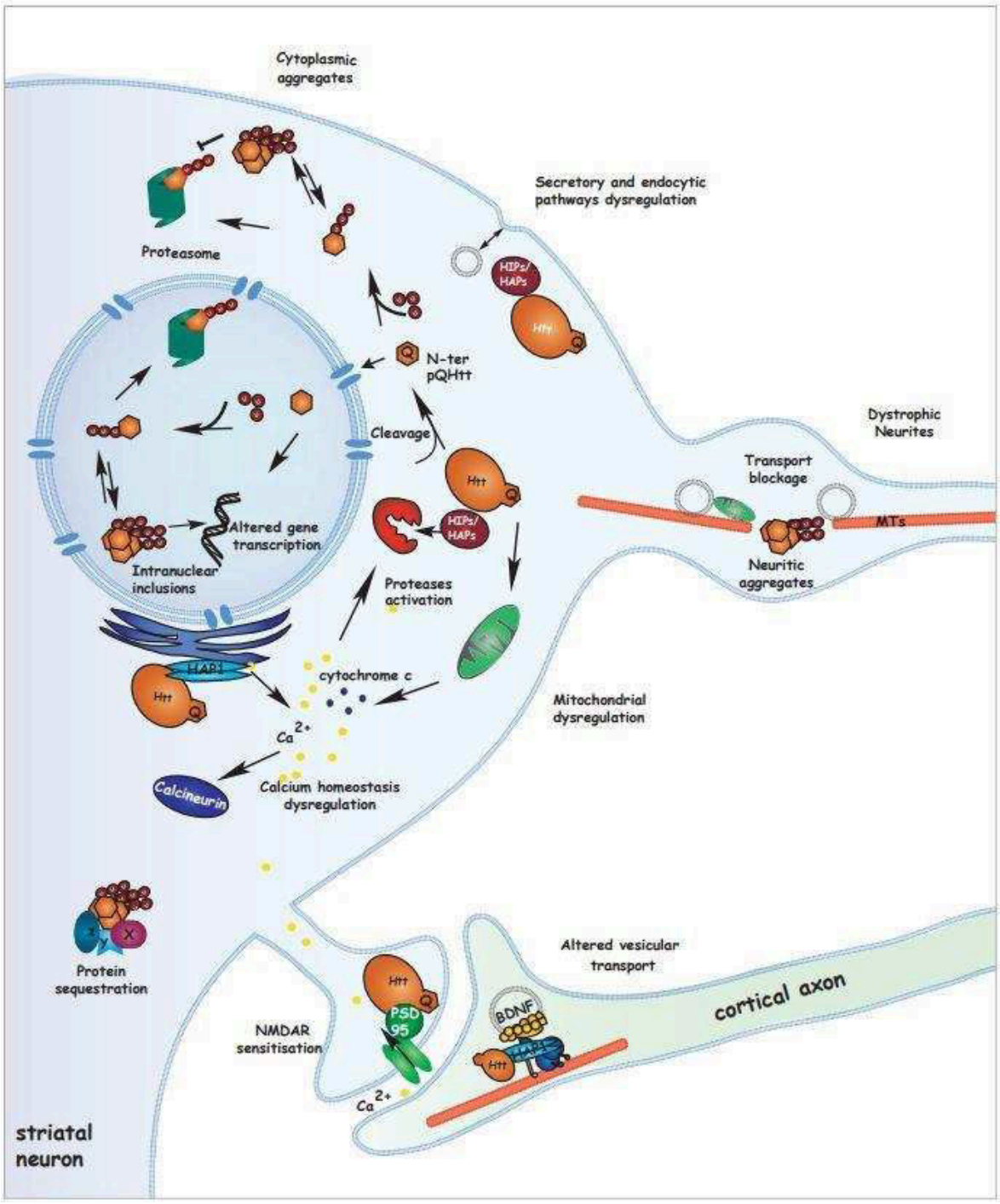


Figure 11 : Mécanisme de toxicité induite par la mHTT

Clivée par des protéases, la mHTT forme des agrégats neuritiques et cytoplasmiques. La mHTT altère l'homéostasie du calcium, le transport et le recyclage vésiculaires. Des défauts de transport du facteur trophique BDNF induisent la mort neuronale. Les agrégations engendrent des encombrements stériques qui perturbent le transport. Les fragments N-ter de HTT mutée pénètrent le noyau et altèrent la transcription engendrant la mort neuronale (Borrell-Pages 2006).

6.3. Transcription

Facteurs de transcription :

La transcription est un processus finement régulé. Les HTT sauvage et mutante participent à la régulation de la transcription via leurs interactions avec différents facteurs de transcription. Néanmoins, dans les modèles murin transgénique et chez les patients atteints de la MH, de nombreuses altérations de l'activité transcriptionnelle, conduisant à des anomalies dans les niveaux d'expression de certains gènes, ont été relevées (Hodges 2006; Kuhn 2007). Ces défauts transcriptionnels précèdent l'apparition des symptômes et contribuent activement à la progression de la pathologie (Sugars et Rubinsztein 2003).

Comme précédemment mentionné, La HTT interagit avec le facteur REST/NRSF qui agit comme un inhibiteur de transcription. En condition sauvage, la HTT séquestre REST/NRSF dans le cytoplasme et inhibe ainsi son activité. Cependant, la HTT mutante a une interaction réduite avec REST/NRSF. Ce dernier est alors libre de pénétrer dans le noyau et d'inhiber ses gènes cibles conduisant notamment à la réduction d'expression du BDNF (Zuccato 2003, 2007; Zuccato et Cattaneo 2007; Shimojo 2008).

La transcription de certains gènes pro-survie nécessite l'activation de la protéine CREB et le recrutement de son co-activateur CBP avec lequel la HTT interagit. Cependant, la mutation de la HTT en augmentant son affinité pour CBP et en favorisant sa dégradation, contribue à la diminution l'expression de gènes pro-survie (Steffan 2000; Nucifora 2001; Cong 2005).

Le facteur SP1 (pour *Specificity Protein 1*) favorise la transcription en recrutant TFIID,élément clé de l'initiation de la transcription génique dans les régions promotrices. . Les agrégats de mHTT présents dans le noyau interagissent avec SP1 et séquestrent TFIID. Ceci conduit à une inhibition de l'activité du complexe Sp1/TFIID qui régule la transcription des récepteurs à la dopamine D2 (Dunah 2002).

De façon intéressante, la mutation de la HTT affecte l'expression de Brn2, un facteur de transcription impliqué dans la différenciation neuronale et les fonctions neuro-sécrétrices (Yamanaka 2010). Il est notamment un marqueur d'identité cellulaire des neurones corticaux glutamatergiques des couches II/III du cortex cérébral, connues pour dégénérer en condition pathologique.

Mécanismes épigénitiques :

La mutation de la HTT est également capable de déréguler l'ouverture et la fermeture de la chromatine et donc son accessibilité à la transcription. Les protéines HAT (pour *Histone Acetyl Transferase*), qui permet l'acétylation des histones, et HDAC, qui dé-acétyle les histones, sont

toutes deux inhibées par la mHTT (Zuccato 2010). Enfin, des approches d'immuno-précipitation de la chromatine en présence d'anticorps ciblant la HTT ont permis de montrer que la HTT interagit directement avec l'ADN via sa séquence polyQ. Cette interaction est modulée par la longueur de l'expansion. Ainsi une expansion anormale favoriserait l'interaction de la HTT mutée avec l'ADN et, par conséquent, les dérégulations de la transcription (Benn 2008).

6.4. Excitotoxicité

L'excitotoxicité est due à une activité synaptique anormale conduisantt à la mort neuronale. Le dysfonctionnement peut provenir de plusieurs éléments de la synapse tripartite. Elle peut être due à un relargage excessif du glutamate par l'élément pré-synaptique, à une hypersensibilité des récepteurs au glutamate NMDA (NMDA-R) présents sur l'élément post-synaptique ou enfin à un recyclage défectueux du glutamate relargué par l'astrocyte (Estrada Sanchez 2008) (figure 11).

Dans la MH, les neurones striataux (MSNs) sont anormalement activés par les neurones corticaux glutamatergiques de la couche V. Cette hyperactivation des MSNs induit une entrée excessive de calcium conduisant à l'activation de nombreuses enzymes (dont les protéines kinase C, PKC, phospholipases et calpaines) impliquées dans la dégradation protéique. Ces enzymes modifient l'activité mitochondriale, ce qui conduit à une diminution d'ATP (Adenosine Tri-Phosphate) et à une augmentation de la production de stress oxydatif (Estrada Sanchez 2008).

En parallèle, la HTT interagit avec la protéine PSD-95 (pour *Post-Synaptic Density 95*), connue pour facilite l'ancrage des NMDA-R au niveau de la membrane post-synaptique et cette interaction diminue en présence de HTT mutée. (Sun 2001; Marcora et Kennedy 2010; Smith 2014). De plus, la mHTT favoriserait la localisation extra-synaptique de PSD-95, conduisant à une augmentation de NMDA-R dans ces régions (Song 2003; Fan 2009). Cependant, si la localisation synaptique des NMDA-R favorise la survie neuronale, leur localisation extra-synaptique est associée à l'activation des voies de signalisation de mort cellulaire (notamment via CREB). (Parsons 2014; Hardingham et Bading 2010). Cette relocalisation extra-synaptique des NMDA-R est observée dans un premier temps dans les MSNs de la voie indirecte (dégénèrant les premiers) puis dans les MSNs de la voie directe connus pour être les derniers à dégénérer. (Levine 2010).

6.5. Défauts mitochondriaux

De nombreuses dysfonctions mitochondriales ont été observées et contribuent à la progression de la MH. Productrices d'énergie sous forme d'ATP et régulatrices de

l'homéostasie calcique intracellulaire les anomalies de l'activité mitochondriale peuvent conduire à une insuffisance métabolique, un stress oxydatif, de l'excitotoxicité et à la neurodégénérescence. L'injection de toxines mitochondriales dans le striatum (qui seront décrits dans le chapitre « modèles lésionnels ») reproduit la neurodégénérescence striatale caractéristique de la MH et les troubles moteurs associés (Beal 1993; Brouillet 1995). Par ailleurs, le métabolisme énergétique est altéré chez les patients asymptomatiques et symptomatiques (Brennan 1985; Jenkins 1993; Gu 1996).

Au niveau cellulaire, la morphogénèse mitochondriale, caractérisée par des mécanismes de fusion et fission, est cruciale pour réguler l'activité mitochondriale. Elle permet notamment l'adressage des mitochondries aux différents compartiments cellulaires, et ces mécanismes sont altérés dans le contexte de la MH. En effet, les ARNm des protéines DRP1 et FIS1 qui régulent la fission des mitochondries sont augmentés chez les patientset les modèles transgéniques de la MH (Kim 2010; Shirendeb 2012). En parallèle, les protéines mitofusines 1 et 2 qui régulent la fusion mitochondriale présentent une diminution de leurs transcrits. De plus, les souris transgéniques BACHD présentent une élévation de fragmentation mitochondriale en accord avec les altérations de fission des mitochondries (Shirendeb 2012). L'augmentation de fission mitochondriale serait due à l'interaction entre DRP1 et la mHTT qui module l'activité de DRP1 (Song 2011). Le traitement de souris transgéniques R6/2 avec des peptides inhibant l'interaction entre DRP1 et FIS1 entraine une amélioration des symptômes moteurs et réduit la neurodégénérescence striatale : cette voie de signalisation aurait donc un intérêt thérapeutique pour le traitement de la MH (Guo 2013).

TIM23, une protéine membranaire mitochondriale joue un rôle clé dans l'import protéique vers la mitochondrie et l'assemblage de la chaine respiratoire (Yano 2014). La mHTT interagit avec TIM23 *in vivo* et *in vitro* conduisant à une inhibition de l'import protéique dans les mitochondries (Yano 2014). En parallèle, les cerveaux de patients présentent des défauts d'assemblage de la chaine respiratoire, notamment dans le cas du complexe II (Gu 1996; Browne 1997; Damiano 2013).

Enfin, des variations du potentiel membranaire des mitochondries ont été relevées, ainsi qu'une augmentation de la sensibilité calcique du pore PTP (pour *Permeability Transition Pore*) contrôlant l'import calcique dans la matrice mitochondriale (Panov 2002; Choo 2004).

6.6. Dynamique et transport intracellulaire

Au sein des neurones, le transport actif des vésicules, organelles, acides nucléiques et facteurs trophiques ainsi que la signalisation entre le corps cellulaire et les synapses est rendu possible grâce à un réseau de microtubules (MTs) (Schliwa et Woehlke 2003). La localisation de la HTT au niveau des microtubules et des vésicules, ainsi que de nombreux interacteurs

suggèrent son implication dans le transport intracellulaire le long des axones et dendrites. La HTT est capable d'interagir avec de nombreuses protéines impliquées dans le transport : HAP1, la kinésine KIF5C, la dynéine et la dynactine (Li 1995; McGuire 2006; Engelender 1997; Rong 2007). Elle contribue au transport de nombreuses vésicules dont celles contenant le BDNF, la protéine APP (pour *Amyloid Precursor Protein*), les récepteurs GABA et TrKB, les protéines V-SNARE et VAMP7, les protéines RAB3 et 19 et des ARNm (Wong et Holzbaur 2014; Caviston 2011; Liot 2013; Gauthier 2004; Her et Goldstein 2008; Colin 2008; White 2015; Ma 2011).

La capacité de la HTT à favoriser le transport actif des vésicules est très certainement liée au fait qu'elle est impliquée dans la localisation vésiculaire de GAPDH, une enzyme glycolytique, permettant une production locale d'énergie qui alimente les moteurs moléculaires lors du transport (Zala 2013).

Ainsi, en agissant comme une protéine d'échafaudage pour les moteurs moléculaires via ces intéractions avec différents partenaires vésiculaires (Caviston & Holzbaur, 2009), la HTT favorise le transport antérograde et rétrograde (Gauthier 2004; Gunawardena 2002). Dans la MH, l'interaction de la HTT avec les moteurs moléculaires est altérée ce qui conduit à leur déplétion des MTs et à une diminution du transport (Gunawardena 2003; Zala 2013; Sinadinos 2009). De plus, en condition pathologique, la localisation de GAPDH est déficiente, ce qui contribue à la réduction du transport (Zala 2013) et notamment celui du BDNF (Gauthier 2004). Le défaut du transport axonal antérograde du BDNF se traduit par une diminution de son apport dans le striatum des modèles murins de la MH et des patients (Ferrer 2000; Spires 2004; Apostol 2008). En effet, les MSNs ne synthétisant pas leur propre BDNF, le support trophique est assuré par les neurones corticaux (Baquet 2004) et ce défaut d'approvisionnement de BDNF les rend vulnérables à la mort neuronale (Gorski 2003; Baquet 2004). Les phosphorylations de la mHTT à la sérine S421 et S1181/S1201 permettent de rétablir le transport de BDNF en restaurant l'interaction des moteurs moléculaires aux MTs (Zala 2008b; Ben M'Barek 2013).

La présence de mHTT induit des défauts de transport des mitochondries (Lee 2004; Sinadinos 2009; Costa 2010; Orr 2008; Song 2011). Cependant, le fait que la HTT sauvage transporte les mitochondries est débattu (Gauthier 2004; Trushina 2004). Il n'est donc pas clairement établi que les mécanismes sous-tendant les défauts de transport mitochondriaux observés dans le cadre pathologique sont dus à une perte de fonction de la HTT sauvage dans le transport.

7. Les modèles de la maladie de Huntington

De nombreux modèles, murins et non murins, ont été développés afin de comprendre les mécanismes physiopathologiques à l'origine de la MH. Ainsi, différents modèles animaux tels que la levure, la drosophile, le rat, la souris et le mini-porc par des approches de lésions chimiques ou de modifications génétiques. Le chapitre suivant décrit les modèles les plus couramment utilisés.

7.1. Les modèles lésionnels

Avant la découverte de la mutation dans le gène codant la HTT, les recherches ont tenté de comprendre la composante neurodégénérative de la maladie. La dégénération striatale étant l'une des caractéristiques histologiques majeures de la pathologie, des modèles de lésion du striatum par l'injection de neurotoxines telles que l'acide kaïnique et l'acide iboténique ont émergé (McGeer and McGeer 1976; Coyle et Schwarcz 1976). Ces toxines agonistes des récepteurs glutamatergiques induisent la mort spécifique des neurones GABAergiques du striatum. D'autres modèles chimiques sont basés sur l'injection d'inhibiteurs de la chaîne de phosphorylation oxydative mitochondriale tels que l'acide proprionique ou le malonate (Beal 1993a; Beal 1993b; Brouillet 1995, 1999).. L'utilisation de ces modèles lésionnels a permis de comprendre en partie la pathogenèse de la MH, notamment la signalisation aberrante liée au NDMA-R, les dysfonctions mitochondriales et les défauts énergétiques qui leur sont associés (Coyle et Schwarcz 1976; Beal 1986; Brouillet 1999).

Néanmoins, ces modèles lésionnels présentent des limites et ne récapitulent pas la pathogénèse de la MH du fait : (*i*) de l'induction rapide et locale de la dégénérescence du striatum et (*ii*) de l'absence d'expression de la protéine mutée ne permettant pas ainsi d'appréhender l'altération de ses fonctions.

7.2. Modèles génétiques animaux

7.2.1. Caenorhabditis Elegans (*C. Elegans*)

Caenorhabditis Elegans n'ayant pas d'orthologue de la HTTla MH a été modelée par l'expression ectopique de fragments N-ter pathogènes de la HTT (57 à 171 acides aminés avec des expansions polyQ allant de 88 à 128 répétitions). Ces différents modèles présentent une apparition progressive des défauts des fonctions neuronales et une neurodégénérescence (Faber 1999; Parker 2001).

7.2.2. Drosophila melanogaster

Le développement des stratégies UAS-GAL4 (Brand et Perrimon 1993) ont permis l'expression de fragments N-ter de la HTT (65 à 548 acides aminés) ou de la HTT complète

mutée (Steffan 2001; Lee 2004; Li 2007). Ces modèles présentent des défauts moteurs progressifs ainsi qu'une réduction de l'espérance de vie. La limite principale de ces modèles est que la séquence codante insérée ne comporte pas d'introns. Ils ne rendent donc pas compte de l'impact des séquences introniques sur l'expression de la HTT et tout particulièrement de l'expression de fragments N-ter issus du clivage des transcrits ou d'épissages alternatifs (Pouladi 2013).

7.2.3. Modèles murins

7.2.3.1. Les souris transgéniques

Les souris transgéniques sont des modèles permettant l'expression surnuméraire d'une copie complète ou tronquée de la HTT mutée. Du fait d'une insertion aléatoire, la localisation génomique du fragment codant la mHTT n'est pas contrôlée.

R6/1 et R6/2 :

Les modèles R6 ont été les premiers générés après la découverte du gène impliqué dans la MH et sont les plus utilisés à ce jour. Ils expriment tous une copie surnuméraire de l'exon 1 mutant de la *HTT* humaine tronquée qui ne représente que 3% de sa longueur totale. Les R6/1 et R6/2 portent respectivement une répétition de 116 et 144 CAG sous le contrôle du promoteur humain (Mangiarini 1996). Ces modèles, dans lesquels les premiers symptômes apparaissent de façon précoce (entre 3 et 6 mois) ont permis de démontrer que l'exon 1 mutant était suffisant pour reproduire les caractéristiques principales de la MH à savoir les défauts moteurs, les performances cognitives amoindries et une espérance de vie réduite (Davies 1997; Murphy 2000). L'atrophie du striatum et du cortex cérébral est aussi observée ainsi que la présence d'agrégats nucléaires de HTT dans différents types cellulaires (Davies 1997; Sathasivam 1999). L'inconvénient majeur de ces modèles réside dans le fait que ces souris n'expriment qu'un fragment de la HTT mutante et qu'aucune neurodégénérescence n'a été clairement identifiée. Enfin, les R6 ont montré une instabilité élevée du CAG dans les lignées somatiques germinales, avec des colonies de souris pouvant exprimer jusqu'à 400 répétitions de CAG (Dragatsis 2009).

Souris YAC128 et BACHD :

Afin de générer des modèles transgéniques exprimant une HTT mutante complète, des groupes ont tiré parti des technologies de génie génétique que sont les chromosomes artificiels de levures (YAC, pour *Yeast Artificial Chromosome*) et de bactéries (BAC, pour *Bacterial Artificial Chromosome*). Ces stratégies présentent l'avantage de pouvoir intégrer des vecteurs artificiels contenant l'intégralité de la séquence exonique et intronique du gène de la HTT

mutante humaine, ainsi que 24kb de séquence régulatrice en amont et 117kb en aval, assurant ainsi une régulation spatiotemporelle de l'expression de la HTT mutante de manière plus physiologique.Les souris YAC128 expriment une HTT mutante avec 128 répétitions, tandis que les BACHD expriment un variant de 97 répétitions. L'instabilité somatique de la répétition est très limitée dans ces modèles. Les YAC128 et BACHD ont un développement progressif des symptômes moteurs et cognitifs, ainsi qu'une atrophie notable du striatum et du cortex cérébral.

Les YAC128 présentent une diminution du nombre de neurones particulièrement dans les régions latérales du striatum (Hodgson 1999; Slow 2003). Cependant, elles ne présentent pas d'inclusion de HTT démontrant que l'agrégation n'est pas indispensable dans le phénomène de dégénérescence neuronale.

Les BACHD présentent une agrégation de la mHTT. La translocation de la HTT dans le noyau est absente des neurones striataux, suggérant que les processus physiopathologiques peuvent se produire en absence d'accumulation nucléaire de mHTT (Gray 2008). De plus, les défauts moteurs apparaissent progressivement et sont associés à des défauts synaptiques et à une apparition tardive d'atrophie du cortex cérébral et du striatum pouvant atteindre 32% de perte de volume.

La faiblesse de ces modèles réside dans l'expression surnuméraire d'une copie de la HTT mutante en plus de deux copies sauvages du gène. Les proportions entre HTT normale et mutante ne suivent donc pas celle observée dans la pathologie humaine.

7.2.3.2. Les souris Knock-In

C'est donc par nécessité de générer des modèles dans lesquels la HTT mutée est exprimée de façon endogène, que sont apparus les modèles d'insertion dits « *Knock-In* » (KI). Les souris knock-in ont été conçues en remplaçant l'exon-1 sain de la souris par l'exon-1 humain pathogène. Son expression est régulée par les séquences régulatrices endogènes du génome murin assurant ainsi une expression temporale et tissu spécifique. Il existe plusieurs modèles dans lesquels la longueur de l'expansion CAG varie de 50 à 200 répétitions (Pouladi 2013).

Les CAG140 et zQ175 :

Le modèle CAG140, dans lequel l'exon-1 muté contient 140 répétitions de CAG, a été très largement étudié, *in vitro*, sur cultures de neurones corticaux et striataux, et *in vivo* lors d'études histologiqques et fonctionnelles. Ce modèle présente de nombreuses caractéristiques physiopathologiques de la MH à savoir une présence d'agrégats nucléaires et une atrophie progressive du striatum associées à des déficits moteurs, un poids diminué et une létalité précoce (Menalled 2003).

La lignée zQ175 a été générée spontanément à partir des CAG140 dont la répétition est très instable dans la descendance. Les souris zQ175 ayant le même fond génétique que les CAG140, elles présentent les mêmes phénotypes que ceux observés dans la lignée CAG140. Cependant ces phénotypes apparaissent plus précocement suggérant un effet dépendant de la longueur de l''expansion CAG dans la précocité des symptômes, comme observé chez l'Homme (Menalled 2012). Au niveau comportemental, ces souris présentent des atteintes à la fois motrices et psychiatriques, avec l'apparition d'anxiété et de stress (Menalled 2012). Au niveau histologique, le cortex et striatum des souris zQ175, analysé par imagerie à résonnance magnétique, présentent une réduction du volume à partir de 3 mois (Peng 2016) associée à des anomalies de morphologie dendritique des neurones corticaux et striataux. Les propriétés électriques de ces neurones sont affectés (McKinstry 2014). De plus, les neurones corticaux des souris zQ175 produisent moins de BDNF (Yu 2018) et leurs neurones striataux présentent des défauts d'expression de marqueurs d'identité. Plus récemment, il a été mis en évidence que les défauts de la voie indirecte du striatum sont observés chez les souris zQ175 avant l'apparition des défauts moteurs, comme cela est le cas chez les patients HD (Peng 2016; Sebastianutto 2017). Les souris zQ175 reproduisent par conséquent la physiopathologie de la MH observée chez l'humain. Ce modèle constitue donc un modèle d'intérêt pour la compréhension du processus physiopathologique de la MH ainsi que pour des essais de molécules à visée thérapeutique.

7.2.2.3. Les modèles de perte de fonction

Dans la MH il est communément admis que le gain de fonction toxique de mHTT et la perte de fonction de la protéine sauvage participe à la pathologie. D'où l'intérêt de générer des modèles murins dans lesquels la HTT est inactivée (*KO, Knock-out*). De façon intéressante, le modèle complet de la HTT présente une létalité précoce à 7,5 jours de développement embryonnaire (E7.5), soulignant le rôle majeur de la HTT dans le développement embryonnaire précoce (Duyao 1995; Nasir 1995; Zeitlin 1995). Afin de s'affranchir de cette létalité précoce, des équipes ont utilisé le système de recombinaison génétique CRE/LoxP. Ce système permet d'exciser une région d'ADN flanquée de sites LoxP en présence de l'enzyme CRE recombinase (CRE) (Sauer 2002). Ainsi, la génération du modèle murin *HdH*$^{flox/flox}$, dans lequel l'exon-1 de la HTT sauvage a été flanqué de sites LoxP qui, croisé à des modèles transgéniques exprimant la CRE recombinase, a permis de contrôler l'inactivation de la HTT de manière spatio-temporelle. (Dragatsis 2000).

Ainsi, en exprimant la CRE sous le contrôle du promoteur de la CAMK2 (pour *Calmoduline Kinase 2*), spécifiquement exprimée dans le cerveau après la naissance, il a été montré que la déplétion de HTT conduisait à des phénotypes caractéristiques de la MH (Dragatsis 2000).

L'inactivation de la HTT durant le développement cérébral a permis de caractériser les rôles de la HTT durant les périodes embryonnaires et postnatales. Ainsi l'utilisation des souris exprimant la CRE sous contrôle du promoteur Nestin, (exprimé dans les précurseurs neuronaux et gliaux corticaux), a permis de montrer que la HTT régule l'orientation du fuseau mitotique lors de la prolifération des précurseurs neuraux et gliaux dans le cortex en développement. La déplétion de la HTT favorise une différentiation neuronale précoce (Godin 2010). La lignée *HdH*$^{flox/flox}$;Emx1-CRE a quant à elle permis de montrer que la déplétion embryonnaire et post-natale de la HTT spécifiquement dans le cortex entraîne des défauts anatomiques et/ou fonctionnels des neurones corticaux et striataux chez l'adulte et le jeune adulte (McKinstry 2014). Plus récemment, l'analyse longitudinale de ce modèle chez l'adulte a montré des défauts dans le cortex ainsi que dans le striatum alors que celui n'est pas déplété en HTT démontrant ainsi l'importance de a voie cortico-striatale dans la physiopathologie de la MH (Dragatsis 2018). Ainsi à 12 mois, ces souris présentent : (*i*) une réduction des volumes cortical et striatal, (*ii*) une baisse du nombre de neurones, (*iii*) une baisse des niveaux de BDNF corticaux et (*iv*) des défauts comportementaux, une perte de poids et une longévité réduite (Dragatsis 2018).

7.2.4. Les mini-porcs knock-in

Récemment, une équipe chinoise en utilisant la technologie d'édition du génome CRISPR/Cas9 a généré le premier modèle porcin de la MH. Il présente l'avantage d'être plus proche de l'Homme sur de nombreux aspects, que ce soit anatomique, physiologique et génétique. Dans ce modèle, l'expression de la mHTT endogène du porc dans laquelle l'exon-1 porcin a été remplacé par l'exon-1 humain mutant (150 répétitions) induit les phénotypes caractéristiques de la MH telles que la perte de poids et la mortalité précoce. De plus, les porcs présentent les caractéristiques histologiques typiques de la MH tels que l'atrophie du striatum, due à la neurodégénérescence des MSNs, associée à un élargissement des ventricules cérébraux. Les performances motrices ainsi que les capacités respiratoires sont également affectées dans ce modèle (Yan 2018).

Ce modèle proche de la clinique et de la physiopathologie de la maladie est toujours en cours d'étude. De nombreux aspects décrits chez les rongeurs pourraient être réétudiés dans ce modèle, ce qui permettrait de confirmer ou d'infirmer des hypothèses quant au processus physiopathologiques de la MH, et ce dans un contexte plus proche de l'homme. En outre, ce modèle permettra de mieux tester les nouvelles thérapies, en termes de faisabilité et de toxicité, avant d'être testées sur l'humain (Liu 2018).

CHAPITRE 3 : NEUROGENESE CORTICALE EMBRYONNAIRE

1. Le cortex cérébral

Le cortex cérébral ou néocortex est la partie superficielle qui englobe les hémisphères cérébraux et est organisée en aires fonctionnelles. Il est composé de six couches juxtaposées contenant deux classes de neurones : les neurones de projection excitateurs (glutamatergiques avec une morphologie pyramidale) et les interneurones inhibiteurs GABAergiques (acide γ-aminobutirique, présentant des morphologies variées) (Molyneaux 2007). Les neurones excitateurs représentent 70 à 80% de la population neuronale néocorticale (Tan & Shi 2013). Ils sont capables de projeter leurs axones sur de grandes distances, permettant leur communication avec d'autres cellules au sein du cortex, mais également avec des structures sous-corticales. A l'inverse, les interneurones vont faire des projections plus locales (Franco & Muller 2013) et vont réguler de manière fine l'activité des neurones de projection. Dans ce chapitre, je m'intéresserai tout particulièrement aux neurones excitateurs auxquels je me suis intéressée durant ma thèse.

1.1. Les aires corticales

Chez l'homme, le cortex cérébral se divise en 4 lobes externes : frontal, pariétal, occipital et temporal, délimitées anatomiquement par des sillons entre les circonvolutions. D'un point de vue fonctionnel, ces lobes vont intégrer et traiter des informations spécifiques et être impliqués dans des fonctions qui leur sont propres. De ce fait, le cortex est décrit comme étant régionalisé en « aires corticales ». On distingue dans cette classification les aires primaires et associatives. Les aires primaires reçoivent l'information et initient la réponse adaptée tandis que les aires associatives vont participer à l'élaboration d'une réponse plus fine. Ainsi, le lobe frontal contient les aires motrices primaires et associatives, le lobe pariétal englobe les aires somatosensorielles primaires et associatives tandis les aires auditives sont situées dans le lobe temporal.Le lobe occipital est impliqué dans la vision et ce, via les aires visuelles primaires et associatives. Chez la souris, le cortex est organisé de la même manière, cependant le cortex n'est pas gyrifié (Jabaudon, 2017, figure 12).

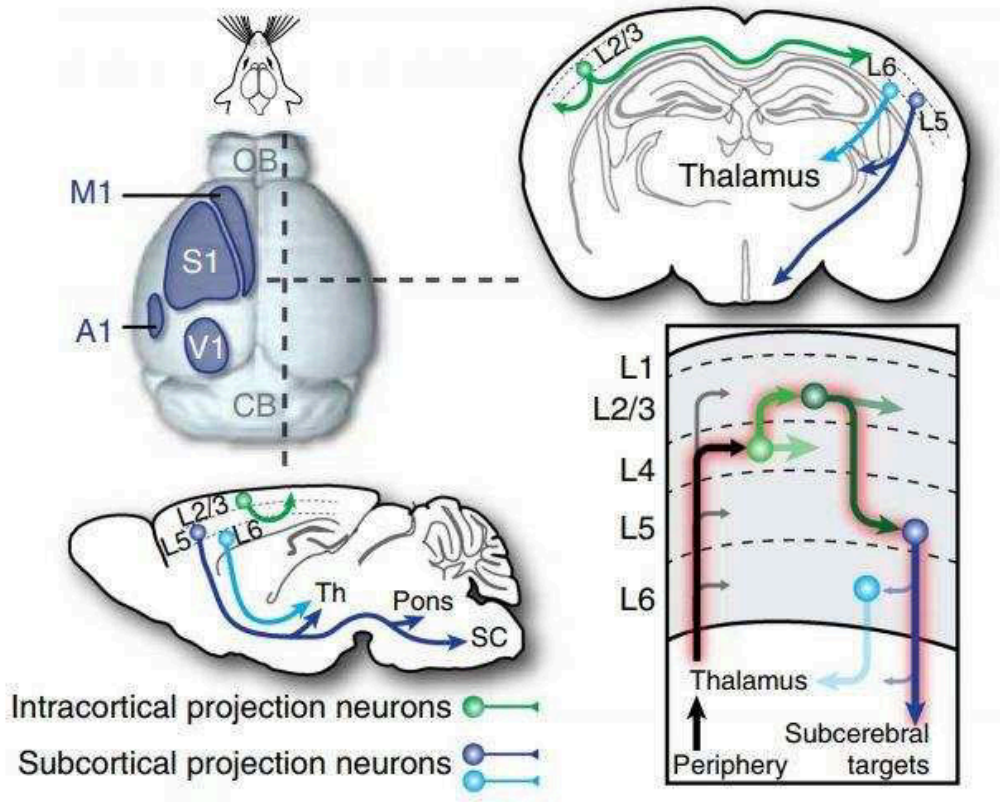


Figure 12 : Représentation schématique de l'organisation du cortex cérébral murin et de sa connectivité (Jabaudon 2017).
A gauche, face dorsale du cortex cérébral murin. En bleu sont indiquées les aires corticales. (A1, aire auditive primaire ; M1, aires motrices primaires ; V1, aires visuelles primaires ; S1, aires somatosensorielles primaires). A gauche, organisation laminaire du cortex murin, projections des neurones corticaux vers les autres régions cérébrales et connectivité intracorticale (Th : thalamus, SC : moelle épinière, OB : bulbes olfactifs).

1.2. La lamination corticale

Les neurones corticaux dits « neurones de projection » sont organisés en six couches numérotées de I à VI : On distingue les couches profondes VI et V des couches superficielles IV, III, II et I. Ces neurones sont classés selon la couche corticale dans laquelle se situe leur corps basal, leur morphologie (pyramidal pour les neurones des couches II/III et V), leurs propriétés électrophysiologiques et leurs connectivités (Lodato 2015).

Ils sont divisés en trois populations en fonction de leur cible de projection : (i) Les neurones de projection corticothalamique (NPCTh), qui projettent vers les noyaux du thalamus, (ii) les neurones de projection sous-cérébrale (NPSC), qui se connectent aux différents noyaux sous-corticaux et enfin (iii), les neurones de projection callosaux (NPC), qui font le lien entre les deux hémisphères cérébraux (Leone 2008; Greig 2013).

Ainsi, les NPC appartiennent principalement aux couches II et III tandis que les NPCTh sont situés dans la couche VI. Enfin, les NPSC sont localisés dans la couche V (Molyneaux 2007, Leone 2008, Greig 2013).

Grâce à cette organisation en couches, le cortex cérébral intègre et traite les informations selon un mode « vertical ». Ainsi, les stimuli provenant des noyaux sous-corticaux tel que le thalamus vont activer les neurones de la couche IV quiSes neurones vont principalement stimuler les neurones des couches II/III qui projettent de manière ipsilatérale sur les neurones de la couche V ou contralatéralement sur les couches V et II/III de l'autre hémisphère. Les neurones de la couche V stimulent les neurones de la couche VI ainsi que les structures sous-corticales des ganglions de la base telle que le striatum. Enfin, la couche VI, principalement constituée par les NPCTh, envoie ses projections vers les noyaux thalamiques (Jabaudon 2017, Molyneaux 2007, Greig 2013).

2. La neurogenèse corticale embryonnaire

Je décrirai ici le développement cortical murin, cette espèce ayant servi de modèle d'étude au cours de ma thèse.

Origine embryonnaire :

Au cours du développement embryonnaire précoce, le tissu neural émerge via le processus de neurulation (Nikolopoulou 2017). L'embryon est alors composé de 3 couches cellulaires : l'endoderme, situé en face ventrale, le mésoderme que l'on retrouve au milieu et l'ectoderme situé en face dorsale. La partie médiane de l'ectoderme se différencie par la suite en neuroectoderme, également appelé plaque neurale, sous l'induction de la notochorde sous-jacente et s'invagine pour former une gouttière neurale. La plaque neurale prolifère et le neuroectoderme latéral forme les bourrelets médullaires qui donneront les crêtes neurales (figure 13).

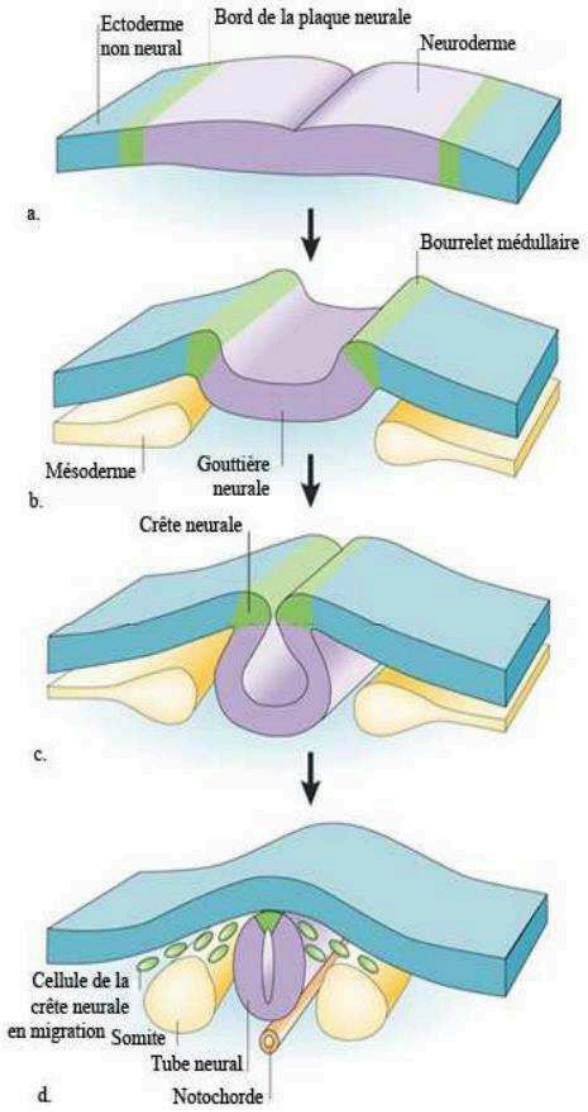


Figure 13 : Induction du neuroectoderme dans l'embryon tridermique **(Gammill et Bronner-Fraser 2003)**

Ces dernières finissent par se rejoindre et ferment la gouttière : le tube neural est alors forméet se subdivise en différentes régions selon l'axe antéropostérieur de l'embryon : la partie postérieure du tube, ou chorde spinale, formera la moelle épinière et le système nerveux périphérique. La partie antérieure du tube est composée de 3 vésicules : le rhombencéphale, le mésencéphale et le prosencéphale (figure 14). Cinq régions sont ensuite formées à partir de ces trois renflements dont le télencéphale et le diencéphale, issus du prosencéphale. Le télencéphale connaît une croissance rapide permettant la formation des deux hémisphères cérébraux, et ainsi la formation du cortex cérébral (figure 14). Le télencéphale primitif est essentiellement constitué d'un neuroépithélium de cellules organisées en monocouche : les cellules neuroépithéliales qui prolifèrent afin d'étendre la surface du neuroépithélium qui aboutira au 9ème jour de développement embryonnaire (E9.5) au le télencéphale

(Nikolopoulou 2017). A 10.5, les cellules de Cajal-Retzius sont générées à partir de 3 régions distinctes au bord du cortex en développement. Ces cellules migrent et envahissent la zone marginale. La distribution des différents sous-types (en fonction de leur origine) permet la régionalisation des aires corticales dans le cortex murin en développement. Ces cellules auront une activité régulatrice de la neurogenèse (Barber 2015).

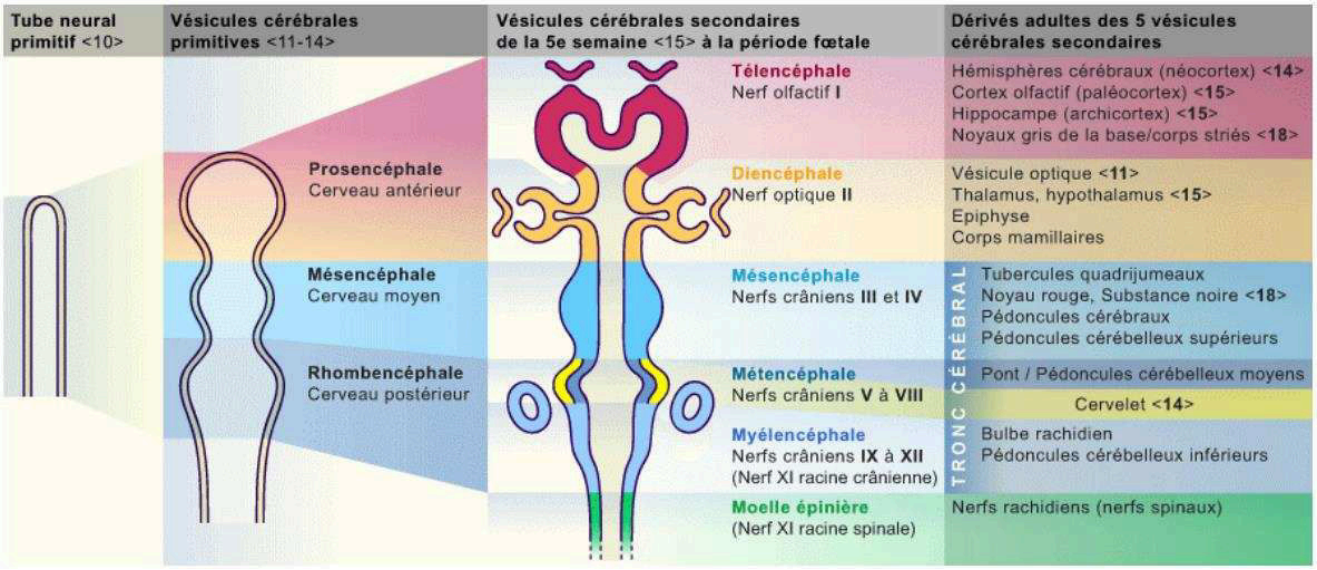


Figure 14 : Tube neural, vésicules neurales et structures associées.

2.1. Les progéniteurs neuronaux : les acteurs de la neurogenèse corticale

Durant le développement, les cellules neuroéphitéliales (NE), capable d'auto-renouvellement et de multipotence, vont produire les trois types cellulaires qui vont peupler le cortex à savoir les neurones excitateurs, les astrocytes et les oligodendrocytes (Gotz & Huttner 2005). Au cours de la neurogénèse, la prolifération des NE va donc peu à peu laisser sa place à la différentiation en différents types cellulaires, contrôlée de manière spatio-temporelle.

2.1.1. Les progéniteurs apicaux (AP)

Durant la corticogenèse, les neurones sont produits à partir de progéniteurs corticaux qui sont classés en deux groupes selon la localisation de leur mitose. Les progéniteurs apicaux (APs) se divisent à la surface ventriculaire et comprennent les cellules neuroépithéliales (NEs), les cellules gliales radiaires apicales (aRGs) et les progéniteurs intermédiaires apicaux (aIPs). Les progéniteurs basaux (PB) comprenant les progéniteurs intermédiaires basaux (bIPs) et les cellules gliales radiaires basales (bRGs) se divisent quant à eux de manière abventriculaire.

2.1.1.1. Les cellules neuroépithéliales (NE)

Tous les neurones générés au cours de la neurogenèse dérivent des NEs qui constituent le tissu télencéphalique des stades E7 à E11. Ces cellules forment un neuroépithélium pseudostratifié polarisé selon un axe apico-basal : la membrane apicale des NEs est en contact avec le ventricule cérébral et la base avec la surface piale du télencéphale (Huttner et Brand 1997; Gotz et Huttner 2005). Ces cellules prolifèrent activement pour former le support de la neurogenèse corticale jusqu'à E11 : c'est la phase d'expansion qui a deux fonctions majeurs : elle induit l'expansion latérale de la surface du cortex en développement et l'épaississement du neuroépithélium. Les noyaux des NEs se déplacent le long de l'axe apico-basal en coordination avec les phases du cycle cellulaire : La mitose s'effectue à la surface apicale puis, le noyau se dirige vers la région basale en phase G1, où il y effectue sa phase de synthèse. Le noyau retourne ensuite vers la position la plus apicale en phase G2 pour pouvoir à nouveau entrer en mitose. Ce phénomène, appelé Migration Nucléaire Inter-cinétique (MNI), caractérise les épithéliums pseudo-stratifiés et permettrait à ces tissus de : (*i*) compacter un grand nombre de cellules dans un espace réduit et (*ii*) réguler le nombre de mitoses (voir chapitre Migration nucléaire intercinétique). De plus, ce mécanisme assure le contact des NEs avec le liquide céphalorachidien qui, pendant le développement, contient de nombreux morphogènes qui régulera le devenir des progéniteurs (voir chapitre « Migration nucléiaire intercinétique » et « Facteurs intrinsèques et extrinsèques ») (Taverna et Huttner 2010). Les NEs, identifiables par l'expression de la protéine PAX6 (pour *Paired box 6*) et du marqueur neuroépithélial Nestine, subissent des changements dans l'expression de leurs gènes et commencent à exprimer des marqueurs astrogliaux, ce qui va donner naissance à des cellules de la glie radiaire apicales (aRGs). La transition des NEs vers les aRGs a lieu vers E9-E10 et est dépendante du morphogène FGF10 (Sahara & O'Leary 2009).

2.1.1.2. Les cellules de la glie radiaire apicale (aRG)

Les aRGs conservent certaines propriétés des NEs mais acquièrent également des propriétés astrogliales leur conférant un potentiel à la fois neurogénique et gliogénique. Parmi les propriétés des NEs conservées par les aRGs, on retrouve :

- La polarité apico-basale en raison de leur ancrage apical par leur pied à la surface ventriculaire et basal au niveau de la surface piale (figure 15).
- Le contact avec les surfaces apicale et basale par deux pieds distincts.
- la progression dans le cycle cellulaire et la MNI. Néanmoins, à cause de l'épaississement du cortex en développement, la MNI se restreint à la zone ventriculaire (ZV) contenant les noyaux des aRGs et ne s'étend plus sur toute l'épaisseur du cortex.

- L'expression de Pax6 et de la Nestine (Taverna 2014)

Contrairement aux NEs, les aRGs perdent leurs jonctions serrées (excepté ZO-1) et expriment les marqueurs astroglialaux GFAP (pour *Glial Fibrillary acidic protein*) et BLBP (pour *Brain Lipid Binding Protein*) (Malatesta 2003). Les aRGs participent à l'amplification de la réserve de progéniteurs corticaux, à la génération des progéniteurs basaux et aussi à la génération des premiers neurones corticaux selon différents modes de division (voir chapitre « Fuseau mitotique et orientation »). De plus, au fur et à mesure que le cortex s'épaissit, le processus basal des aRGs s'allonge afin que le pied basal reste en contact avec la membrane piale. Ce prolongement constituera un échafaudage qu'utiliseront les neurones pour leur migration vers leur destination finale dans le futur néocortex (Rakic 1971, voir chapitre Migration neuronale).

2.1.1.3. Les progéniteurs intermédiaires apicaux (aIP)

Les aIPs, produit par les aRGs représentent une petite population de progéniteurs localisés dans la ZV. Ils se détachent de la surface basale tout en maintenant l'expression de PAX6 et en réprimant les marqueurs astrogliaux. Les aIPs ne peuvent pas proliférer, cependant, ils se divisent après un cycle de MNI. Ces progéniteurs ne sont voués qu'à la production de neurones, ce qui permet de doubler la production neuronale par division apicale (Gal 2006; Tyler 2015).

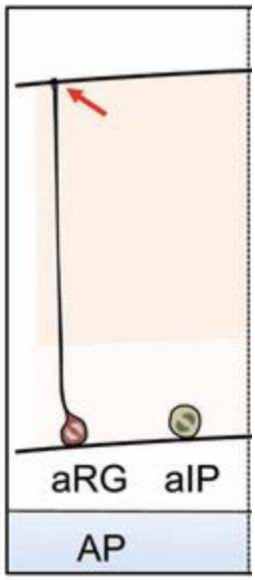


***Figure 15 : Morphologie des progéniteurs* apicaux (Florio & Huttner, 2014)**

2.1.2. Les progéniteurs basaux (BP)

Il existe deux types de progéniteurs basaux, les progéniteurs intermédiaires basaux (bIP) et la glie radiaire basale (bRG). Les BP sont générés aussi bien à partir des AP que des BP eux-mêmes. Contrairement aux progéniteurs apicaux, les BPs n'ont pas d'attachement à la surface apicale et ne possèdent donc pas de polarité apico-basale (Figure 16) (Florio et Huttner 2014).

2.1.2.1. Les progéniteurs intermédiaires basaux (bIP)

Les bIPs sont des progéniteurs BPs non-épithéliaux. Ils sont générés à partir des NEs ou aRGs suite à leur migration dans la zone sous-ventriculaire (ZSV). Ils perdent leur polarité avant d'entrer en mitose (Miyata 2004; Noctor 2004). Ils n'expriment pas les marqueurs astrogliaux mais commencent à exprimer le marqueur TBR2 (pour *T-box Brain 2*) (Englund 2005). Certains ne produisent que des neurones par division neurogénique (Haubensak 2004). Ce type de bIPs qui ne génère que des neurones est majoritaire chez la souris. Cependant, une partie des bIPs peut proliférer de façon transitoire et générer deux bIPs qui donneront respectivement deux neurones chacun. Les bIPs qui participent à cette amplification transitoire co-expriment les marqueurs PAX6 et TBR2 (Noctor 2004; Hansen 2010).

2.1.2.2. La glie radiaire basale (bRG)

Les bRGs ont été initialement identifiées dans le cortex de l'Homme et du furet comme des progéniteurs basaux partageant plusieurs caractéristiques avec les aRGs (dont l'expression de PAX6). Cependant leur corps cellulaire est localisé dans la zone sous-ventriculaire externe et non dans la VZ (Fietz 2010; Hansen 2010; Reillo 2011) et ils ne possèdent plus d'attachement apical. Les bRGs sont capables de proliférer de façon transitoire et participent principalement à la génération des neurones corticaux des couches superficielles (Florio & Huttner 2014). Leur rôle supposé est de participer à l'expansion de la surface corticale chez les mammifères au cerveau gyrencéphales. En effet, ces bRG sont rares chez les espèces ne présentant pas de cerveaux avec des foliations corticales, dont la souris (Jabaudon 2017).

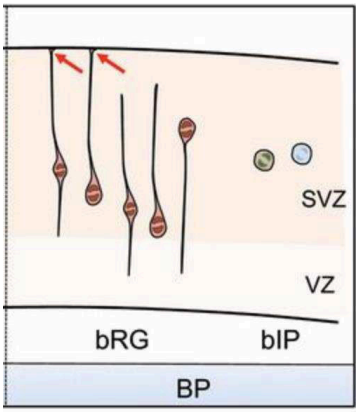


Figure 16 : Morphologie des progéniteurs basaux (Florio & Huttner, 2014)

2.1.3. Modes de division

Pendant la neurogenèse, tous les neurones corticaux excitateurs sont générés à partir des progéniteurs, de façon directe à partir d'un AP ou de façon indirecte à partir de BP (figure 17).

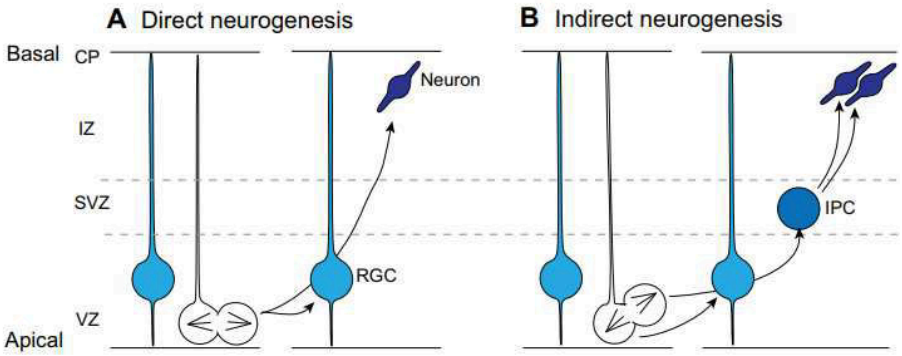


Figure 17: ***Modes de division direct et indirect des progéniteurs neurogéniques*** **(Homem & Knoblich, 2012)**

Les progéniteurs neuronaux peuvent aussi bien participer à l'amplification de la réserve de progéniteurs qu'à la génération de neurones corticaux excitateurs selon deux modes distincts de division, symétrique ou asymétrique, respectivement. Ces deux modes de division permettent une ségrégation différentielle des contenus cellulaires, ce qui influence le devenir cellulaire des cellules filles.

Les APs vont amplifier leur réserve et générer des neurones selon différents modes de division : Les APs peuvent par division symétrique non-neurogénique, uniquement amplifier leur réserve. Il est également possible pour un AP de produire un neurone et un AP par division asymétrique neurogénique directe. De plus, un AP a la capacité de produire des neurones de façon indirecte : un AP peut subir une division asymétrique indirecte dite non-neurogénique, le produit étant alors un AP et un BP ou deux BPs (Noctor 2004; Noctor 2008). Les BPs sont quant à eux capables de division symétrique neurogénique ou non-neurogénique. En effet, les BPs (IP) n'exprimant pas de marqueurs astrogliaux vont entrer en division symétrique neurogénique et générer deux neurones (Malatesta 2008). En revanche, les BPs exprimant

Les modes de division symétrique, asymétrique, prolifératif ou neurogénique sont régulés par l'orientation du fuseau mitotique et l'exposition à différents facteurs.

2.2. Nature des divisions cellulaires et devenir des progéniteurs

2.2.1. Fuseau mitotique et orientation

L'orientation du fuseau du mitotique est un mécanisme clé régulant la nature des divisions des progéniteurs neuronaux qui va définir la répartition égale ou inégale des composants cellulaires dans les deux cellules filles et ainsi déterminer le devenir des progéniteurs. Il a d'abord été suggéré qu'un plan de clivage vertical par rapport au ventricule, répartissant ainsi de manière égale les composants dans les deux cellules filles, résulterait en une division symétrique proliférative, alors qu'un plan de clivage horizontal conduirait à une division asymétrique neurogénique (Chenn & McConnell 1995). Il a ensuite été proposé qu'une légère inclinaison du plan de clivage serait suffisante pour induire une division asymétrique (Kosodo 2004). Durant la mitose, le positionnement du fuseau mitotique n'atteint son orientation définitive qu'au cours de la métaphase (Peyre 2011; Roszko 2006). L'orientation de ce fuseau dans les RGs est régulé par des mécanismes impliquant le centrosome, les microtubules astraux et les interactions protéiques dont les moteurs moléculaire au cortex cellulaire (Lancaster 2012). Le fuseau mitotique est ancré au cortex cellulaire par les MTs astraux via la dynéine et le complexe LGN/Gαi/NuMa. La localisation du complexe LGN aux membranes latérales des NE et des RGs est essentielle au maintien des divisions symétriques (Konno 2008; Morin 2007; Peyre 2011, figure 18).

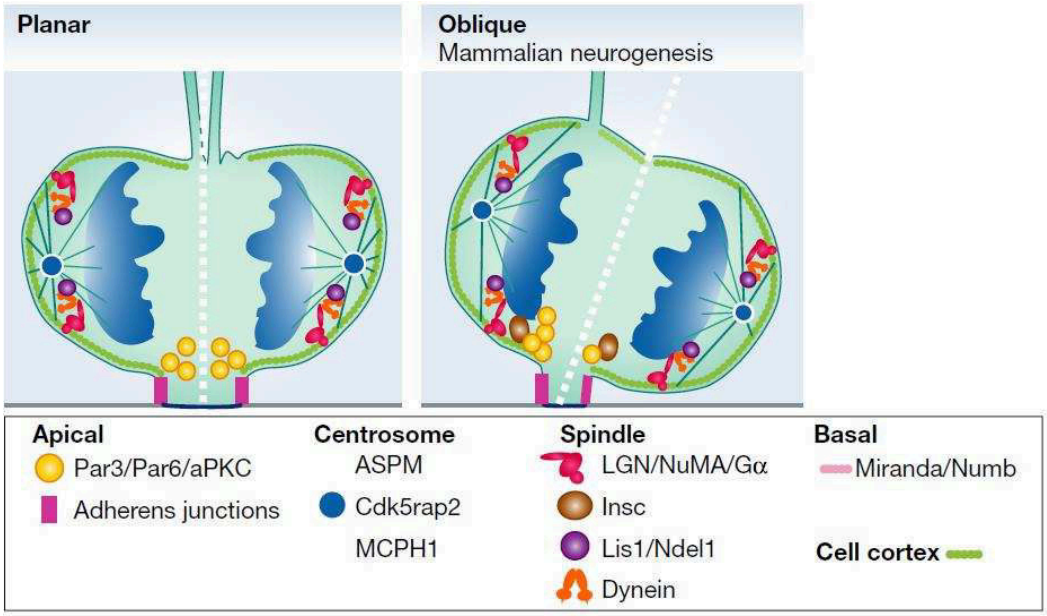


***Figure 18** : Division symétrique et asymétrique (Paridean 2014).*

LGN recrute, au cortex cellulaire, la protéine NuMA qui est capable d'interagir avec la dynéine et la dynactine permettant la formation du complexe LGN/Dynéine/Dynactine/NuMA. Ce complexe interagit avec les microtubules astraux et peut, grâce aux moteurs moléculaires,

générer des forces de traction qui ajustent l'orientation du fuseau mitotique (Peyre et Morin 2012). LIS1, lorsqu'elle est mutée induit l'apparition de lissencéphalie chez l'humain (Reiner 2013). LIS1 contribue à l'ancrage des microtubules astraux au cortex cellulaire en interagissant avec NDEL1 et la dynéine (Yingling 2008). La perturbation de l'activité du complexe LIS1/NDEL1/Dynéine induit l'apparition de plan de clivage aléatoire qui altère la prolifération des NEs et aRGs (Moon 2014). La HTT est aussi impliquée dans ce processus d'orientation du fuseau mitotique (Godin 2010). HAP-1 se lie à p150^{glued}, une sous unité de la dynactine (Gauthier 2004). L'absence d'expression HTT conduit notamment à une délocalisation de p150^{glued}, la dynéine et du complexe LGN/Gαi/NuMa (Godin 2010). La mutation de la HTT contribue à des défauts d'orientation du fuseau mitotique en altérant le recrutement du complexe Dynéine/NuMa/p150^{glued} au cortex cellulaire et au pôle du fuseau, ainsi que le recrutement de CLIP170 et p150^{glued} à l'extrémité + des microtubules (Molina-Calavita 2014).

2.2.2. Ségrégation des déterminants cellulaires

Le destin des progéniteurs après division est lié aux composants dont les cellules filles vont hériter de la cellule mère. La différence de répartition entre ces composants s'explique, au moment de la division, par l'existence d'une distribution polarisée de ces déterminants (Figure 18). Parmi eux se trouvent :

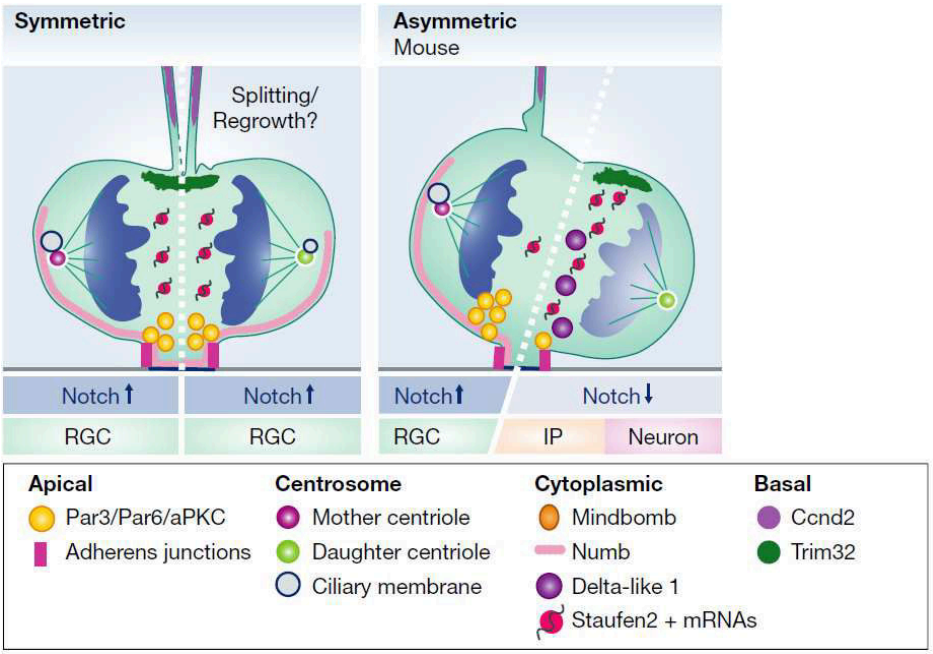


***Figure 18** : Distribution asymétrique des déterminants cellulaire (Paridean 2014).*

Les complexes de polarité : Le complexe de polarité Par (pour « Partition Defective ») est essentiel pour la polarité de nombreux types cellulaires. Il est composé de Par3, Par6, la thréonine kinase aPKC (atypical Protein Kinase C) et de petites GTPases comme Cdc42 et Rac1 (Johnson 1999; Khazaei & Puschel 2009). Lors de la division, la cellule fille qui va héritera du complexe de polarité demeura prolifération (Bultje 2009).

Les jonctions adhérentes : Lors de la division, la cellule fille qui héritera de la β-Caténine, une protéine de jonction adhérente N-Cadhérine, demeura prolifération (Taverna 2014). La β-Catenine est phosphorylée la cible de phosphorylation régulant son activité, elle régule la transcription de gènes pro-neuraux (Hirabayashi 2004). Elle favorise normalement maintien de l'état prolifératif (Chenn et Walsh 2003) et la différentiation (Hirabayashi 2004, voir chapitre Voie de signalisation Wnt*)*. De plus, il a été montré que l'expression de la N-Cadhérine au niveau du domaine apical des aRGs est associée au maintien de leur identité de progéniteurs apicaux (Rousso 2012) sans que cette étude fasse mention de l'impact de la répartition des protéines.

Le Centrosome : La cellule fille dont le centrosome hérite du centriole de la cellule mère va préférentiellement rester dans la ZV et garder un caractère prolifératif. A l'inverse, la cellule héritant du nouveau centriole, se différencie et quitte la zone prolifération (Wang 2009). De façon intéressante, les cellules héritant du centriole jeune reformeront un cil sur leur membrane basolatérale et ce avec une fréquence croissante au cours de la progression de la neurogenèse, ce qui favoriserait la délamination (Wilsch-Brauninger 2012).

Le cil primaire : Le centriole maternel retient la membrane du cil primaire qui est elle-même asymétriquement répartie. Ce mécanisme de rétention de la membrane du cil permettrait une reformation plus rapide du cil primaire dans la cellule cyclante. La membrane du cil est héritée de manière asymétrique entre les cellules filles, allant préférentiellement à la cellule proliférative (Paridaen 2013). Le cil étant en contact avec le liquide céphalorachidien, il va ainsi transmettre à la cellule fille qui en hérite des signaux prolifératif comme IGF-1 (Higginbotham 2013).

Voie Notch : La cellule fille exprimant plus fortement les signaux Notch (voir chapitre Contacts entre progéniteurs : la voie Notch) demeure prolifération à l'inverse de la cellule fille avec peu de signaux Notch mais une forte expression de son ligand Delta qui sera délaminée de la surface (Dong 2012). Différents acteurs de la voie NOTCH sont également répartis de façon inégale. Mib-1, qui favorise l'internalisation du ligand DLL1, est conservée par la cellule qui se différencie. De même pour Numb, un antagoniste de la voie NOTCH, qui est préférentiellement hérité par la cellule qui se différencie en IP ou en neurone (Bultje 2009; Kawaguchi 2013). Cette dispersion asymétrique des acteurs de la voie NOTCH est régulée

par PAR3. Ce complexe régule la polarité membranaire et est lui-même hérité de façon asymétrique (Marthiens & ffrench-Constant 2009). Ceci conduit à une asymétrie d'activation de la signalisation NOTCH entre les deux cellules produites.

2.2.2. Domaine basal

Le processus basal des progéniteurs apicaux subit une distribution variable. Il peut être soit hérité par les deux cellules soit conservé par une seule d'entre elle. La rétention du processus basal est associée à un maintien de statut prolifératif pour la cellule (Kosodo 2011). La cellule perdant sont processus basal n'est pas capable d'en former un autre, ce qui favorise sa différenciation en IP ou en neurone (Alexandre 2010). La conservation des processus basaux et apicaux est donc déterminante au maintien du statut de RG (Shitamukai 2011).

2.3. Mécanismes régulant le devenir des progéniteurs neuronaux

2.3.1. Migration nucléaire intercinétique

Au cours du cycle cellulaire des RGs, le noyau effectue un mouvement apico-basal. En G1, le noyau se dirige vers la surface basale puis effectue une phase de synthèse réplicative de son ADN et revient vers la surface apicale où est ancré le centrosome afin d'effectuer la mitose. Ce processus constitue la migration inter-cinétique du noyau (MNI) (Miyata 2014, Figure 19). Plusieurs fonctions ont été attribuées à la MNI mais ces dernières sont cependant sujettes à débat. Tout d'abord, il est proposé que ce mécanisme de MNI permette de maximiser le nombre de NEs et RGs dans un faible volume cortical, et ainsi d'augmenter le nombre de cellules en contact avec le liquide céphalorachidien à la surface apicale. Il a aussi été suggéré que la MNI permettrait d'exposer les noyaux des RGs à différents gradients de déterminants extracellulaires le long de l'axe apico-basal (dont la signalisation NOTCH) (Del Bene 2008, 2010). Enfin, la MNI permettrait de réguler la durée des différentes phases du cycle cellulaire (Miyata 2014).

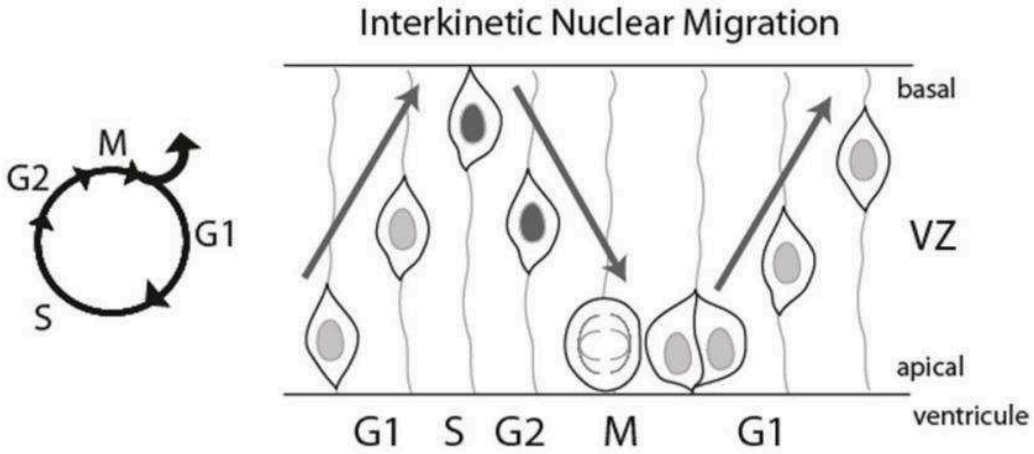


Figure 19 : Représentation schématique de la migration inter-cinétique des noyaux des progéniteurs apicaux.

Le contrôle mécanique de la MNI passe par l'activité de différents par différents composants cellulaires et les moteurs moléculaire et acteurs. Le couplage centrosome-noyau est indispensable à la MNI puisque il va permettre au noyau de se déplacer le long des MTs. Le centrosome est couplé au noyau par des MTs périnucléaires qui forment une structure similaire à une cage autour du noyau (Rivas & Hatten 1995). Il a été montré que la protéine Hook3, en interagissant avec PCM1 (Pericentriolar material 1) régule le mouvement apical (Ge 2010). La déplétion de PCM1 ou Hook3 entraine une déplétion du nombre des aGRs au profit d'une différentiation neuronale précoce (Ge 2010). De plus, Il est désormais établi que l'association des microtubules et de la dynéine est impliquée dans la migration apicale du noyau via CDK1, qui permet sont recrutement et d'initier la migration apicale en G2 (Baffet 2015). En bon accord, dynactine-1 inactivée dans le poisson zèbre induit migration basale rapide et une migration apicale ralentie (Del Bene 2008). L'inactivation des complexes protéiques permettant le couplage du noyau et des microtubules (SUN1/2 et Syn/Nesprin) induisent des défauts de MNI (Zhang 2009, Figure 20).

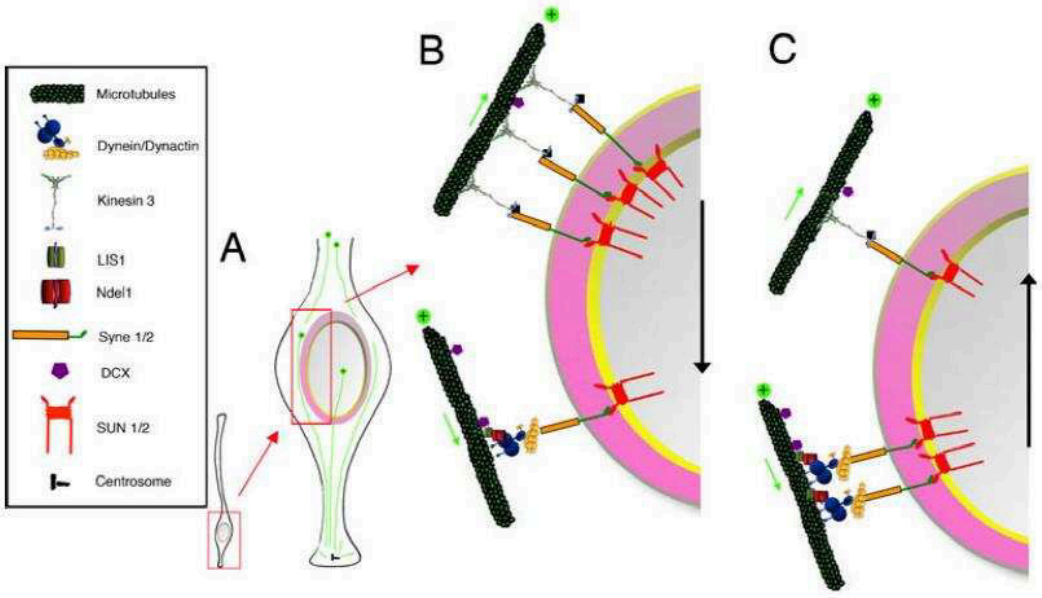


Figure 20 : Moteur moléculaire et adaptateur permettant le couplage noyau-microtubules

Cependant, les forces contribuant à la migration basale font toujours l'objet de controverse. En effet, des études ont mis en évidence la participation de la kinésine-3 (Kif1a) dans le mouvement nucléaire en G1 induisant une réduction de la différentiation neuronale (Ge 2010). Cependant, l'hypothèse que des forces passives générées par l'environnement cellulaire

chargé favoriseraient le mouvement basal a aussi été émise (Kosodo 2011). L'inhibition de la MNI en présence de Blebbistatine, un inhibiteur de la myosine II, interfère avec le mouvement basal en G1 suggérant un rôle de la Myosine II dans la migration basale passant par la contraction d'un anneau d'actine (Schenk 2009). Il est intéressant de mentionner que ce mouvement en G1 est stoppé dans la partie la plus basale de la ZV par les neurones nouvellement différenciés qui forment une barrière physique dans la ZSV (Watanabe 2018).

Durant le développement cortical, la modulation de la durée du cycle cellulaire des aRGs (et plus particulièrement les phases G1 et S) ont été corrélées au devenir cellulaire des progéniteurs. Ainsi, la surexpression de Tis21, un inhibiteur de la transition G1-S, entraîne une neurogénèse précoce. La durée de phase G1 évolue au cours du développement et son allongement est associé à un devenir neurogénique (Lange 2009; Pilaz 2009). De plus, l'allongement de la phase S, à l'inverse de la phase G1, est en faveur de la prolifération. En effet, la cellule accorde plus de temps à la réplication afin d'éviter les erreurs ou de les corriger (Arai 2011).

Enfin, il est intéressant de noter que le lien entre MNI et cycle cellulaire reste encore peu connu. Seules quelques données montrent qu'après l'inhibition du mouvement apical n'a pas d'effet sur la progression du cycle cellulaire, suggérant que la MNI n'est pas indispensable à la progression du cycle (Baye & Link 2008). L'étude inverse a récemment été réalisée : Le raccourcissement expérimental de la durée du cycle cellulaire (par surexpression de la cycline E) dans les aRGs conduit à des changements de la MNI montrant que cette migration est soumise à des contraintes liées au cycle cellulaire (Fousse 2019).

2.3.2. Le pied apicale

2.3.2.1. Les jonctions apicales

Les jonctions apicales sont des structures ancrées à la membrane faisant l'interface entre cellules à la membrane apico-latéral (Chou 2018). Elles contiennent deux types de jonctions (*i*) les jonctions serrées et (*ii*) les jonctions adhérentes (AJ). Premièrement, les jonctions serrées ZO1 (pour *Zonula Occludens 1*). Elle forme une ceinture de jonction qui permet de clore l'espace inter-membrane et assure l'étanchéité entre la matrice extracellulaire et le liquide céphalorachidien. ZO1 se situe sur la portion la plus apicale du domaine apicale (Marthiens & ffrench-Constant 2009). Deuxièmement, les jonctions adhérentes situées au-dessus des jonctions sérrées sont constituées de N-cadhérine (NCAD). Les NCAD forment une ceinture autour de la cellule et assure les contacts cellulaires (Chou 2018). PAR3 colocalise avec la NCAD, ZO1 et la β-caténine dans le domaine apical. PAR3 contribue au

maintien de la polarité apicale (Bultje 2009). Les jonctions adhérentes NCAD subissent un recyclage permanent à la membrane apico-latéral sous le contrôle du complexe PAR3/aPKC. Au cours d'une division asymétrique, le domaine PAR3 est inégalement distribué entre les cellules filles. La cellule qui garde PAR3 reste proliférative (Figure 21).

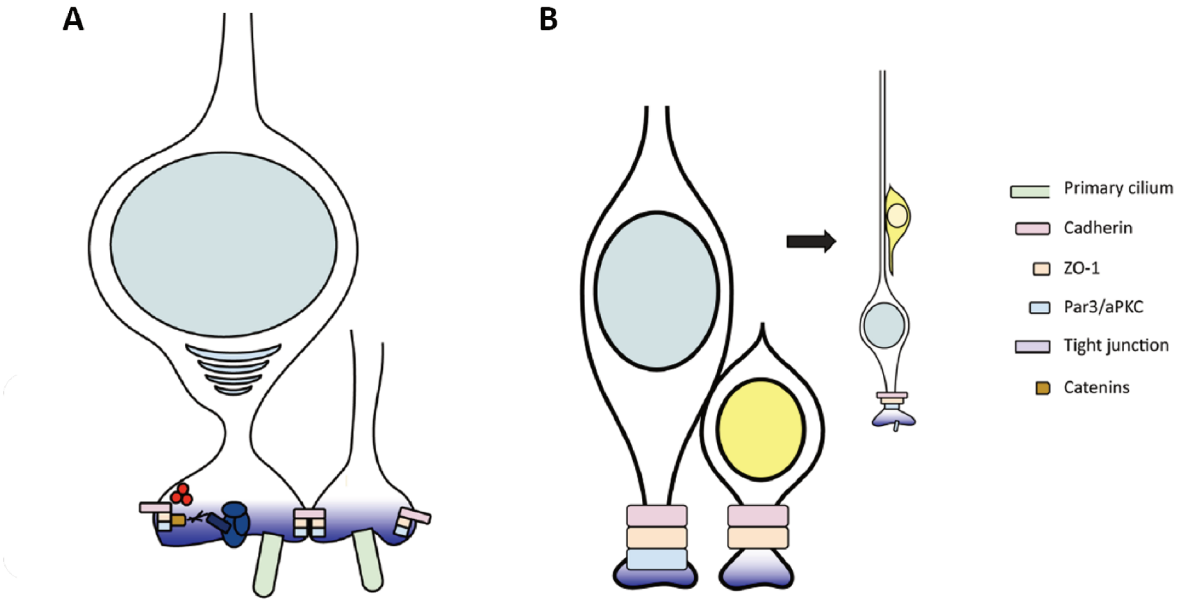


Figure 21 : Distribution des jonctions adhérentes avant et après une division asymétrique.

La perte de Cdc42 entraîne une conversion des CRGs en IPCs, ainsi qu'une augmentation de la différentiation en neurones (Cappello 2006). *In vivo*, la délétion de Cdc42 interfère avec la MNI suggérant que la perte des AJs peut être responsable de défauts lors de la migration apicale des noyaux des aRGs (Cappello 2006).

L'inactivation de la β-Cat dans des modèles murins entraîne la perte des AJs et un arrêt de la MNI (Machon 2003). La perte des jonctions apicales conduit à la délamination des progéniteurs et leur différenciation. Par exemple, l'inactivation génétique de la NCAD au cours de la prolifération contribue à la délamination des aRG (Kadowaki 2007). De me meme que sa déplétion par RNAi conduit à la délamination (Zhang 2010). La NCAD empêche la dégradation de la β-caténine. La NCAD favorise l'activation de la β-caténine par AKT et empêche la délamination des progéniteurs. La déplétion en β-caténine conduit au même effet de délamination (Woodhead 2006).

La MNI est également altéré chez les souris *Pax6*$^{Sey/Sey}$, dont le facteur de transcription Pax6 n'est plus fonctionnel, en raison d'une augmentation de la délamination des CRGs. Cette délamination semble provenir d'une diminution de l'expression de N-cadhérine (Stoykova 1997), de la β-Cat et du complexe Par, qui sont tous des cibles directes de l'activité transcriptionnelle de Pax6 (Asami 2011). Une altération de la MNI a également été observée

chez les rats *Pax6*$^{Sey/Sey}$ (Tamai 2007) et confirmée dans l'étude d'Asami sur le modèle murin. Des jonctions communicantes sont présentes au niveau du pied apical des aRGs (Liu 2010). Elles sont impliquées dans l'initiation, le transfert et l'amplification des signaux Ca^{2+} via le relargage d'ATP et génèrent des oscillations dans les niveaux de Ca^{2+} dans les CRGs. Les signaux Ca^{2+} pourraient moduler la MNI en affectant l'assemblage des MTs ou par la transcription de gènes via l'activation de Cdc42. Le blocage de ces jonctions communicantes ralentit le mouvement nucléaire en G2, qui s'accompagne d'une augmentation de la phosphorylation de Cdc42 (sa forme inactive).

2.3.2.2. Le cil primaire

Le cil primaire est un appendice sensoriel présent à la surface apicale des NEs et RGs. Il joue un rôle important dans la captation des signaux diffusibles présents dans le liquide céphalorachidien et la progression dans le cycle cellulaire. Les mutations qui altèrent sa structure ou ses fonctions contribuent à l'apparition de ciliopathies, de malformations cérébrales et de maladies dégénératives (Youn & Han 2018). Il constitue un HUB pour les voies de signalisation régulant la neurogenèse dont SHH, WNT, NOTCH et TGF, pour lesquelles un trafic des différents récepteurs et cibles s'articulent autour et dans le cil primaire (Pedersen 2016, Figure 22).

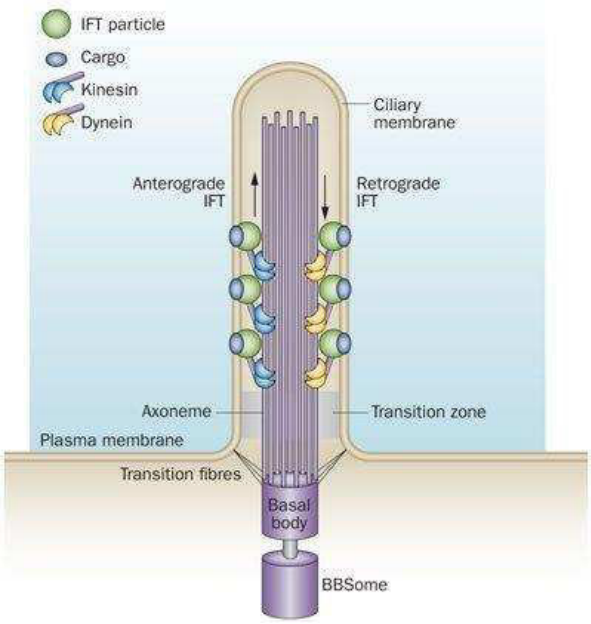


Figure 22 : Anatomie du cil primaire et organisation du transport

Le cil primaire est constitué de 9 doublets de microtubules qui forment l'axonème émanant du centriole mature maternel. L'axonème sert de support au transport antérograde assuré par la Kinésine 2 et rétrograde assuré par la Dynéine 2. Ces moteurs se lient à différents cargos via des protéines adaptatives intraflagellaires de transport (IFT). Les IFT forment 2 complexes principaux IFT-A et IFT-B composés d'au moins 22 protéines (Taschner 2016). La BBS (protéine mutée dans le syndrome de Bardet-Biedl) contrôle l'assemblage et le recyclage des IFT entre l'extrémité et la base du cil, ainsi que le transport de protéines membranaire du cil (Nachury 2007).

Le cil est une structure typiquement interphasique présente en G1 puis désassemblée pendant la phase S et G2 en prévision de la mitose (Youn & Han 2018). Avant d'entrer en mitose, la cellule doit désassembler son cil primaire, le centrosome étant nécessaire à la formation du fuseau mitotique. Il constitue donc une barrière à la progression du cycle cellulaire.

Le cil peut se positionner à la membrane apicale ou à la membrane basolatérale (Wilsch-Brauninger 2012). La proportion d'aRG avec un cil en position basolatérale est quadruplée entre les stades précoces et tardifs de la neurogenèse, ce qui suggère un rôle dans la différenciation. La surexpression de la protéine INSM1, une protéine contribuant à la différenciation des progéniteurs, favorise la localisation basolatérale dans les progéniteurs. La position basolatérale du cil est considéré comme un prérequis à la délamination opérée par les progéniteurs apicaux en cours de la différenciation (Wilsch-Brauninger 2012).

La HTT est un régulateur de ciliogenèse. Sa déplétion conduit en effet à une atrophie du cil primaire tandis que sa mutation a été associée à une hypertrophie du cil (Haremaki 2015; Keryer 2011). La HTT mutée contribue notamment à délocaliser les IFT-57 et IFT-88 (Karam 2015). IFT 57 fait partie du complexe IFT-B s'associant aux microtubules contribuant au trafic bidirectionnel dans le cil (Taschner 2016).

2.4. Facteurs intrinsèques et extrinsèques

2.4.1. Les facteurs intrinsèques

2.4.1.1. Régulation de la transcription

Un grand nombre de facteurs de transcription sont impliqués dans le devenir des progéniteurs corticaux. Un de ces facteurs les plus étudiés est et Pax6 apparait comme un régulateur central de la neurogenèse embryonnaire (Ypsilanti & Rubenstein 2016). Des études suggèrent que ce facteur de transcription, fortement exprimé chez les APs, activerait la transcription du

facteur Neurogenin2 (Ngn2) qui promeut la transition des aRGs en BPs, qui en retour vont exprimer spécifiquement le facteur de transcription Tbr2 (Kowalczyk 2009).

Le complexe REST/NSRF est connu pour réprimer les gènes pro-neuraux dans les lignées non neurales. Il est également apparu comme un régulateur important dans la progression de la différentiation neuronale. En effet, la différenciation en neuroblaste puis en neurone implique une diminution progressive de la fixation de REST aux gènes pro-neuraux (Ballas 2005; Zhao 2017). Le prolongement de son expression conduit ainsi à un retard de maturation des neurones corticaux mais aussi à des défauts de migration (Mandel 2011). Plus récemment, le complexe REST/NRSF a été impliqué dans le remodelage de la chromatine nécessaire au déroulement de la phase de synthèse du cycle cellulaire dans les progéniteurs neuronaux (Nechiporuk 2016). Son inactivation génétique induit une neurogenèse précoce et un amincissement du cortex cérébral. Ces défauts sont induits à cause de remodelage chromatinien conduit à des cassures dans l'ADN, les neurones générés subissent une apoptose (Nechiporuk 2016).

De façon intéressante, l'expression de NeuroD1 est réduite dans lignées porteuses de la mutation de la HTT tandis que REST est lui surexprimé. Ces modulations d'expression génique ont été observées en comparant des lignées neuronales induites humaines non pathogéniques et pathogéniques portant différentes expansions polyQ (The HD iPSC consortium 2017)

2.4.1.2. Les facteurs épigénétiques

Les modifications épigénétiques, telles que la méthylation de l'ADN et les modifications des histones, ont été montrées comme étant des facteurs clés le contrôle temporel et spatial de l'expression génétique au cours de la neurogenèse (Yao 2016). Il a été observé qu'au cours de la neurogenèse, la condensation varie en fonction du stade de développement : Ainsi, la chromatine se condense progressivement dans les progéniteurs faisant que les progéniteurs précoces présentent une chromatine plus condensée que les progéniteurs tardifs (Kishi 2012). La méthylation de l'ADN permet d'inhiber l'expression de gènes. A titre d'exemple, le promoteur du gène *GFAP* (marqueur des cellules des astrocytes) est méthylé pendant la neurogenèse précoce ce qui empêche la génération d'astrocyte. La déméthylation du promoteur de GFAP est induite par la dissociation des DNA-methyl Transférase (DNMT) du promoteur (Namihira 2009). La dissociation des DNMT est initiée par une activation de la voie Notch et implique NF1A qui lève l'interaction DNMT-ADN.

La protéine HMGA (pour *High Mobility Group*), dont l'expression diminue pendant la neurogenèse, est requise dans les stades précoces pour maintenir la chromatine décondensée et module l'expression de différents gènes régulant le devenir cellulaire. De plus, le complexe PRC2 (pour polycomb repressor complex 2)permet la tri-méthylation de l'histone H3 réprimant l'expression génétique des gènes adjacents par le recrutement de co-represseur et compacte la chromatine (Hirabayashi 2009). Son inactivation conduit à une production précoce de neurones des couches superficielle et d'astrocytes (Telley 2019). L'évolution des régulations épigénétique est en lien avec la génération des différents sous-types de neurones à laquelle contribue PRC2 (Telley 2019).

2.4.1.3. Ubiquitination

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle des protéines qui permet l'adressage au protéasome et la dégradation des protéines ubiquitinylés. La balance entre ubiquitinylation et déubiquitinylation constitue donc un levier pour contrôler l'activité des facteurs favorisant la prolifération ou la différenciation. Cette activité est régulé par la E3 ubiquitine ligase et les enzymes de déubiquitinations.

Par exemple, TRIM32 (pour *tripartite motif-contraining protein 32*) est une ubiquitine ligase qui régule l'activité du facteur transcription c-Myc favorisant la prolifération. La dégradation de c-Myc est donc nécessaire à la différenciation. TRIM32 favorise sa dégradation et induit la différenciation (Schwamborn 2009). USP7 est une enzyme de déubiquitination qui colocalise avec TRIM32 et stabilise c-Myc pendant la prolifération (Nicklas 2019).

2.4.2. Les facteurs extrinsèques

2.4.2.1. La voie Sonic Hedgehog

Sonic Hedgehog (Shh) est une protéine sécrétée qui diffuse dans le liquide céphalorachidien. L'activation de la voie SHH contribue principalement à maintenir le statut prolifératif des progéniteurs neuronaux (Araujo 2014; Paridaen 2014, Figure 23). Son récepteur patched-1 est localisé à la membrane du cil primaire. L'activation de patched 1par la fixation de Shh lève son inhibition sur la protéine Smoothened (Smo) qui, une fois activée, conduit à l'activation des protéines Gli1, Gli2 et Gli3 qui peuvent réguler l'expression de gènes cibles contrôlant le cycle cellulaire (Yabut & Pleasure 2018). Pour se faire, les protéines Gli sont transportées du cil vers le soma via un transport dépendant des kinésines (Liu 2005). En parallèle, l'accumulation de la forme

active de Smo induit une accumulation de Gli2/Gli3 activé conduisant à leur liaison avec SUFU, un répresseur de la signalisation Shh (Haycraft 2005; Yabut 2015). La signalisation SHH régule la durée du cycle cellulaire des RGs et la production d'IPs (Shikata 2011). Ce phénomène s'explique notamment par le fait que la signalisation SHH contribue à favoriser les divisions symétriques par la transcription du facteur HES1 réprimant la différenciation (Dave 2011). Au cours de la neurogenèse corticale, la signalisation SHH diminue et l'activité répressive de Gli3 augmente, favorisant ainsi la génération d'IP (Wang 2011; Wang 2016). La diminution de signalisation Shh réduit la prolifération des RGs, réduit leur survie et leur capacité à générer des IPs et des neurones (Komada 2012; Komada 2008; Wang 2016).

.

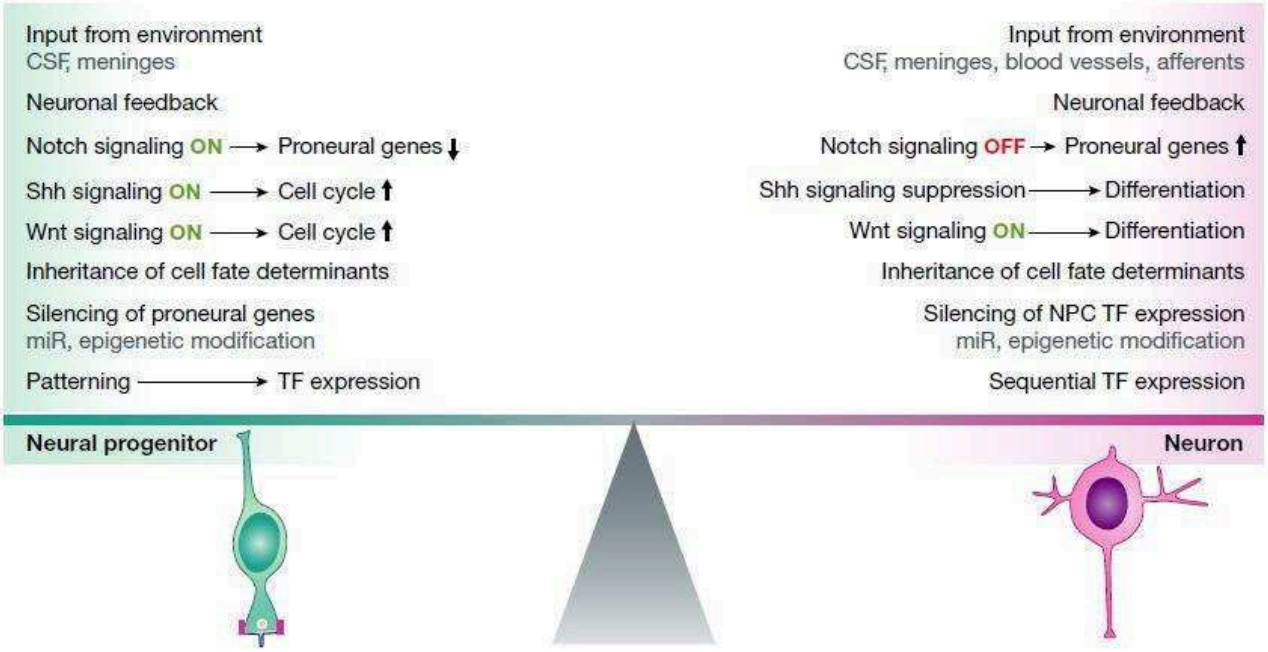


Figure 23 : Schéma récapitulant l'influence des différentes voies de signalisation sur la régulation de la balance prolifération/ différenciation des progéniteurs corticaux. (Paridaen & Huttner 2014)

2.4.2.2. La voie Wingless

La voie de signalisation Wnt (pour *Wingless Integration Site*) est également connue pour réguler la neurogenèse corticale par le contrôle de l'activité de la β-Caténine. Wnt est une famille de glycoprotéines secrétées qui se lient au récepteur Frizzled (Fz) et permettent l'association de Fz et LRP (pour *Lipoprotein receptor-related protein*). Cette association permet le recrutement de Dishevelled et de la kinase GSK3-β (pour, *Glycogen synthase kinase-3-β*) et la phosphorylation de la β-Caténine (Cadigan 2012). En absence de signalisation Wnt, la β-Caténine est dégradée par la voie GSK3-β/APC/CK1. Lorsque la voie

Wnt est active, la β-Caténine est phosphorylée et entre dans le noyau pour réguler la transcription des neurogénines (Hirabayashi 2004). La β-Caténine régule le maintien de la prolifération des progéniteurs (Chenn et Walsh 2003) et la différentiation des progéniteurs en fonction du stade embryonnaire (Hirabayashi 2004). En effet, l'effet de la voie Wnt évolue au cours de la neurogenèse corticale. Dans les stades précoces, l'activation de la voie Wnt favorise la prolifération et retarde la génération de progéniteurs intermédiaires (Figure 24). En revanche, une activation persistante de la voie altère la neurogenèse, en effet l'expression prolongé de β-Caténine active ralentie la transition aRG vers BP (Wrobel 2007). Dans les stades tardifs, elle favorise la production d'IPs et la différenciation neuronale (Kuwahara 2010; Munji 2011). Récemment, il a été montré que les APs subissent une hyperpolarisation progressive au cours de la neurogenèse corticale ce qui conduit à une diminution de la signalisation WNT. L'hyperpolarisation des APs conduit à faciliter la génération d'IPs et de neurones (Vitali 2018).

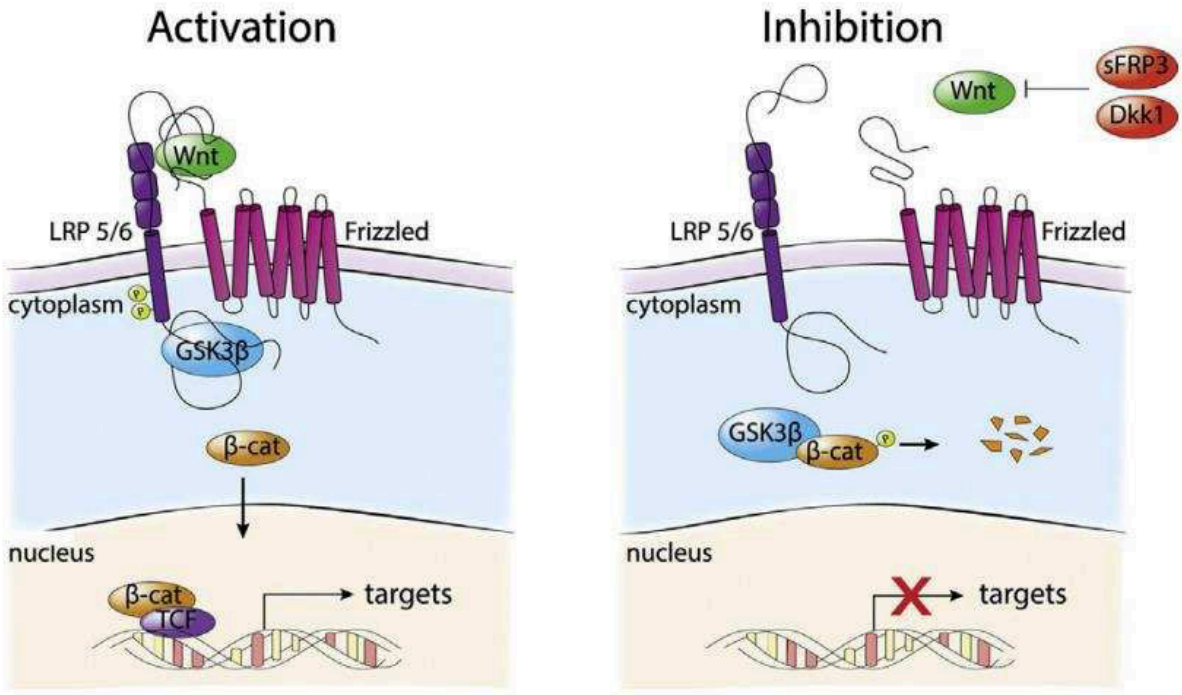


Figure 24 : Représentation simplifiée de la voie de signalisation Wnt canonique

De manière intéressante, La HTT mutée entraine une accumulation de la β-Caténine (Godin 2010) et la neurogénèse précoce observé en condition muté (perte ou gain de fonction pourrait être en partie dû au défaut de dégradation de la β-Caténine (Godin 2010; Molina-Calavita 2014).

2.4.2.3. La voie FGF

La voie de signalisation FGF (pour *Fibroblast Growth Factor*) implique l'activation de 4 récepteurs Tyrosine Kinase (Récepteurs au FGF : FGFR1-4) par plus de 22 ligands différents sécrétés. L'activation des FGFRs contrôle différentes voies intracellulaires qui impliquent les protéines kinases PI3K, AKT, PKC et Ras/Erk1/2 (Ornitz 2015), voies dans lesquelles la HTT est impliquée (Humbert 2002). L'inactivation conditionnelle de la voie FGF dans le cortex en développement conduit à une réduction de la surface corticale proliférative, associée à un épuisement des progéniteurs et à une génération précoce de neurones (Rash 2011). De plus, la voie FGF module l'activité de la β-Caténine: en effet, cette dernière favorise la prolifération des progéniteurs en présence de FGF2 tandis qu'elle favorise leur différenciation en son absence (Israsena 2004).

2.4.2.4. L'acide rétinoique

L'acide rétinoïque (AR) est facteur diffusible sécrété par les méninges et les plexus choroïdes. L'AR est synthétisé à partir de la vitamine A par les enzymes Retinol Deshydrogenase (RDH), dont l'expression coïncide avec la corticogenèse (Siegenthaler 2009). L'AR produit par les méninges réduit la prolifération des RGs en limitant l'expansion latérale de cette population et favorise la génération d'IPs et la différenciation neuronale (Siegenthaler 2009). L'inactivation de RDH10 (conduisant à une diminution d'AR) induit quant à elle une diminution du nombre de progéniteurs dans les stades précoces mais n'affecte pas leur prolifération. Il est proposé que l'AR régule l'équilibre entre neurogenèse direct et indirect. L'AR régulerait l'expression de INSM1 et CDK2, tous deux contrôlant la transition vers une neurogenèse indirect et la génération d'IP (Haushalter 2017). L'inactivation conditionnelle de RDH2 à partir de E12.5 induit des défauts de lamination corticale imputés à un défaut de transition multipolaire-bipolaire des neurones des couches superficielles (Haushalter 2017).

2.4.3. Environnement de la zone ventriculaire

2.4.3.1. Contacts entre progéniteurs : la voie Notch

La voie de signalisation Notch est essentielle pendant la neurogénèse et va réguler la différentiation par un processus appelé « inhibition latérale » (Agirman 2017). La voie Notch favorise ainsi la prolifération des RGs et inhibe leur différenciation en neurones (Figure 25).

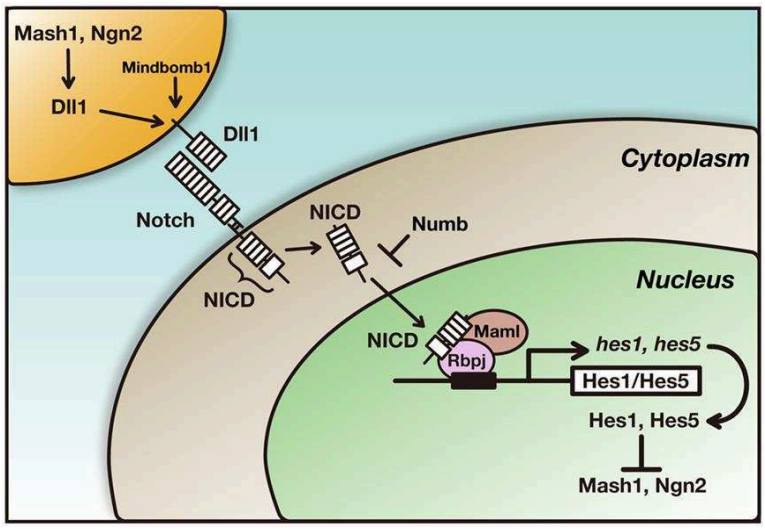


Figure 25 : Intégration de la signalisation Notch (Shimojo 2011).

L'activation de la voie Notch se fait par l'interaction intercellulaire entre le récepteur de Notch et ses ligand (Delta like, DLL et Jagged). Cette interaction induit le clivage de la partie extracellulaire du NOTCH par ADAM10 et sa partie intracellulaire par la y-secretase, ce qui libère le domaine intracellulaire du récepteur NOTCH (NICD). NICD transloque alors vers le noyau où, en s'associant à CBF1 et RBPJ, il initie l'expression des facteurs de transcription HES. Ces derniers répriment l'expression des gènes pro-neuraux Neurogenine-2 et MASH1, mais aussi leur propre expression induisant une oscillation de leur expression (Imayoshi 2013; Kageyama 2008). Il est intéressant de noter qu'ADAM10 est hyperactif en présence de HTT absence de HTT qui régule donc son activitée (Lo Sardo 2012).

Dans la ZV, l'expression de Notch est enrichie au niveau apical alors que son ligand, Delta, est plus exprimé au pôle basal (Latasa 2009). La présence des noyaux à la surface apicale expose les cellules à de forts signaux Notch alors que sa position basale de faibles signaux Notch et l'entraîne donc dans la voie de la différentiation. Ces données suggèrent que la signalisation Notch est activée de manière dépendante du cycle cellulaire (Tokunaga 2004) et donc de la MNI. Il a été montré que la voie Notch et Par3 interagissent puisque la cellule fille qui hérite majoritairement de Par3 va activer plus fortement la voie Notch et demeurer proliférative (Bultje 2009).

De plus, la concentration de cellules serait elle aussi en jeu puisque les RGs ayant leurs noyaux au contact des neurones se différencient préférentiellement. Il est proposé que: (i) la cellule est capable de sentir la haute densité cellulaire, et/ou (ii) la voie Notch intervient et favorise la différenciation (Hiscock 2018).

De plus, les IPs et les neurones post-mitotiques expriment DLL1 et participent à garder les RGs à l'état prolifératif (Guillemot 2005; Yoon 2008; Lui 2011). Mindbomb-1 (Mib1) est une protéine qui régule l'endocytose et le trafic de DLL. Sa déplétion conduit à une neurogenèse précoce (Yoon 2008). Mib1 est asymétriquement distribué lors des divisions neurogénique par son interaction avec le matériel péricentriolaire (PCM) et son adressage au centriole fille (Tozer 2017).

2.4.3.2. Feedback des neurones post-mitotiques

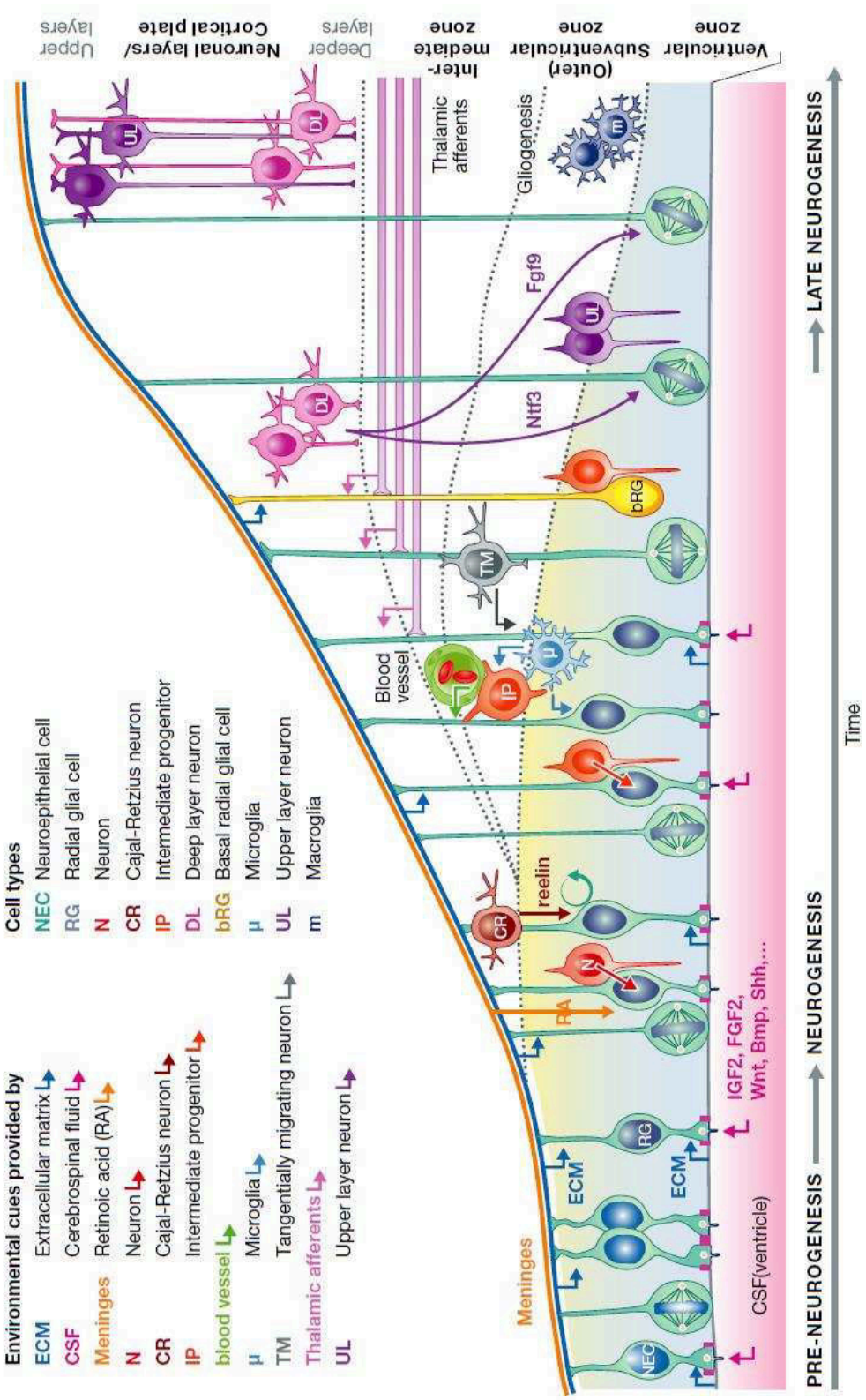
Les neurones post-mitotiques émettent des signaux qui régulent la neurogenèse. Les cellules de Cajal-Retzius produisent la Reelin (RELN) qui régule la migration des neurones post-mitotique (voir chapitre Mécanisme moléculaire régulant la migration). En parallèle, la RELN régule la prolifération des progéniteurs neuronaux en stimulant la voie Notch et favorise la prolifération dans les stades précoces du développement (Lakoma 2011).

Les neurones post-mitotiques des couches profondes générés à partir des aRG et BP émettent eux aussi des signaux dirigés vers les progéniteurs. Ils expriment notamment le FGF9 et la neurotrophine 3 (Ntf3) qui régulent le devenir cellulaire et la transition des aRG vers la production d'astrocytes. Le facteur de transcription SIP1 est lui aussi produit par les neurones post-mitotiques, l'inactivation de la production induit une production précoce de neurones des couches superficielles et une production d'astrocytes (Seuntjens 2009). SIP1 contribue à réguler l'expression de FGF9 et Ntf3.

2.4.3.3. Action de la microglie et des vaisseaux sanguins sur la différenciation

Il a été montré que les BP suivent et s'amassent autour des vaisseaux parcourant la SVZ. Il a donc été proposé que le cortex et les vaisseaux sanguins se développant en même temps, les vaisseaux sanguins apportent des signaux et les nutriments nécessaires au développement des BP (Javaherian & Kriegstein 2009). En parallèle, la fibre basale des aRG sert de support à la croissance des vaisseaux sanguins dans le cortex en développement (Ma 2013).

La microglie est présente à E11.5 dans le cortex en développement (Antony 2011). La microglie est présente dans la VZ et SVZ pendant la neurogenèse où elle à un double rôle. Elle régule le nombre de progéniteur par phagocytose (Cunningham 2013). L'inactivation de la microglie induit une augmentation du nombre de progéniteurs. A l'inverse, l'activation de la microglie avec des lipopolysaccharides induit une diminution du nombre de progéniteurs. La microglie est aussi impliquée dans la synthèse de facteurs trophique favorisant la survie des progéniteurs (Ueno & Yamashita 2014).



<u>Figure 26 :</u> Schéma bilan des différents facteurs extrinsèques auxquels sont exposés les progéniteurs pendant la neurogenèse (Paridean & Huttner 2014).

3. Les neurones post-mitotiques

3.1. Le modèle d' « inside-out »

Nous avons vu que les progéniteurs neuronaux produisaient les neurones corticaux excitateurs selon différents modes de division, nous allons maintenant aborder le mode de génération des différentes couches de neurones corticaux excitateurs. Ces neurones sont générés par vagues de division neurogénique des progéniteurs à partir de E11.5 jusqu'à E17.5. La neurogenèse corticale dure 6 jours et culmine à E14.5. La première vague de neurones générés à E11.5 forme la pré-plaque (Molyneaux 2007). La vague suivante passe au travers de la pré-plaque (PP) et de la plaque corticale (PC). La PP devient alors la sous-plaque corticale (SP) qui délimite les régions prolifératives de la CP. Les neurones produits par la suite migrent vers la zone marginale de la CP (Kriegstein et Noctor 2004). Ce mode de génération est appelé modèle « inside-out » (Rakic 1974). A chaque nouvelle vague de neurones générés, les neurones migrent et traversent la couche précédente. Les neurones destinés à une couche sont produits dans une fenêtre de temps donnée et colonisent la zone marginale distale à chaque vague formant ainsi une nouvelle couche. Ainsi, les couches profondes sont générées en premières et les couches superficielles en dernières (figure 27).

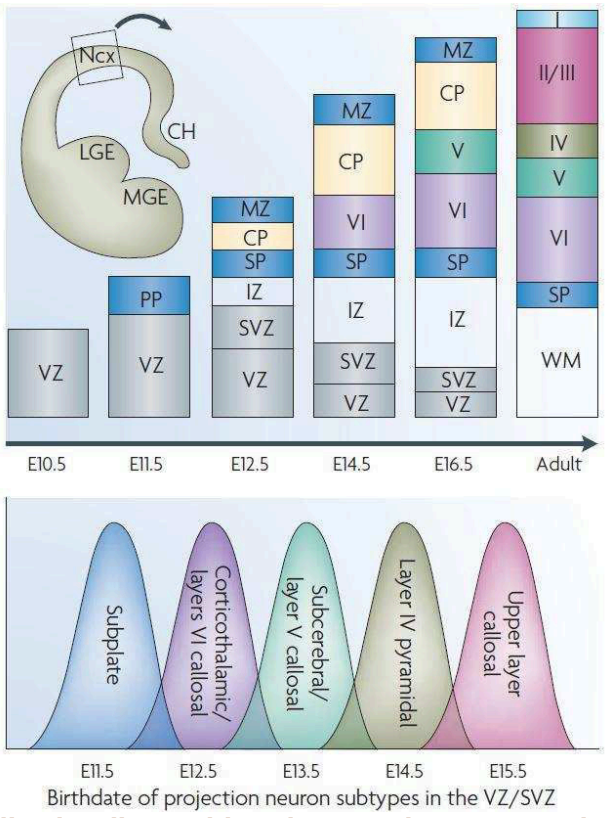


Figure 27 : Schéma de l'ordre d'apparition des couches neuronales du cortex cérébral (Molyneaux 2007)

3.2. Générer la diversité neuronale

Durant le neurogénèse embryonnaire, les différents sous-types neuronaux formant les couches corticales sont générés selon un modèle « inside-out » : Les neurones formés le plus précocement vont occuper les couches profondes alors que les derniers vont migrer à travers les couches nouvellement formées et coloniser les couches superficielles (Rakic, 1974). Etant donnant que la totalité de ces neurones proviennent des progéniteurs corticaux (apicaux et basaux), la compréhension des mécanismes régulant leur spécification, ainsi que leur diversité, a fait l'objet d'intenses recherches et de débats. .

Historiquement, il était admis que le destin laminaire des neurones était déterminé, en partie, par leur date de naissance (en plus de la phase du cycle cellulaire dans lequel le progéniteur se trouve) (McConnell & Kaznowski 1991). Ainsi, dans le furet, la transplantation de progéniteurs précoces dans un cortex au stade de développement plus avancé a montré que les cellules filles des progéniteurs transplantés (si lis sont en phase S) migrent vers la couche 2/3, tout comme les neurones hôtes. Ces données montrent que les facteurs environnementaux sont d'importants déterminants du destin laminaire, mais que les progéniteurs subissent des changements cycliques dans leur capacité à répondre à de tels signaux. Cependant, l'expérience inverse, à savoir l'implantation de progéniteurs tardifs dans un cortex en stade développement précoce, a montré que ces progéniteurs ont une capacité réduite à générer des neurones des couches profondes, suggérant ainsi que le devenir cellulaire est intrinsèque de ces progéniteurs et ne dépend pas de l'environnement (Frantz 1996).

Plus récemment, Il a été montré qu'un sous-groupe de progéniteurs exprimant le facteur de transcription CUX2 (pour *Cut Like Homeobox 2*) produisent des neurones des couches superficielles et ce, indépendamment du stade de développement et de l'environnement (Franco 2012). Ces progéniteurs produisent principalement des neurones exprimant SATB2 (pour *Special AT-rich sequence-binding protein-2*, un marqueur de neurones à projections callosales) et non CTIP2 (*chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-interacting protein 2*, marqueur des neurones de la couche V) (Gil-Sanz 2015). Néanmoins, ces travaux sont contredits par d'autres études montrant le caractère pluripotent des cellules exprimant CUX2. En effet, Guo et coll. ont identifié le marqueur FEFZ2 comme exprimé par des progéniteurs multipotents, et suggèrent que les cellules CUX2-positives soit des interneurones migrant dans la VZ/SVZ. Ils montrent aussi que les aRGs exprimant CUX2 contribuent à générer les différentes couches (Eckler 2015; Guo 2013). Il a été également proposé les APs murins, contrairement au furet, restent multipotents tout au long de la neurogenèse. Les AP tardifs étant capables de donner des neurones des couches profondes

et donc de reprogrammer leur état transcriptionel (Oberst 2018). Un autre modèle, plus récent, suggère l'acquisition graduelle du devenir cellulaire et propose que les progéniteurs progressent de façon dynamique et séquentielle dans différents états transcriptionnels au fur et à mesure du développement (Telley 2019). En utilisant le séquençage des ARNm sur cellules uniques, les auteurs ont mis en évidence des « trajectoires » transcriptionnelles différentielles des progéniteurs apicaux tout au long du développement cortical : Ainsi, en début de développement, les progéniteurs présentent une signature transcriptionnelle soulignant l'importance des mécanismes intrinsèques (liés au cycle cellulaire et au remodelage de la chromatine) alors qu'à des stades plus tardifs, la sensibilité des progéniteurs apicaux aux signaux environnementaux augmente, comme en témoigne l'expression accrue des récepteurs membranaires, des protéines de signalisation cellulaire et des protéines liées à l'excitabilité (Figure 28). Il est également proposé que ces signatures transcriptionnelles et spécifiques du stade de développement va agir dans les neurones post-mitotiques pour produire la diversité neuronale adulte.

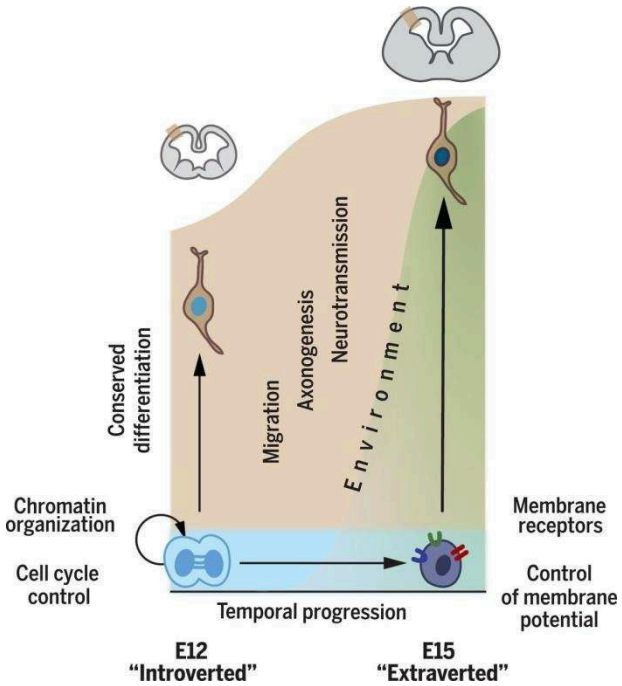


Figure 28: Acquisition graduelle du devenir cellulaire et transition introvertie vers extravertie (Telley 2019)

Les progéniteurs basaux, exprimant spécifiquement le facteur de transcription TBR2 (pour *T Box-protein brain 2*) (Englund 2005) ont longtemps été considérés comme source principale des neurones des couches superficielles (Englund 2005). Cependant, il a récemment été observé qu'ils pouvaient générer tous les sous-types de neurones, notamment ceux des des couches profondes (Mihalas 2016). De plus, une étude plus récente montre que 90% des IPs

participent à la génération des couches profondes soulignant le caractère multipotent de ces progéniteurs (Mihalas & Hevner, 2018).

3.3. La migration neuronale

Après différentiation, les neurones entament leur migration afin d'atteindre leur destination finale dans le future néocortex. Ces neurones effectuent la migration radiale qui se décline en deux modes : la translocation et la locomotion.

3.3.1. La translocation somatique

Au cours des premiers stades du développement cortical (de E11.5 à E13.5), les neurones post-mitotiques effectuent une migration radiale afin de former la plaque sous-corticale et la couche VI. Ces neurones conservent la fibre piale de la cellule mère qui sert de processus guidant (Noctor 2004). Ces neurones migrent alors en transloquant le soma en direction de la fibre piale d'où le nom de translocation somatique (Miyata 2001).. Le processus guidant explore l'environnement ; il s'accroche à la glie environnante de la surface piale, moment où le noyau transloqu vers le processus guidant (Sekine 2011). Les neurones migrant via la locomotion (voir section suivante) terminent leur migration radiale par une translocation somale qui suit les mêmes étapes.

3.3.2. La locomotion

Les neurones générés plus tardivement au cours du développement cortical n'héritent pas de la fibre piale. De plus, ils sont plus éloignés de leur destination et doivent traverser la plaque corticale constituée des neurones précédemment générés. Ils adoptent donc un mode de migration par locomotion le long des fibres des cellules gliales adjacentes. Cette locomotion se divise en 4 phases (Noctor 2004).

-Le neurone migre vers la zone sous-ventriculaire.

- le neurone perd sa polarité apico-basale et devient multipolaire. Sa morphologie est alors très dynamique : il émet et rétracte plusieurs extensions vers les zones sous-ventriculaire et intermédiaire.

Le neurone retourne à la surface apicale. Ce retour n'est pas systématique mais concerne la plupart des neurones.

- Le neurone adopte une morphologie bipolaire avec un long processus guidant dirigé vers la surface basale et un processus court dirigé vers la surface piale. Sa migration commence alors le long des fibres gliales.

Ces quatre phases sont suivies par une translocation somale terminale au moment où le processus guidant atteint la surface piale. A ce moment, le neurone se détache des fibres gliales (figure 29).

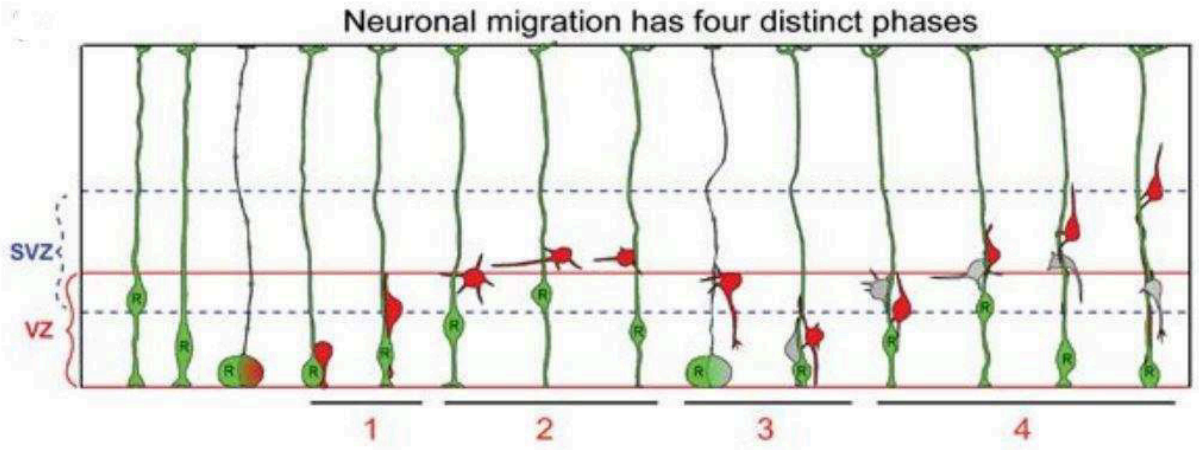


Figure 29 : Représentation de la migration radiale en 4 phases (Noctor 2004)
Phase 1 : le neurone se déplace vers la SVZ. Phase 2 : le neurone entame sa transition multipolaire. Phase 3 : le neurone retourne à la surface ventriculaire et adopte une morphologie bipolaire. Phase 4 : le neurone effectue une migration radiale le long des fibres de la glie.

3.3.3. La nucléokinèse

La migration radiale est caractérisée par des remodelages intenses du cytosquelette neuronal. Les microtubules (MTs) émanent du centrosome (extrémité «-») qui se situe dans le processus guidant (en avant) (Tanaka 2004). Le centrosome est en permanence couplé au noyau à travers un réseau de MTs qui enveloppe le noyau dans une « cage » (Xie, 2003). (Tanaka 2004; Xie 2003) (Rivas & Hatten 1995). En parallèle, l'actine forme réseau avec la myosine II sous et en avant du noyau (Solecki 2009). Lors de la migration par locomotion, la nucléokinèse s'opère en deux temps : le processus guidant se dilate reflétant une traction du centrosome par les dynéines en avant. Cette première traction du centrosome émet une force qui propulse le noyau via la cage de microtubule vers le centrosome. Ensuite, une contraction du réseau d'acto-myosine propulse le noyau vers le centrosome permettant son avancée (Kawauchi 2015).

3.3.4. Les mécanismes moléculaires régulant la migration neuronale

La migration neuronale est un processus complexe et hautement régulée puisque le neurone doit se déplacer de manière dirigée afin d'atteindre sa destination finale dans le futur cortex. Ainsi, le neurone explore l'environnement pour y recenser les facteurs attractifs et/ou répulsifs et transduisent le signal des molécules environnantes, qui permettra aux neurones d'orienter leur migration (figure 30).

3.3.4.1. Régulation de la dynamique des microtubules

La tubuline

Les gènes TUBA1A, TUBB2B et TUBB3 qui codent pour l'isoforme de tubuline α-1A, tubuline β-2B et tubuline β-3, respectivement associés à plusieurs maladies neurodéveloppementales dont lissencéphalies et polymicrogyries (Jaglin 2009; Keays 2007; Kumar 2010). Plusieurs de ces mutations conduisent à des défauts dans la formation d'hétérodimères de la tubuline, de leur repliement, de leur dynamique et/ou interaction avec d'autres protéines associées aux MTs (DCX, kinésines) (Tian 2008, 2010). Des approches basées sur la technique d'électroporation in utero, modèles murins mimant ces mutations ont montré défauts migration.

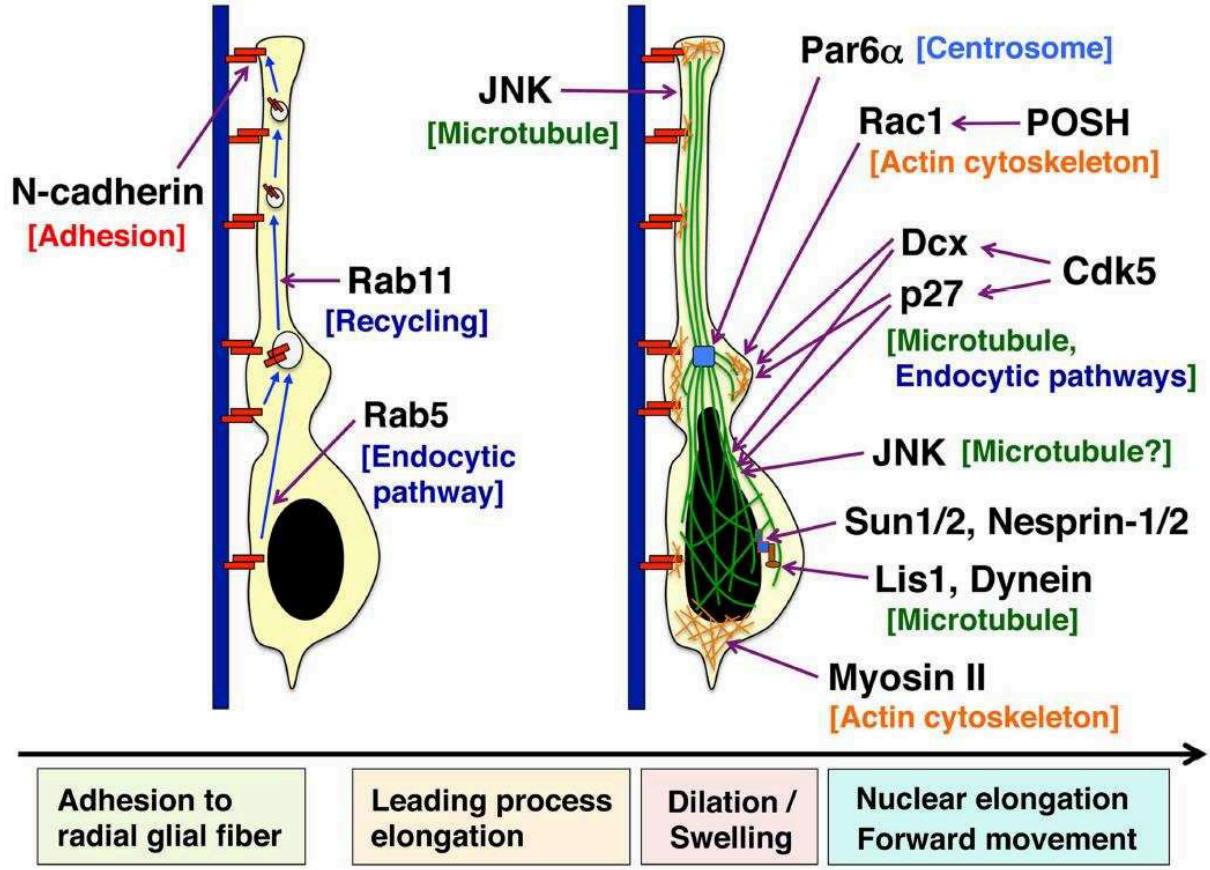


Figure 30 : Schéma récapitulatif des différents acteurs de la régulation de la migration neuronale (Kawauchi 2015)

Le complexe Lis1 /Ndel1/Dynéine

La mutation de la protéine Lis1 (Lissencephaly-1) est une cause de lissencéphalie chez l'humain (Reiner 1993). L'étude de ses fonctions a révélé qu'elle était indispensable à la migration neuronale. Ainsi, l'inactivation de Lis1 par électroporation in utero via RNAi conduit à l'accumulation de neurones multipolaires dans la zone sous-ventriculaire (Tsai 2007).

L'analyse des modèles Knock-out pour Lis1 et l'étude de sa localisation subcellulaire a permis de caractériser son rôle dans le couplage du centrosome et du noyau lors de la migration par locomotion (Shu 2004, Tsai 2005, Tanaka 2004). Lis1 est une protéine qui s'associe aux MTs et contribue à leur stabilisation. Elle s'associe à NDEL1 contribuant à la stabilisation des microtubules et au recrutement de la dynéine (Shu 2004). L'interaction Ndel1/Lis1 régule l'activité des moteurs moléculaires en modulant leur activité ATPasique (Mesngon 2006). Ndel1 favorise notamment l'interaction de Lis1 avec la Dynéine et son adressage à l'extrémité « - » du MT (Li 2005; Shu 2004). Les facteurs reliant la dynéine et Lis1 à l'enveloppe nucléaire ont par la suite été identifiés : Les protéines de la membrane nucléaire SUN1 et SUN2, via Syne-1, vont interagir avec les complexes dynéine/Lis1 pour transmettre la force motrice du MT au noyau (Zhang 2009). De manière intéressante, ce mécanisme est également responsable du mouvement apical des progéniteurs lors de la MNI. Il a également été montré que Lis1 contribuerait aussi à la régulation du cytosquelette d'actine en favorisant l'activation de Cdc42 qui initie la réorganisation du cytosquelette d'actine (Kholmanskikh 2003).

Kinésine :

Les moteurs moléculaires jouent un rôle important dans le couplage du noyau aux microtubules. La kinésine-1 et la dynéine interagissent avec le complexe Sun/Nesprin et permettent ce couplage noyau-microtubule ainsi que la génération de force lors de la migration. La kinésine-1 (Kif1b) permet notamment de transporter la dynéine cytoplasmique à l'extrémité « + » des MT (Yamada 2010). La kinésine et la dynéine forme un complexe avec la HTT et HAP1 notamment lors du transport axonal (Gauthier 2004, Shirasaki 2012). La HTT pourrait donc contribuer à la migration nucléaire lors de la locomotion. De façon intéressante, il a montré que l'inhibition de Kif1a altère la migration radiale en réponse au BDNF. L'inactivation par électroporation in utero de Kif1a et du BDNF reproduit le même défaut de migration. Il est proposé que Kif1a contribue à la sécrétion autocrine de BDNF nécessaire à la migration radiale (Carabalona 2016).

DCX (pour *Doublecortine*)

La protéine DCX (ou Doublecortex) a été identifié comme étant à l'origine de lissencéphalies liées au chromosome X et d'hétérotopies sous-corticales (des Portes 1998; Gleeson 1998). Cette protéine s'associe aux MTs et contribue à leur stabilité. Elle se localise principalement sur les MTs périnucléaires qui forment la cage de MTs dans les neurones en migration (Tanaka 2004). La perte d'expression de DCX conduit à des défauts de migration (Bai 2003). L'utilisation d'une approche d'électroporation *in utero* de RNAi pour inactiver DCX a montré une déstabilisation des MTs périnucléaires conduisant à un découplage du centrosome et du noyau ce qui induit une nucléokinèse défectueuse (Bai 2003). La fixation de DCX aux MTs est

régulée par sa phosphorylation. En effet, DCX est la cible de nombreuses kinases dont CDK5. Sa phosphorylation par CDK5 favorise la dynamique du cytosquelette (Nishimura 2014).

L'inactivation de la protéine p27(kip1) par RNAi a montré son rôle dans la régulation de la migration neuronale (Kawauchi, 2006), via sa capacité de régulation de la dynamique du cytosquelette. L'activité de p27(kip1) est régulée par CDK5. La voie CDK5/ p27(kip21) active la cofiline qui favorise la dépolymérisation de l'actine. En parallèle, p27(kip21) peut s'associer au MTs et ainsi favoriser leur polymérisation. Elle participe à la formation de la dilatation du processus guidant avec DCX, encore une fois sous le contrôle de CDK5 (Nishimura 2014). Son rôle dans la contraction acto-myosique ayant été établi, p27(kip1) favorise la nucléokinèse lors de la migration (Godin 2012).

Modifications post-traductionnelles de la Tubuline

Les tubulines peuvent être soumises à de nombreuses modifications post-traductionnelles telles que la tyrosination/détyrosination et l'acétylation dont le rôle précis reste encore peu connu. Cependant plusieurs études ont révélé le rôle majeur de l'acétylation de l'α-tubuline. En effet, le complexe Elongator et MEC-17, via leur activité acétyltransférase, régulent l'acétylation de l'α-tubuline et il est suggéré que cette activité contrôle la migration des neurones corticaux (Creppe 2009; Li 2012). Concernant les autres modifications, elles restent encore peu étudiées. Néanmoins, une étude récente montre le rôle de Tubuline Carboxypeptidase permettant la détyrosination des microtubules, sont inactivation par shRNA conduit à des défauts de migration (voir Annexe).

3.3.4.2. Voies de signalisation impliquées dans la migration

De nombreuses voies de signalisation régule la migration radiale (Figure 31).

La voie Cdk5

Cdk5 (pour *Cyclin dependant kinase 5*) est une sérine/thréonine kinase qui est active dans les neurones post-mitotiques. Elle forme des hétérodimères avec les sous-unités p35 et p39. L'étude de souris KO pour Cdk5 a mis en évidence son implication dans la mise en place couches corticales puisque son invalidation conduit à un inversement des couches II-VI (Gilmore 1998; Kwon & Tsai 1998). CDK5 est impliquée dans la transition multipolaire-bipolaire des neurones et dans plusieurs étapes de la migration radiaire à savoir la formation du processus antérieur et la nucléokinèse (Kawauchi 2006; Nishimura 2014; Ohshima 2007). DCX, NDEL1 et $p27^{(kip1)}$ sont des substrats de CDK5 qui régule leur activités.

Molecule	Molecular and cellular function	Related brain disease
Lis1	Regulator for dynein motor	Lissencephaly, Millar-Dicker sydrome
Dcx	Microtubule binding and stabilizing	Lissencephaly, Subcortical band heterotopia
Filamin A	Actin binding and crosslinking	Periventricular heterotopia
ArfGEF2	Membrane trafficking	Periventricular heterotopia, Microcephaly
Reelin	Extracellular protein, Rap1 and Integrin activation	Lissencephaly, Schizophrenia, ASD
Cdk5	Signaling molecule, Cytoskelatal regulation	Lissencephaly
Tubulins*	Component of microtubules	Lissencephaly, Microcephaly
Arx	Transcription factor	Epilepsy, Lissencephaly, Intellectual disability
Dcdc2	DCX family, Involvement of ciliary functions (?)	Dyslexia
DYX1C1	Regulation of Dynein assembly and ciliary motility	Dyslexia (?)
KIAA0319	Single transmembrane protein	Dyslexia
ROBO1	Single transmembrane protein, Slit receptor	Dyslexia
Auts2	Transcriptional activation, Cytoskeletal regulation	ASD
CNTNAP2	Transmembrane protein, K^+ channel clustering	ASD, Epilepsy
Tbr1	Transcription factor	ASD
SDCCAG8	Regulation of centrosomal properties and function	Schizophrenia, Intellectual disability
Disc1	Ndel1/Dynein regulation, Wnt/GSK3β signal	Schizophrenia (?)
MDGA1	GPI-anchored immunoglobulin superfamily	Schizophrenia
PHF6	Binding to PAF1 transcription elongation complex	Intellectual disability (Börjeson-Forssman-Lehmann syndrome)
FMRP	mRNA binding, Regulation of translation	Intellectual disability (fragile X syndrome), ASD

* Tubulins: TUBA1A, TUBA8, TUBB2B, TUBB3, TUBB5 and TUBG1 (see Bahi-Buisson et al.)

Figure 31 : Liste des protéines clés associées à la migration radiale, leurs fonctions et les défauts développementaux associés à leur mutation (Kawauchi 2015).

RAC1-JNK

RAC1 est une protéine de la famille Rho small GTPases qui se lie à la protéine POSH. Ces deux protéines sont nécessaire à la formation de la dilatation des neurones post-mitotique corticaux (Yang 2012). L'expression d'un dominant-négatif de RAC1 ou sa déplétion par shRNA contribue à des défauts de migration (Kawauchi 2003; Yang 2012). RAC1 stimule l'activité de JNK1 (C-Jun Nteminal Kinase 1) qui est notamment connue pour réguler la morphologie du processus guidant pendant la migration (Kawauchi 2003).

La voie Reelin (RELN)

La RELN est une glycoprotéine sécrétée qui se fixe aux récepteurs VLDR (pour *Very Low Density Liporotein Receptor)* et Apo2ER (pour *Apolipoprotein E Receptor 2*), tous deux exprimés par la glie et les neurones post-mitotiques (Sekine 2014; Franco 2011). La RELN est sécrétée par les cellules de Cajal-Retzius. Le modèle murin Reeler, dépourvu en RELN, présente une désorganisation complète de la lamination corticale dîtes « *outside-in* » due à

une migration défectueuse (D'Arcangelo, 2005). La RELN active Dab1 (pour *Disabled 1*) qui stabilise le processus guidant dans la ZM en favorisant l'ancrage du processus guidant dépendant du complexe N-cadhérine/Rap1 dépendant (Franco 2011). La signalisation RELN est aussi en mesure de moduler le cytosquelette d'actine via l'activation de la LIMK1 ce qui conduit à sur-activation de la cofilin et à la déstabilisation de l'actine (Chai 2009). Cette observation a été confirmée par la surexpression de la LIMK1 dans les souris Reeler, qui restaure partiellement la migration (Chai 2016). Par ailleurs, la régulation de l'activité de la LIMK1 est apparue comme essentielle à la migration. L'expression d'une LIMK1 constitutivement active ou inactive conduit dans les deux cas à des défauts de migration (Xie 2017). La RELN favorise aussi l'adhésion des neurones aux cellules de Cajal-Retzius lors de la translocation. En effet, la RELN favorise l'interaction entre la Nectine-1, exprimée par les neurones et la Nectine-3, exprimée par les cellules de Cajal-Retzius. Cette association est cruciale pour la migration, en particulier au cours de la translocation (Gil-Sanz 2013).

3.3.4.3. Les voies régulant la dynamique intracellulaire

Une voie de signalisation importante régulée par la REELIN lors de la transition multipolaire-bipolaire et la migration neuronale implique la NCAD qui doit être proprement adressée et recyclée à la membrane (Tang 2016; Kawauchi 2010). La NCAD permet l'attachement du neurone post-mitotique aux fibres de la glie radiaire lui servant de support (Zhang 2010; Shikanai 2011). Un processus clé lors de ces évènements est donc son adressage et son recyclage membranaire qui est régulé par les GTPases RAB (pour *Ras-like Brain*). Il existe plusieurs protéines RAB intervenant à différentes étapes des processus endocytique et exocytique qui modulent l'expression de la NCAD à la surface membranaire. RAB5 est impliqué dans l'endocytose de la NCAD et dans son adressage aux endosomes précoces. RAB7 est connu pour l'adressage des endosomes précoces aux lysosomes, ce qui permet d'éliminer la NCAD. RAB15 participe à l'adressage des endosomes précoces au réticulum endoplasmique depuis lequel RAB11 régule l'adressage des endosomes à la membrane plasmique (Tong 2016). RAB5 joue un rôle crucial lors du détachement du neurone post-mitotique de la glie radiaire : tout d'abord avant sa migration, ce qui lui permet d'initier sa transition multipolaire-bipolaire, et après sa migration, au moment où le neurone se détache de la glie. RAB11 joue quant à lui un rôle au moment où le neurone post-mitotique adopte sa morphologie bipolaire et se rattache à la glie radiale, et pendant la migration, où il est crucial de ré-adresser la NCAD endocytée au processus guidant lors de la locomotion (Shikanai 2011, Kawauchi 2010). CDK5 a été identifiée comme un régulateur favorisant l'adressage de la NCAD à la membrane via l'intervention de Rap1. Plus récemment, il a été proposé que la RELN favorise l'adhésion cellulaire dépendante de la N-cadhérine de façon transitoire pendant le développement cortical (Matsunaga 2017)

Connexines

Les protéines connexines (Cx s'assemblent en anneaux pour former des « gap junctions » lors du contact entre les cellules). Plusieurs d'entre elles ont un rôle dans la migration neuronale : Cx43 et Cx26 ; Cx43 et Cx26 favorisent la stabilisation du processus guidant au contact des fibres radiales et participent à l'adhésion entre ces derniers. Ce rôle de stabilisation est favorisé par l'activité de la protéine FAK qui stimule l'assemblage des Cx entre le neurone et la fibre (Valiente 2011). En parallèle, Cx43 contribue à l'adoption d'une morphologie multipolaire (Liu 2012). Cx43 stimule la synthèse de la protéine p27 qui régule la réorganisation du cytosquelette d'actine pendant la transition multipolaire (Kawauchi 2006).

3.3.4.5. Rôle de la plaque sous-corticale

Récemment, un rôle crucial des neurones de la plaque sous-corticale a été identifié. Ces neurones forment des neurites dirigés vers le ventricule qui forment des contacts avec les neurones post-mitotiques multipolaires. A ces points de contacts sont formées des synapses transitoires qui stimulent les neurones post-mitotiques et induisent leur transition multipolaire-bipolaire. L'inactivation des neurones de la plaque sous-corticale par l'expression d'une toxine tétanique conduit à l'accumulation de neurones post-mitotiques multipolaires dans la zone intermédiaire. Ceci soulève le caractère indispensable de ce mécanisme (Ohtaka-Maruyama 2018).

3.4. Axonogenèse

3.4.1. Maturation moléculaire des neurones post-mitotiques

La transition multipolaire-bipolaire et la migration neuronale sont des étapes clés pendant lesquelles le neurone commence sa maturation, notamment par l'acquisition de son identité neuronale. Les neurones corticaux expriment tous une grande quantité de marqueurs neuronaux communs tels que NeuN ; ils sont cependant morphologiquement différents et expriment des marqueurs spécifiques en fonction des différentes couches neuronales. Cette dynamique dans l'expression des différents marqueurs d'identité neurale est liée à l'activation précoce de programmes de différenciation dans les progéniteurs neuronaux.

Plus précisément, les neurones de la couche profonde VI expriment le marqueur nucléaire TBR1 (pour *T-box Brain 1*) (Hevner 2001; Han 2011; McKenna 2011). Les neurones de la couche V expriment le marqueur CTIP2 (pour *Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor interacting protein 2*) (Arlotta 2005). Les neurones des couches supercielles II/III/IV expriment quant à eux CUX1 (pour *Cut Like Homebox 1*) aussi connu sous

les noms de CDP ou CULT1 (Cubelos 2010). Enfin, les neurones callosaux, qui se connectent à l'autre hémisphère, expriment tous le marqueur SATB2 (pour *Special AT-Rich sequence binding protein 2*), et ce indépendamment de leur appartenance à différentes couches corticales (Leone 2015). Cependant, la majorité des neurones callosaux étant située dans les couches superficielles, l'expression du marqueur SATB2 est fortement enrichie dans les couches II/III/IV (Leone 2015) .

Le devenir du neurone post-mitotique en cours de maturation est le résultat d'une régulation complexe impliquant différent facteurs de transcription : TBR1, CTIP2, SATB2, CUX1, FEZF2 (pour *Fez Family Zinc Finger 2*) et SOX5 (pour *SRY-box containing protein 5*). La boucle de régulation existant entre ces différents facteurs de transcription va progressivement se mettre en place et favoriser l'expression des marqueurs spécifiques à la couche pour laquelle un neurone est destiné. FEZF2 est exprimé dans les progéniteurs neuraux qui vont générer les neurones de la couche V. Il promeut l'expression du marqueur CTIP2. En parallèle, il diminue l'expression des marqueurs TBR1 et SATB2. SOX5 réprime l'expression des marqueurs FEZF2 et CTIP2 et promeut l'expression de TBR1 ; il est impliqué dans l'acquisition de l'identité neuronale de la couche sous corticale et de la couche VI. SATB2 réprime l'expression des marqueurs CTIP2 et TBR1 (Srinivasan 2012, Leone 2008, 2015; Greig 2013). Les neurones post-mitotiques co-expriment ces marqueurs avant d'acquérir leur identité. Entre E12 et E14, les neurones de la plaque corticale co-expriment CTIP2 et TBR1 avant de se différencier en neurones des couches V et VI. De la même manière, à E14, les neurones des couches profondes co-expriment CTIP2 et SATB2 avant de se différencier en neurones de la couche V qui n'expriment plus SATB2 (Leone 2008, 2014, Greig 2013, Figure 32).

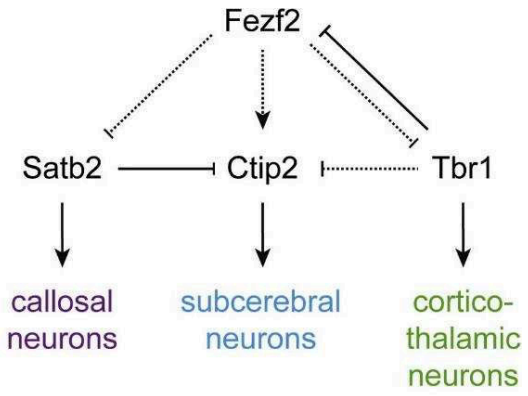


***Figure 32 :* Boucle de régulation entre les différents marqueurs d'identité de neurones corticaux en maturation (Leyva-Diaz & Lopez-Bendito 2013).**

Les neurones des couches supérieures sont cependant moins sujets à la co-expression de marqueurs des couches profondes. D'autres marqueurs d'identité pour les neurones des couches superficielles existent : les neurones des couches II/III expriment BRB2 tandis que les neurones de la couche IV expriment ROR-Beta. BRN2 et ROR-Beta se répriment mutuellement permettant la spécification entre ces deux couches (Oishi et Nakajima 2018).

Chaque sous-type de neurone génère des connections axonales spécifiques (Figure 33)

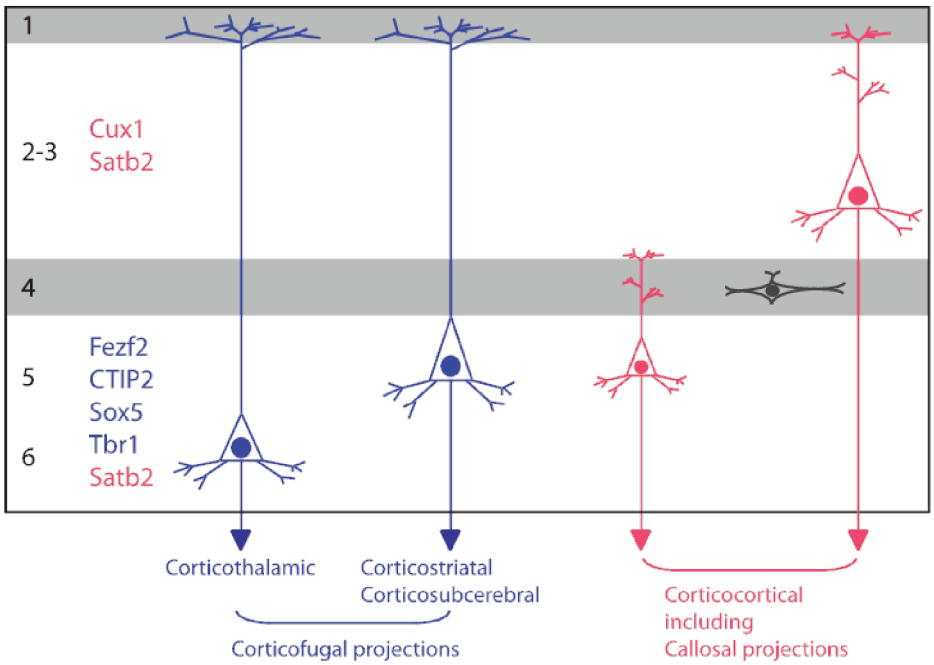


Figure 33 : Connections axonales en fonction du sous-type neuronale

3.4.2. Polarisation axonale

Les étapes de la mise en place des connexions axonales :

La mise en place des projections axonales des neurones excitateurs, débutant dès le développement embryonnaire et se poursuivant jusqu'à 7 jours de vie post-natale (P7) chez la souris, peut être divisée en trois étapes: durant la polarisation neuronale, les neurones migrant de manière radiaire laissent émerger un processus postérieur, lequel s'allonge pour former l'axone. Après cette étape de spécification, s'en suit la croissance et le branchement axonal. Une fois la structure cible atteinte, l'axone entame un processus de différentiation présynaptique pour former une synapse fonctionnelle. La HTT étant impliquée dans la polarisation des neurones post-mitotiques, je m'intéresserai plus particulièrement à la polarisation axonale.

Spécification de l'axone :

Après la différenciation neuronale, les neurones multipolaires deviennent bipolaires et acquièrent un processus arrière qui deviendra l'axone (Hatanaka 2012). Dernièrement, une étude a montré que la majorité des cellules multipolaires allongent ce processus au devenir axonal avant leur processus guidant la migration (Namba 2014).

TAG1, un marqueur axonal exprimé dans la partie basse de l'IZ. Il permet sa séparation en deux parties : une région positive pour TAG1 et une région négative (Hatanaka, 2009). Une grande majorité de neurones multipolaires possédant un processus arrière la protéine TAG1 (*pour Transient Axonal Glycoprotein-1*). La présence de TAG1 faciliterait l'interaction entre ce processus et l'axone d'un neurone pionnier produit antérieurement et permettrait la stabilisation ce processus au devenir axonal. Le complexe Par, acteur majeur de la polarisation cellulaire (Voir chapitre X), est également nécessaire requis à la spécification axonale. Il a ainsi été montré que Par3, via son interaction avec la kinésine KIF3A, était indispensable à la polarisation des axones de projection (Funahashi, 2013). La spécification de l'axone est régulée par d'autres voies moléculaires telles que les petites GTPases dont Rac1 et la LYN Kinase (Lewis 2014). L'axone en cours de spécification est aussi marqué par une accumulation de la kinésine Kif5c à son extrémité (Hatanaka & Yamauchi 2013)
Le rôle de la dynamique des organelles intracellulaires est quant à elle plus controversée : *In vitro*, l'appareil de golgi, le centrosome et les mitochondries se positionnent dans le neurite au devenir axonal. Cependant *in vivo*, il a été montré que la localisation du centrosome dans ce neurite n'est pas indispensable à la polarisation neuronale (Nguyen 2011).

Croissance et Orientation axonales:
La croissance et le guidage de l'axone sont concomitants à la migration radiale des neurones corticaux post-mitotiques. L'élongation axonale résulte de la polymérisation des microtubules et de l'actine dans le tronc axonal mais également dans le cône de croissance, structure très dynamique explorant l'environnement et intégrant ses signaux.
La croissance dirigée de l'axone est soumise à de de nombreux facteurs extrinsèques régulant la dynamique du cytosquelette. Ces facteurs sont nombreux et impliquent les facteurs neurotrophiques, les nétrines, les sémaphorines, Slit, les éphrines et des voies de signalisation dont WNT, SHH et BMP (pour *Bone Morphogenetic Protein*) (Stoeckli, 2018).
L'interaction du récepteur Slit avec Roundabout (Robo) contribue au guidage de l'axone lors de la formation du corps calleux et des commissures dans le cerveau (Unni 2012; Fothergill 2014). La sémaphorine exprimée par les neurones corticaux est également impliquée la formation du corpus callosum (Piper 2009). Les netrines et Slit, quant à elles, forment un

gradient permettant l'orientation pour les connections thalamocorticales (Leyva-Diaz 2014; Bielle 2011).

3.5. Dendritogenèse

Lorsque le neurone post-mitotique atteint sa position finale, il entame le processus de dendritogenèse par lequel il constitue son arborisation dendritique. Dans le cortex cérébral, une arborisation dendritique anormale peut conduire à des défauts de connectivité synaptique. Des arborisations dendritiques anormales sont observées dans les troubles neurodéveloppementaux tels que l'autisme et la schizophrénie (Martinez-Cerdeno 2016, Forrest 2018).

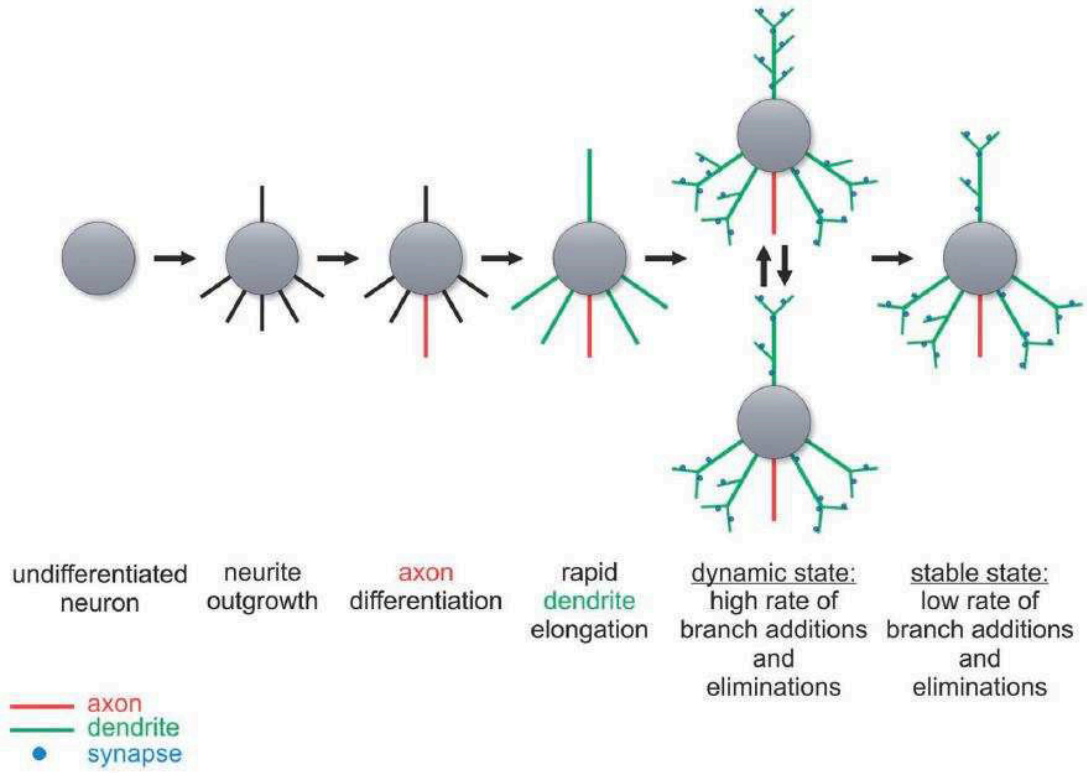


Figure 34 : Différentes étapes de la dendritogenèse (Urbanska 2008)

La dendritogenèse se déroule en 3 étapes (Dong 2015). La première étape se caractérise par la formation, la croissance et l'exploration des neurites. Les neurones émettent une multitude de prolongements dendritiques qui constitueront les dendrites après une phase de croissance rapide et dynamique. Dans un deuxième temps, les neurites immatures forment des branchements sur lesquels des épines dendritiques sont ajoutées et éliminées de façon dynamique. Ces dernières participeront à la formation des synapses, qui constituent les points

de contact entre différents neurones (figure 34). Enfin, après la phase dynamique de dendritogenèse, les dendrites sont stabilisées. Les remodelages dendritiques deviennent en effet plus lents et s'opèrent sur une plus longue période. Cette morphogénèse dendritique est le fruit d'un remodelage dynamique du cytosquelette d'actine et de MTs, régulé par diverses protéines et voies de signalisation (figure 35).

Tout d'abord, les protéines RhoA, Rac1 et Cdc42 de la famille des Rho GTPases régulent la polymérisation et l'organisation de l'actine. Cdc42 et Rac1 activent Arp2/3, un complexe protéique essentiel à la nucléation de l'actine, et favorisent ainsi la dendritogenèse. En parallèle, Cdc42 et Rac1 empêchent la dépolymérisation de l'actine en activant Pak1. Pak1 contribue à inactiver la LIMK et inhibe la dépolymérisation induite par la cofiline (Hayashi 2007). RhoA régule la polymérisation de l'actine et favorise l'élongation de l'actine en se liant à la formine (Nusser 2006). En parallèle, RhoA régule l'activité de ROCK (Nakayama 2000). L'activation de ROCK conduit à la l'activation de la LIMK, qui dans ce cas contribue à limiter le remodelage de l'actine via la cofiline et limite la croissance du dendrite (Sarmiere & Bamburg 2004). Récemment, il a été rapporté que l'expression de LIMK est sous contrôle du BDNF (Ravindran 2019).

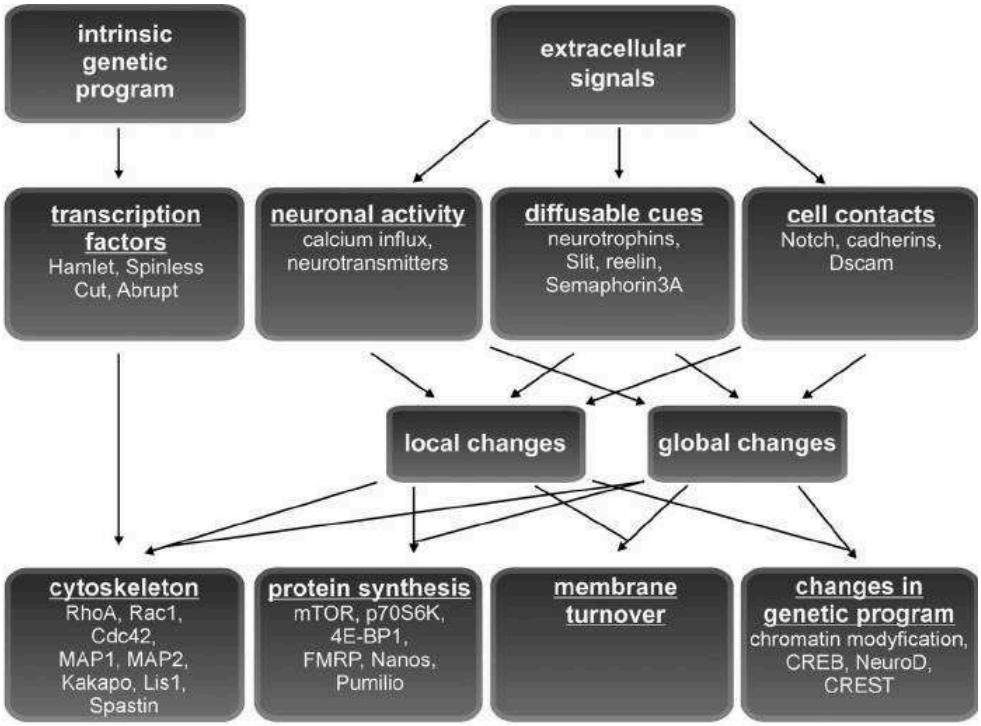


Figure 35 : Bilan des facteurs intrinsèques et extrinsèques contribuant à la dendritogenèse (Urbanska 2008)

Les MTs font eux aussi l'objet d'une régulation par les Rho GTPase. Rac1 stabilise les microtubules via l'activité des kinases JNK qui favorise la phosphorylation de la protéine associée aux MTs MAP2. MAP2 contribue à stabiliser les MTs et favorise leur élongation sous le contrôle des JNK (Bjorkblom 2005). La stabilité du réseau de MTs dépend aussi de plusieurs autres protéines dont LIS1 et MAP1B (Liu 2000). Le branchement et l'élongation dendritique sont également dépendants du transport vésiculaire le long des MTs impliquant la dynéine et la kinésine (Satoh 2008; Zheng 2008). Ce transport alimente notamment les fragments de l'appareil de Golgi qui contribuent à la formation d'embranchements (Ori-McKenney 2012). Cependant, le rôle des fragments de Golgi est controversé car leur présence n'est pas indispensable à la formation d'embranchement (Nguyen 2014). Le remodelage du cytosquelette au cours de la croissance dendritique dépend également de facteurs de guidage extracellulaires. Entre autres, Les Netrines sont des récepteurs transmembranaires qui contribuent à guider la croissance dendritique. L'interaction attractive Netrine-DDC constitue un signal attractif qui active Rac1 et Cdc42 ce qui conduit à la polymérisation d'actine en direction de la source. L'interaction répulsive Netrine-UNC5 active RhoA et la dépolymérisation de l'actine (Sun 2011). Les dendrites utilisent d'autres facteurs de contacts incluant les sémaphorines, la RELN, les Slit/Robo et les neurotrophines qui guident la croissance dendritique (Dong 2015).

CHAPITRE 4 : LA MALADIE DE HUNTINGTON, UN TROUBLE DU NEURODEVELOPPEMENT ?

La MH est une maladie à manifestation tardive, les symptômes apparaissant à l'âge adulte. C'est pour cette raison qu'une grande partie des recherches s'est focalisée sur le mécanisme physiopathologique aboutissant à la neurodégénérescence chez l'adulte et notamment par l'étude de la toxicité neuronale induite par la HTT mutée. Deux points semblent néanmoins essentiels: D'une part, la mutation à l'origine de la maladie conduit au gain de nouvelles fonctions toxiques de la protéine mutée mais aussi à la perte de ses fonctions normales. L'étude combinée des fonctions de la HTT sauvage et mutée est donc cruciale à la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la MH. D'autre part, elle joue un rôle majeur dans les phases précoces du développement embryonnaire comme en atteste la létalité embryonnaire précoce observée dans le modèle murin de déplétion complète de HTT (Duyao 1995, Nasir 1995, Zeitlin 1995). De plus, chez l'Homme, les individus porteurs de la mutation au stade pré-symptomatique présentaient une réduction du volume intra-crânial, suggérant un développement cérébral anormal (Nopoulos 2011). Paulsen et coll. ont aussi fait état d'une diminution de volume du striatum, de l'hypothalamus et du cortex cérébral de patients pré-symptomatiques soutenant un développement anormal (Paulsen 2011). De plus en plus d'études s'intéressent donc aux conséquences de la perte et de la mutation de la HTT sur le développement cérébral et ce, chez la souris mais également chez l'homme.

1. *Expression de la HTT sauvage et mutée lors du développement embryonnaire et post-natale*

Peu de données existent aujourd'hui sur l'expression de la HTT lors du développement cérébral, que ce soit au niveau histologique et subcellulaire. La HTT est exprimée de façon ubiquitaire (Marques Sousa 2013) et qui plus est très tôt dans la vie embryonnaire. Son expression a pu être détecté dans des lysats de cerveaux de souris dès E10 et ce, tout au long de la neurogenèse embryonnaire (Bhide 1996). Dans les stades post-nataux (P0 à P30), son expression augmente graduellement dans le cortex et le striatum, de façon intéressante son expression double entre P7 et P15 dans le cortex (Bhide 1996). Ceci est intéressant car entre P0 et P30 se développent l'arborisation dendritique suggérant un rôle clé la HTT dans ce processus. Les fœtus humains de 19 semaines ont eux aussi une expression élevée de HTT dans le cortex frontal, pariétal et occipital (Bhide 1996).

2. *Apports des modèles in vitro*

L'utilisation de des cellules souches embryonnaires (ESC) murines, différenciées en cellules souches pluripotentes (PSC), puis en cellules souches neurales (NSC) ont permis d'identifier plusieurs défauts développementaux liés à la perte et/ou à la mutation de la HTT. Ainsi Lo Sardo et coll., en utilisant des ESC dans lesquelles la HTT été inactivée, ont mis en évidence le rôle de la HTT dans les étapes précoces du développement neural. *In vitro*, les ESC se

différencient en cellules neuroépithéliales qui s'organisent ensuite en une structure arrondie mimant un tube neural ou « rosettes » et ce mécanisme est hautement dépendant de l'adhésion cellulaire (Lo Sardo 2012). Dans cette étude, les auteurs rapportent que la HTT, en régulant l'interaction homotypique entre les cellules neuroépithéliales, est indispensable à la formation de rosettes. Cette fonction est médiée par l'augmentation de l'activité de la métalloprotéase ADAM10 et le défaut du maintien de la N-cadhérine membranaire (Lo Sardo 2012).

L'étude de la prolifération des PSC induites (iPSC) est plus sujette à débat. En effet, la capacité à proliférer des iPSC produites à partir de patients humains ne montre pas d'anomalies (Castiglioni 2012; Conforti 2013). D'autres études chez la souris font cependant état de défauts de, notamment dans les cellules dérivées des modèle knock-in Q140, dont la prolifération est augmentée et knock-in Q111, dans lesquelles la prolifération est réduite (Nguyen 2013; Ritch 2012). Une autre étude, dans laquelle des lignées ESC isogéniques sont utilisées (c'est-à-dire que les cellules expriment la HTT avec des longueurs différentes de l'expansion CAG – ici de 20 à 140 répétitions- avec un fond génétique identique) pour générer des NSC, ne montre aucun effet de la mutation sur la prolifération cellulaire (Conforti 2013). Néanmoins, les auteurs soulignent que les NSC mutées sont sensibles à l'apoptose dépendante des caspases. Les différentes expansions testées conduisent à une large diminution du nombre de neurones associée une augmentation de cellules exprimant GFAP (marqueur d'astrocyte) et une diminution de la production d'ARNm codant le BDNF (Conforti 2013). Ce qui soulève le rôle possible de la HTT dans la détermination du devenir cellulaire.

Les travaux de Nguyen et coll. sont particulièrement intéressants car ils rapportent que la perte de HTT (KO) et sa mutation (Knock in Q111) contribuent à un défaut de maturation des NSC (Nguyen 2013). En effet, ils montrent que l'inactivation de la HTT réduit la prolifération tandis que sa mutation favorise la différenciation et conduit à l'apparition précoce de NSC Nestin-postives (marqueur des progéniteurs neuronaux). A des stades plus tardifs, la mutation induit également une neurogenèse précoce. En revanche, l'inactivation de la HTT conduit à l'effet opposé, avec une quasi absence de neurones générés. Les auteurs attribuent ces observations à l'activation différentielle de l'expression des gènes HES connus pour réguler la différenciation neuronale : Ces gènes HES sont ainsi surexprimés en absence de HTT et réprimés en présence de la mutation (Nguyen 2013).

Ring et coll. ont étudié les variations transcriptomiques dans les iPSC humaines avec et sans répétions pathogéniques en se focalisant sur le développement du striatum dorsal. Par cette approche, les auteurs ont identifié des dérégulations de l'expression de facteurs clés de la différenciation neuronale, dont le gène pro-neural NeuroD1 et le répresseur de la transcription

REST, tous deux impliqués dans la corticogenèse (Ring 2015, voir chapitre Facteur intrinsèque - Régulation de la transcription). L'expression de NeuroD1 est réduite dans lignées porteuses de la mutation tandis que REST est lui surexprimé. Ces modulations d'expression génique ont été confirmées par une étude plus récente dans laquelle trois lignées d'iPSC humaines non pathogéniques et cinq lignées pathogéniques portant différentes expansions polyQ ont été comparées (The HD iPSC consortium 2017). Enfin, il est important de souligner que d'autres gènes impliqués dans la maturation neuronale sont dérégulés : une augmentation de l'expression des Netrine-1, Unc5d et DCC est observé, toutes ces protéines étant impliquées sont dans la croissance dendritique et axonale (Ring 2015).

Plus récemment, Conforti et coll. se sont focaliser sur le développement cortical et striatal dans un modèle de rosettes issues d'iPSC humaines (Conforti 2018). Ils rapportent des défauts d'induction du neurectoderme ventral, dont émerge le striatum, qui sont associés à la diminution des marqueurs spécifiques GSX2, CTIP2 et MAP2, ce qui suggère un défaut de différenciation. En parallèle, ils notent une réduction de l'expression de TBR2 et TBR1, marqueurs des progéniteurs intermédiaires corticaux et des neurones de la couche VI, respectivement. Ces défauts sont par ailleurs associés à une désorganisation de la cytoarchitecture des organoïdes corticaux produits. Enfin, les auteurs soulèvent ici encore la sur-activation de ADAM10 en condition mutée, ce qui induit des défauts d'intégrité tissulaire des organoïdes corticaux du au clivage excessif de la NCAD (Conforti 2018).

Une étude comparant des iPSCs dérivant des souris YAC128 et de patients a révélé que plusieurs voies moléculaires connues de la pathologie étaient dérégulées dans ces modèles in vitro de développement. En effet, la voie WNT, impliquée dans plusieurs étapes du développement du cortex cérébral, est suractivée comme le démontre l'augmentation déphosphorylation de la β-caténine. Les MAPK Kinases Erk1/2 sont elles aussi dérégulées. De plus, les auteurs ont identifié une dérégulation de la protéine p53 qui interagit avec la HTT ainsi qu'avec la voie WNT et MAPK (Szlachcic 2015).

Plus récemment, une approche utilisant des cellules souches embryonnaires humaines a montré que les cellules différenciées en neuroblastes présentaient une instabilité chromosomique au cours de la neurogenèse (Ruzo 2018). Cette instabilité était notamment corrélée à la longueur de la répétition CAG et reproduite dans les cellules déplétées en HTT, soulignant un nouveau rôle de la HTT sauvage pour lequel la mHTT n'est pas capable de reproduire la fonction.

3. *Déplétion de la HTT pendant le développement*

La HTT tient un rôle majeur dans les phases précoces du développement embryonnaire ; en atteste la létalité embryonnaire précoce observée dans le modèle murin de déplétion complète de HTT (Duyao 1995, Nasir 1995, Zeitlin 1995). Les modèles KO montrent des défauts majeurs au cours de la gastrulation avec une sévère atrophie des embryons. Ceci serait la conséquence d'un défaut des fonctions nutritives du tissu extra-embryonnaire. Il proposé que cette létalité soit en partie dû à un défaut dans le transport du fer (Dragatsis 1998).

L'analyse des embryons KO a aussi permis d'identifier un rôle de la HTT au cours de la neurulation. La HTT ne semble être impliquée dans l'induction du neuroectoderme. Cependant, la ligne primitive présente des dérégulations d'expression de nombreux morphogènes dans sa partie antérieure dont T (Brachyury), Otx2, Evx1, WNT, TBX6, FGF8, NODAL ainsi que le ligand de la voie Notch, DLL1. Ceci conduit à des défauts de régionalisation de la ligne primitive antérieure dont émergeront les structures cérébrales. Certains morphogènes (T et Evx1) présentent une expression ectopique dans les tissus extra-embryonnaires. Cependant, il est à noter que l'expression des marqueurs spécifiques des tissus extra-embryonnaires ne sont pas affectés (Woda 2005).

Une autre approche d'embryon chimérique utilise des cellules souches déplétée en HTT qui sont injectées dans le blastocyste pour observer leur devenir cellulaire et le comportement des individus chimères (Reiner 2001). Il est important de souligner que le taux de réussite lors de la génération de chimères, soulignant le rôle clé de la HTT pendant le développement précoce. Cette analyse a montré que la HTT était impliquée dans la différenciation des neuroblastes dans le striatum, le cortex et l'hypothalamus puisque peu de neurones déplétés ont été observés. De plus, les chimères présentent une apparition de troubles moteurs dès 4 semaines associées à une diminution de poids à 6 mois (Reiner 2001).

La déplétion plus tardive de la HTT dans les cellules exprimant WNT-1, dont émergent le rhombencéphale et le mésencéphale conduit à de sévères hydrocéphalies congénitales observables chez 40% des individus à la naissance et chez la totalité des individus à P10 (Dietrich 2009). Ces résultats soulignent un rôle de la HTT pendant le développement cérébral et tout particulièrement dans l'homéostasie du liquide céphalorachidien. Les auteurs spéculent que la HTT serait impliquée dans la régulation du flux, la synthèse et de l'absorption du liquide céphalorachidien (Dietrich 2009). Il me parait intéressant de souligner que depuis ces travaux, le rôle de HTT dans la ciliogenèse a été établi, ce qui pourrait expliquer les phénotypes observés par Dietrich et coll. (Keryer 2011, voir chapitre ciliogenèse).

White et coll. ont tiré avantage d'une cassette *Néomycine* insérée devant le gène de la HTT afin de réduire son niveau d'expression. Le rôle de la HTT dans le développement cérébral a été corroboré par cette approche. Enfin, les auteurs observent un développement anormal du cortex et du striatum lorsque l'expression de la HTT est réduite de 25 à 50% (White 1997). Cependant, à ce stade des recherches aucune fonctions cellulaire de la HTT n'avait encore été identifiées au cours du développement cérébral. Les auteurs proposent néanmoins que la HTT régule la prolifération, la migration et la maturation des cellules du système nerveux.

Les travaux de Godin et coll. ont permis d'établir que la HTT avait clairement un rôle dans la neurogenèse corticale : elle est impliquée dans la division des progéniteurs neuronaux. En effet, dans le cortex en développement, l'électroporation in utero d'un siRNA dirigé contre la HTT contribue à favoriser les divisions asymétriques, conduisant à une augmentation des divisions neurogéniques (Godin 2010). La HTT régule la balance entre prolifération et différenciation des progéniteurs par sa fonction dans l'orientation du fuseau mitotique. En effet, la HTT se localise pendant la mitose aux pôles du fuseau mitotique où elle interagit avec $p150^{glued}$ (sous unité de la dynactine), la dynéine et NuMa. Plus récemment, une étude a montré, dans un modèle dans lequel la HTT a été spécifiquement éteinte dans les progéniteurs corticaux, des défauts moteurs progressifs associés à une diminution du nombre de neurones ainsi que des volumes corticaux et striataux chez l'adulte (Dragatsis 2018). Ces observations corroborent les précédents résultats obtenus par Arteaga-Bracho et coll. : les auteurs y montrent que la déplétion de la HTT restreinte au développement (du début de la neurogenèse jusqu'au 21ème jour de vie post-natale) est suffisante à l'apparition chez l'adulte d'hétérotopies dans le subpallium, de défauts de lamination corticale, d'une maturation aberrante du striatum, ainsi que d'une sensibilité accrue à la neurodégénérescence (Arteaga-Bracho 2016).

La déplétion de HTT par l'utilisation de siRNA induit également des des défauts de migration radiale (Tong 2011). Ces défauts sont plus prononcés dans les neurones générés précocement (E12.5) que dans ceux générés plus tardivement (E14.5 et E16.5). De plus, les auteurs de cette étude soulignent un rôle de la HTT dans la survie des neurones nouvellement générés en observant une augmentation de l'apoptose dans les neurones déplétés. Cependant le mécanisme par lequel la HTT intervient dans ces processus n'est pas élucidé.

4. *La mutation de la HTT pendant le développement*

Les conséquences de la mutation de la HTT sur le développement cérébral ont également été étudiés. Ainsi, les travaux de Molero et coll. ont montré que la mutation de la HTT exprimée exclusivement pendant le développement cérébral était suffisante pour induire les caractéristiques de la MH chez les souris adultes. Pour se faire, ils ont utilisé comme modèle murin les souris BACHD:CAGCRE^{ERT2} exprimant une HTT^{Q97} dont l'exon est floxé.

L'inactivation de l'expression de la mHTT^{Q97} a été effectuée à P21 par injection de tamoxifène, en fin développement cérébral post-natal. Les auteurs ont comparé les souris contrôles, celles exprimant la mHTT^{Q97} et celles dont l'expression de mHTT^{Q97CRE} était restreinte au développement. Les individus mHTT^{Q97CRE} et HTT^{Q97} présentent une neurodégénérescence accrue dans le striatum associé à une vulnérabilité élevée, qui est elle-même liée à l'excitoxicité liée au NMDA des MSNs. Les neurones striataux présentent une activité électrophysiologique anormale impliquant notamment une connectivité anormale de la voie corticostriatale. De plus, chez les souris mHTT^{Q97CRE}, les atteintes de la coordination motrice sont présentes dès trois mois et sont aussi importantes que celles des individus exprimant la forme mutée tout au long de la vie. (Molero 2016). Cette étude souligne donc l'importance des conséquences de la mutation pendant le développement embryonnaire et post-natal sur la physiopathologie de la maladie à l'âge adulte.

Les conséquences de la mutation de la HTT lors de la mitose des progéniteurs ont également été étudiées dans un modèle *knock-in (Q111)*. Cette étude a permis d'établir que la mHTT reproduisait le phénotype observé en perte de fonction. Ainsi, les RGCs exprimant la HTT mutée présentent également une orientation anormale de leur fuseau mitotique, ce qui aboutit à une élévation des divisions neurogéniques. Cette fonction anormale de la mHTT conduit à une architecture corticale embryonnaire altérée, la zone ventriculaire étant plus fine et la plaque corticale plus épaisse. Par ailleurs, la lamination corticale est anormale chez les jeunes adultes (P21) : Les couches superficielles sont ainsi plus épaisses tandis que la couche VI est plus fine (Molina-Calavita 2014). Ces résultats suggèrent que la mHTT conduit à un épuisement de la quantité de progéniteurs et donc à une production anormale des neurones corticaux, ce qui reste à établir.

Enfin, l'étude du modèle zQ175 portant une longue répétition à mis en évidence une morphologie anormale de l'arborisation dendritique des neurones corticaux des couches II/III et V et ainsi que des neurones striataux associés à des défauts fonctionnels, comme révélés par les propriétés électrophysiologiques qui montrent une maturation précoce des synapses chez les jeunes adultes (McKinstry 2014). Ces résultats suggèrent un probable défaut de la mise en place des voies cortico-striatales en condition pathologique, qui serait médié en partie par des anomalies de dendritogenèse et synaptogenèse. Les mécanismes par lesquelles la mHTT altère ces différents processus restent, à ce jour, inconnus.

5. Objectifs des travaux de thèse

Toutes ces données soutiennent l'hypothèse d'une contribution neurodéveloppementale à la MH. En effet, la HTT et la mHTT sont impliquées dans plusieurs étapes du développement du

système nerveux central. De ce fait, l'altération des fonctions normales de la mHTT pourrait, au moins en partie, contribuer à la progression physiopathologique de la MH. En effet, des altérations dans la mise en place du cortex ou du striatum au cours du développement pourraient rendre le cortex et le striatum plus vulnérables à la neurodégénérescence chez l'adulte. De plus, un développement cérébral anormal pourrait expliquer, au moins en partie, l'existence de symptômes psychiatriques et cognitifs, qui surviennent précocement dans la progression de la maladie.

Mes travaux de thèse visaient à donc à étudier les rôles de la HTT et les effets de sa mutation pendant le développement du cortex cérébral, structure fortement atteinte par la neurodégénérescence chez les patients.

5.1. Le rôle de la HTT dans les neurones post-mitotiques

Si au cours de la corticogenèse, le rôle précis de la HTT et les conséquences de sa mutation ont été établis dans la division des progéniteurs corticaux (Godin 2010, Molina-Calavita 2014), les fonctions de la HTT et l'effet de sa mutation dans les autres étapes du développement cérébral. Les différentes études menées dans les modèles *Nestin-Cre;Hdh*$^{flox/flox}$ et *EMX1-Cre;Hdh*$^{flox/flox}$ ne pouvaient répondre à la fonction cellule-autonome de la HTT durant la migration et la maturation neuronales. En effet, les RGCs servant de support à la migration, les défauts potentiels de migration auraient pu être attribuées à des anomalies de glie radiaire. Il est donc impossible d'établir, d'après les précédentes études, le rôle spécifique de la HTT dans la migration et la maturation des neurones post-mitotiques.

Le premier axe de ma thèse a donc été de caractériser les fonctions de la HTT dans les neurones nouvellement générés, notamment lors des étapes de polarisation, de migration et de dendritogenèse, qui sont toutes des phases clés du développement cortical. . Dans cette étude, nous avons un modèle génétique de délétion conditionnelle afin d'invalider l'expression de la HTT spécifiquement dans les neurones post-mitotiques. Cette stratégie nous a permis d'éliminer les défauts provenant d'une prolifération anormale tout en assurant l'intégrité des RGC sur lesquelles migrent les neurones. Ici, l'objectif était d'analyser la phase de transition multipolaire-bipolaire des neurones post-mitotiques ainsi que leurs éventuels défauts de migration, dans le but d'étudier les conséquences pour la lamination corticale et la morphologie neuronale chez le jeune adulte.

5.2. Effets de la mutation hétérozygote pendant la neurogenèse corticale

Le second projet consistait à disséquer les défauts induits par la mutation de la HTT sur la neurogenèse corticale dans un modèle génétique de la MH, et ce de manière transversale. J'ai travaillé avec le modèle zQ175 présentant des phénotypes plus précoces que les autres

modèles KI. J'ai posé l'hypothèse que ces phénotypes pourraient être imputables à des défauts de développement plus prononcés et plus facilement observables.

Pour être au plus près de la physiopathologie humaine, cette étude a été menée sur des individus hétérozygotes, contrairement aux études précédentes qui ont été réalisées chez des modèles murins portant la mutation à l'état homozygote de plus, les études menées sur la corticogenèse ont souvent été focalisées sur un stade embryonnaire particulier, reflétant ainsi les anomalies induites par la mutation de la HTT dans une population corticale restreinte.

Mon projet était donc d'établir une analyse complète de la physiologie des progéniteurs neuronaux et notamment leur capacité de division, ainsi que les processus de migration et de maturation neuronale au cours de la corticogenèse (soit entre E12.5 et E17.5), et ce dans un modèle hétérozygote. De plus, j'ai analysé la lamination corticale à P7 afin d'établir si les défauts embryonnaires avaient des conséquences sur la lamination neuronale post-natale.

ARTICLE 1 : La transition multipolaire-bipolaire des neurones corticaux post-mitotiques régulée par la Huntingtine est cruciale pour la morphologie neuronale post-natale.

Au cours de ma première année de thèse, j'ai collaboré avec Monia Barnat dans un projet où nous avons étudié le rôle de la HTT sauvage dans les neurones post-mitotiques. Pour ce faire, nous avons tiré avantage du modèle murin *HdH$^{flox/flox}$* où l'exon-1 de la HTT est flanquée de sites *LoxP*, conduisant à la déplétion de la HTT en présence de la recombinase CRE sous contrôle du promoteur *NEX* (*NEX-CRE*) spécifique aux neurones post-mitotiques et progéniteurs intermédiaires. En parallèle, avons également étudié l'effet cellule autonome de la déplétion en utilisant une approche d'électroporation *in utero* (IUE) permettant d'apporter la CRE sous contrôle du promoteur *NeuroD,* spécifique au neurones post-mitotiques, via une construction plasmidique *ND:Cre*.

Dans cette analyse, nous avons démontré que la HTT est un acteur clé de la transition multipolaire-bipolaire, étape indispensable permettant d'initier la migration radiale des neurones et leur bon positionnement. Nous avons identifié le rôle crucial de la HTT dans le recyclage RAB11-dépendant de la protéine d'adhésion N-cadhérine (NCAD) dont dépend la migration radiale (Kawauchi 2010). En effet, la déplétion de HTT conduit à une accumulation de NCAD dans le corps cellulaire et à sa réduction dans le processus guidant la migration. Cette anomalie a été rétablie par la surexpression d'un variant constitutivement actif de RAB11, protéine connue pour interagir avec la HTT, et qui participe au recyclage de la NCAD vers le processus guidant (Li 2008, Elias 2015, Power 2012).

Dans cette étude, nous observé que la déplétion de HTT dans le modèle *NEX:CRE-HdH$^{flox/flox}$* conduisait à des défauts de migration des neurones des couches II/III. J'ai inactivé spécifiquement la HTT dans les neurones des couches superficielles II/III/IV par une approche d'IUE à E14.5. La déplétion cellule autonome de la HTT dans les neurones post-mitotiques entraine un défaut de leur migration radiale observé à E18.5. J'ai rétabli ce défaut de migration par l'expression d'un fragment de HTT dans les neurones déplétés, démontrant son rôle dans ce processus. De même, la surexpression de NCAD et RAB11 rétablissent la migration radiale, appuyant le fait que l'effet de la HTT sur la migration est médié par le recyclage RAB11-dépendant de

la NCAD. Cependant, l'expression de la HTT mutée dans les neurones déplétés n'a pas été pas en mesure de rétablir la migration radiale des neurones post-mitotiques, indiquant que la HTT mutée a perdu la fonction de la HTT sauvage dans la régulation de ce processus.

J'ai également analysé les conséquences de la déplétion de HTT sur la morphologie des neurones à P21. Par la même approche d'IUE à E15.5 avec un plasmide ND:Cre, j'ai déplété la HTT dans les neurones post-mitotiques de la couche II/III dès le développement embryonnaire. J'ai observé que la déplétion en HTT réduisait la complexité de l'arborisation dendritique des neurones. Afin de préciser le rôle de la HTT dans l'acquisition de l'arborisation dendritique, je l'ai cette fois-ci déplété une fois la migration neuronale achevée (soit au début du développement post-natal) grâce à l'électroporation d'un plasmide *ND:CRE^{ERT2}*, qui exprime une CRE dont l'activité est induite par le tamoxifène. Cette déplétion restreinte au développement post-natal a également induit une réduction de la complexité de l'arborisation dendritique, mais moins évidente que lorsque la HTT était déplétée depuis la vie embryonnaire. Néanmoins, ces résultats soulignent le rôle clé de la HTT dans le développement embryonnaire et post-natal. En parallèle, j'ai aussi testé l'effet de la surexpression de RAB11 qui restaure en partie la complexité de l'arborisation dendritique, soulignant le rôle de la voie de recyclage de la NCAD dans ce processus.

Notre étude soutient l'hypothèse selon laquelle la MH est caractérisée par des altérations neurodéveloppementales, puisqu'elle démontre que la HTT est un facteur clé pour un bon développement du cortex cérébral. En effet, d'autres études suggèrent un développement anormal chez l'humain qui pourrait être imputable aux différents rôles de la HTT et aux effets de sa mutation pendant le développement des structures cérébrales (Nopoulos 2010, Tabrizi 2009, Rosas 2002, Rosas 2008, Lee 2012).

Ces travaux ont été publiés en 2017 dans la revue Neuron :

Huntingtin-Mediated Multipolar-Bipolar Transition of Newborn Cortical Neurons Is Critical for Their Postnatal Neuronal Morphology.

Barnat M., Le Friec J., Benstaali C. et Humbert S.

Neuron. 4 Janvier 2017.

Article

Neuron

Huntingtin-Mediated Multipolar-Bipolar Transition of Newborn Cortical Neurons Is Critical for Their Postnatal Neuronal Morphology

Highlights

- HTT is required for multipolar-bipolar transition and migration of projection neurons
- HTT mediates RAB11-dependent N-Cadherin trafficking during polarization
- PolyQ-HTT impairs neuronal migration
- Embryonic loss of HTT specifically affects neuronal morphology at adulthood

Authors

Monia Barnat, Julien Le Friec, Caroline Benstaali, Sandrine Humbert

Correspondence

sandrine.humbert@univ-grenoble-alpes.fr

In Brief

Barnat et al. show that huntingtin, the protein mutated in Huntington's disease, is a key intrinsic regulator of the RAB11-NCAD polarity pathway during cortical development with direct implications for adult neuronal layering and morphology.

Barnat et al., 2017, Neuron *93*, 99–114
January 4, 2017 © 2017 Elsevier Inc.
http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.11.035

CellPress

Neuron
Article

CellPress

Huntingtin-Mediated Multipolar-Bipolar Transition of Newborn Cortical Neurons Is Critical for Their Postnatal Neuronal Morphology

Monia Barnat,[1,2] Julien Le Friec,[1,2] Caroline Benstaali,[1,2] and Sandrine Humbert[1,2,3,*]
[1]University Grenoble Alpes, Grenoble Institut des Neurosciences, GIN, 38000 Grenoble, France
[2]INSERM, U1216, 38000 Grenoble, France
[3]Lead contact
*Correspondence: sandrine.humbert@univ-grenoble-alpes.fr
http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.11.035

SUMMARY

In the developing cortex, projection neurons undergo multipolar-bipolar transition, radial-directed migration, and maturation. The contribution of these developmental steps to the structure of the adult cortex is not completely understood. Here, we report that huntingtin (HTT), the protein mutated in Huntington's disease, is enriched in polarizing projection neurons. The depletion of HTT in postmitotic projection neurons leads to the mislocalization of layer-specific neuronal populations in the mouse neocortex. HTT is required for the multipolar-bipolar transition of projection neurons and for the maintenance of their bipolar shape during their radial migration. HTT mediates these effects in vivo through the regulation of RAB11-dependent N-Cadherin trafficking. Importantly, HD pathological HTT alters RAB11-dependent neuronal migration. Finally, we show that the cortical defects resulting from the postmitotic loss of HTT specifically during embryonic development affect neuronal morphology at adulthood. Our data reveal a new HTT-RAB11-N-Cadherin pathway regulating multipolar-bipolar transition with direct implications for mature brain.

INTRODUCTION

The mammalian cortex, the cerebral structure that controls all higher-order brain functions, is formed of six layers in which the number and the position of neurons are highly regulated during development. During cortical development, neocortical interneurons are produced in the developing ventral telencephalon and migrate tangentially to the neocortex, whereas cortical excitatory neurons (also named projection neurons) are produced in the ventricular zone (VZ) and migrate radially to the cortical plate (CP) (Kriegstein and Noctor, 2004; Sakakibara and Hatanaka, 2015; Sultan et al., 2013). The proliferation of radial glial progenitors (RGPs) in the VZ generates projection neurons, either directly or indirectly through the transient amplification of intermediate progenitors. Although RGPs exhibit strong apicobasal polarity, newly born neurons lose this polarity and adopt a multipolar morphology. During this stage, cells possess multiple processes that extend and retract in a dynamic manner within the subventricular zone (SVZ) and the lower intermediate zone (IZ). This multipolar stage is transient and followed by a transition to a characteristic bipolar morphology where cells extend a leading process oriented toward the pial surface and a trailing process in the direction of the VZ. Neurons then undergo a locomotion-based mechanism of migration along the glial fibers to migrate to their final destination where they acquire their dendritic arborization.

Studies have suggested that the transient multipolar stage is critical for the establishment of neuronal layer identity and proper cortical lamination (Cooper, 2014). One signaling pathway required for multipolar-bipolar transition and subsequent migration of postmitotic neurons involves the cell adhesion molecule N-cadherin (NCAD). NCAD is important for the interaction between migrating neurons and radial glial cell fibers (Gärtner et al., 2012; Shikanai et al., 2011; Zhang et al., 2010). Kawauchi and colleagues reported that the Rab GTPase RAB11 regulates the trafficking of NCAD to cortical neuronal processes via recycling endosomes, thus ensuring the transition from multipolar to bipolar migration (Kawauchi et al., 2010). RAB11 may also mediate the membrane recycling of NCAD, which leads to the attachment of neurons to the radial glia cells (Shikanai et al., 2011). Although the core components of this pathway are characterized, intrinsic regulatory factors that finely tune polarization have not been identified.

Huntington's disease (HD) is a dominant inherited adult neurodegenerative disorder caused by an abnormal expansion of a polyglutamine repeat (polyQ) in the huntingtin (HTT) protein. The symptoms of HD only emerge during mid-adulthood, although both wild-type and mutant HTT are expressed in the developing embryo. Following the identification of the gene encoding HTT, several studies showed that it is essential for embryonic development because its inactivation in mice results in embryonic lethality at embryonic day 7.5 (E7.5) (Duyao et al., 1995; Nasir et al., 1995; Zeitlin et al., 1995). More specifically, HTT is important for the formation of the nervous system. Mice expressing less than 50% of the normal levels of HTT present defects in the formation of the precursor of the epiblast, as well as malformations of the cortex and striatum, and die shortly after

CrossMark

birth (White et al., 1997). Furthermore, the specific inactivation of HTT in Wnt1 cell lineages leads to severe hydrocephalus, which further demonstrates the role of HTT in the formation of the nervous system (Dietrich et al., 2009). Analysis of chimeric embryos, in which a limited number of cells are depleted of HTT, showed that this protein is essential for the differentiation of neuroblasts in the striatum, cortex, and thalamus (Reiner et al., 2001). Notably, we previously found that HTT is required for mitotic spindle orientation of dividing cortical progenitors (Godin et al., 2010). In HD, mutant HTT (polyQ-HTT) affects spindle orientation in mouse cortical progenitors, altering the thickness of the developing cortex (Molina-Calavita et al., 2014). However, the specific role of HTT in postmitotic newborn neurons during cortical development is unknown.

Here, we found HTT enriched in cortical area where cells undergo multipolar-bipolar transition and begin their radial migration. We used a genetic mouse model and in utero electroporation to inactivate *HTT* specifically in postmitotic lineages. We found that HTT regulates the polarization of newly generated cortical neurons through RAB11-dependent recycling of NCAD. Consequently, we observed radial migration defects in absence of HTT and polyQ-HTT did not rescue this phenotype. Most importantly, through the study of HTT in newborn neurons, we provide evidence that defects occurring during embryonic development can specifically impact on neuronal positioning and morphology in the adult cortex.

RESULTS

Huntingtin Is Enriched in Polarizing Neurons of the Developing Cerebral Cortex

We first examined the expression pattern of HTT in postmitotic newborn neurons of the developing mouse cortex. We performed immunostaining on cortical sections of wild-type embryos at different developmental stages (Figure 1A). At E14.5, HTT was more strongly expressed in the IZ than in the VZ and CP layers (Figure 1A). Strikingly, most HTT was restricted to the upper IZ and the lower CP layers at E16.5. However, HTT was also expressed at low levels in the CP, where it was coexpressed with MAP2 (Figures 1A and S1A). Thus, the expression pattern of HTT at E16.5 correlates with the polarization of cortical neurons and with the beginning of their radial migration.

The Presence of Huntingtin in Postmitotic Neurons Ensures Proper Cortical Development

To deplete HTT in differentiated neurons, we inactivated the mouse *HTT* gene in NEX-expressing cell lineages by crossing $HTT^{lox/lox}$ mice harboring floxed *HTT* alleles (Dragatsis et al., 2000) with transgenic mice expressing the CRE recombinase under the control of the NEX promoter, which is active at around E11.5 in postmitotic neurons (Goebbels et al., 2006). In $NEX^{CRE/+}$ embryos, CRE is expressed throughout cortical development in projection neurons derived from the cortical VZ, which migrate radially in the neocortex (Goebbels et al., 2006). HTT immunostaining of E14.5 cortices revealed that in the mutant cortex ($HTT^{lox/lox}$;$NEX^{CRE/+}$), HTT was expressed in neuroprogenitors in the VZ but was absent from neurons in the upper IZ and CP (Figure 1B). By contrast, in control embryos ($HTT^{lox/lox}$;$NEX^{+/+}$), HTT was expressed in the VZ, the upper IZ, and the CP. Furthermore, immunoblotting and immunocytochemical analysis of primary cultures of E14.5 cortical neurons showed that the abundance of HTT protein was substantially lower in mutant embryos expressing CRE recombinase than in control neurons (Figures 1C, 1D, and S1B).

We next analyzed cortical development by immunolabeling control and mutant brains for Nestin and βIII-tubulin, markers of progenitor cells and neurons, respectively (Figure 1E). We measured the thickness of the VZ, IZ, and CP at E14.5 and E16.5. The CP was significantly thinner in mutant than in control embryos at both stages of development (E14.5: 78.1% ± 1.1% in mutant versus 100% ± 1.4% in control mice; E16.5: 81% ± 1.9% in mutant versus 100% ± 3.1% in control mice; Figures 1F and 1G). We also analyzed cell density in control and mutant IZ and CP. Cell density was similar in control and mutant CP but was higher in mutant IZ than in control IZ (123.1% ± 1.9% in mutant versus 100% ± 2.3% in control mice; Figure 1H). Consistent with these observations, the cortex was thinner in $HTT^{lox/lox}$;$NEX^{CRE/+}$ embryos than in control embryos (E14.5: 92.5% ± 0.6% in mutant versus 100% ± 0.7% in control mice; E16.5: 91.2% ± 0.7% in mutant versus 100% ± 1.5% in control mice; Figures 1F and 1G). These differences in cortical thickness were not associated with a high rate of cell death (data not shown) or defects in radial glia integrity (see Nestin immunolabeling in Figure 1E). Thus, HTT depletion in differentiated neurons impairs corticogenesis.

Huntingtin Is Required for the Establishment of Cortical Layers

We then investigated whether the early absence of HTT affects cortical lamination at postnatal day 0 (P0). At this stage, most projection neurons are terminating their migration. We immunostained P0 cortical sections for Tbr1 and Cux1, which are markers of deeper and upper layers, respectively (Figure 2A). Tbr1 labeling revealed no differences between mutant and control mice. By contrast, the number of Cux1-positive cells in deeper layers was higher in mutant than in control mice (Cux1 in layer V/VI: 231.6% ± 17.5% in mutant versus 100% ± 14.8% in control mice; Figure 2B). This localization defect was maintained in P2 animals (Figure S2) and suggests that migration is impaired in the absence of HTT.

We thus used a BrdU birthdating assay to compare the laminar position of BrdU-positive neurons in mutant mice and their control P0 littermates (Figures 2C–2E). We quantified the proportion of neurons in six arbitrarily defined layers of the same size along the cortex. In P0 animals born to mice administered BrdU at E12.5 (the time at which layer VI neurons are born), most BrdU-positive neurons were located in deep layers of the cortex, with no differences between control and mutant brains (Figures 2C and 2D). However, in P0 mutant animals born to mice administered BrdU at E15.5 (the time at which neurons of the upper layers are born), a significant proportion of neurons failed to migrate to the upper layers and stayed in the deeper layers of the cortex (44.8% ± 3% in mutant versus 19.4% ± 1.3% in control mice) (Figures 2C and 2E). Collectively, these results show that HTT-depleted neurons fail to reach their position during corticogenesis leading to altered cortical layering. Notably, the

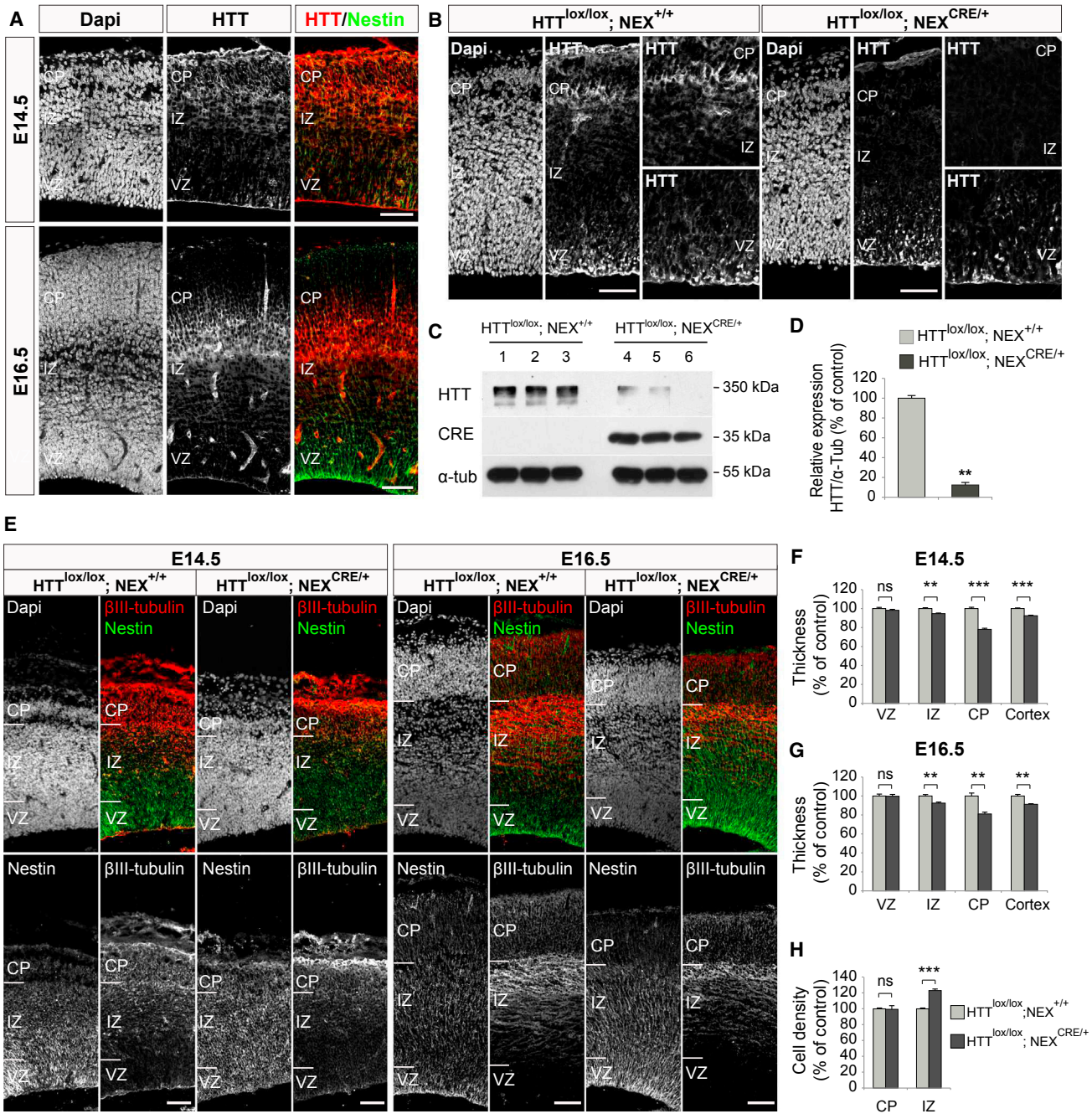


Figure 1. HTT Depletion in Postmitotic Neurons Impairs Corticogenesis

(A) Immunostaining for HTT and Nestin of 14.5 and E16.5 wild-type cortical coronal sections. Nuclei were counterstained with Dapi. VZ, ventricular zone; IZ, intermediate zone; CP, cortical plate.

(B) HTT immunostaining of E14.5 $HTT^{lox/lox}$;$NEX^{+/+}$ (control) and $HTT^{lox/lox}$;$NEX^{CRE/+}$ (mutant) cortical coronal sections. Nuclei were counterstained with Dapi.

(C) HTT, CRE recombinase, and α-tubulin immunoblotting analyses of lysates from E14.5 control and mutant cortical neurons (extracts from three cultures for each genotype are shown).

(D) Quantitative assessment of HTT levels detected by immunoblotting in (C) (n = at least 5 per condition).

(E) βIII-tubulin and Nestin immunostainings of E14.5 and E16.5 control and mutant cortical coronal sections. Nuclei were counterstained with Dapi.

(F and G) Quantitative analysis of VZ, IZ, CP, and overall cortical thicknesses of E14.5 (F) and E16.5 (G) control and mutant embryos (E14.5, control: n = 4, mutant: n = 3; E16.5, control: n = 3, mutant: n = 4).

(H) Quantitative analysis of cell density in the CP and IZ of E16.5 control (n = 3) and mutant (n = 4) brains.

All scale bars, 50 μm. Mann-Whitney U test (D) and Student's t test (F–H); error bars, SEM; ns, not significant, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$.

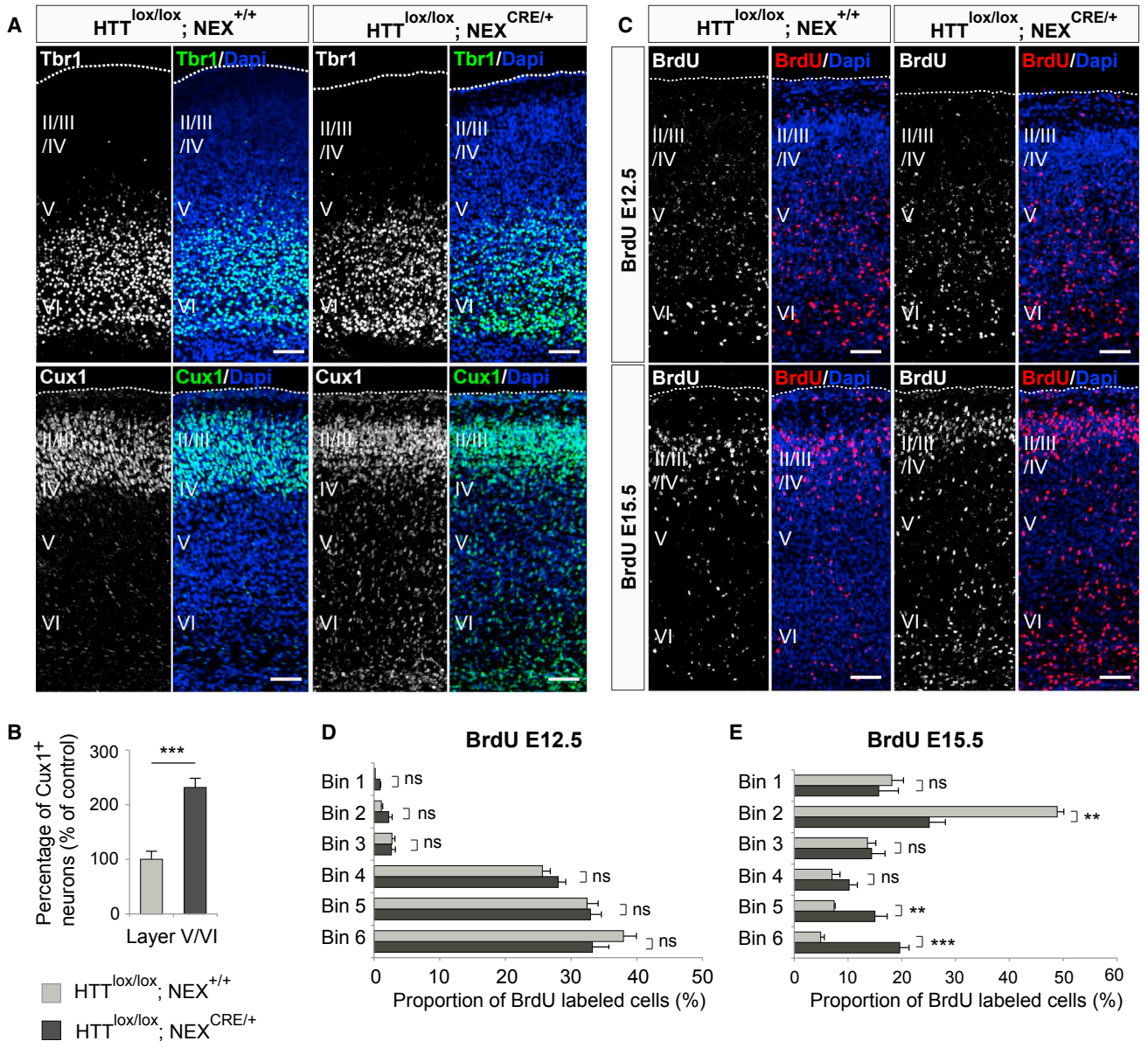


Figure 2. HTT Depletion in Postmitotic Neurons Leads to Abnormal Cortical Lamination

(A) Tbr1 and Cux1 immunostainings of control and mutant P0 cortical sections. Nuclei were counterstained with Dapi.

(B) Quantitative analysis of the distribution of Cux1-positive (Cux1^{+}) neurons in layers V and VI of P0 cortices (n = at least 5 brains per condition).

(C) Pregnant mice were injected with BrdU at E12.5 or E15.5. Coronal sections of brain collected at P0 were analyzed by immunostaining for BrdU. Nuclei were counterstained with Dapi.

(D and E) Cortical sections were divided into six equal bins. Percentage of BrdU-positive neurons in each bin (n = at least 3 brains per condition).

All scale bars, 100 μm. Student's t test; error bars, SEM; ns, not significant, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$.

enrichment of cells in the SVZ/VZ in HTT$^{lox/lox}$;NEX$^{CRE/+}$ embryos (Figure 1H) further suggests that HTT is involved neuronal migration.

Conditional Removal of Huntingtin Impairs Multipolar-Bipolar Transition

To decipher the mechanisms underlying the migration defect observed in HTT$^{lox/lox}$;NEX$^{CRE/+}$ animals, we depleted HTT in projection neurons using in utero electroporation. We electroporated HTT$^{lox/lox}$ E14.5 embryos with plasmids expressing CRE and GFP or GFP only under the control regulatory sequences of the *NeuroD* promoter (ND:CRE-GFP and ND:GFP, respectively). Under this regulatory sequence, NeuroD is expressed in newborn neurons but not in RGPs and Tbr2-positive intermediate progenitors (Figure S3A). Immunohistochemistry of coronal sections of electroporated brains confirmed that ND:CRE-GFP

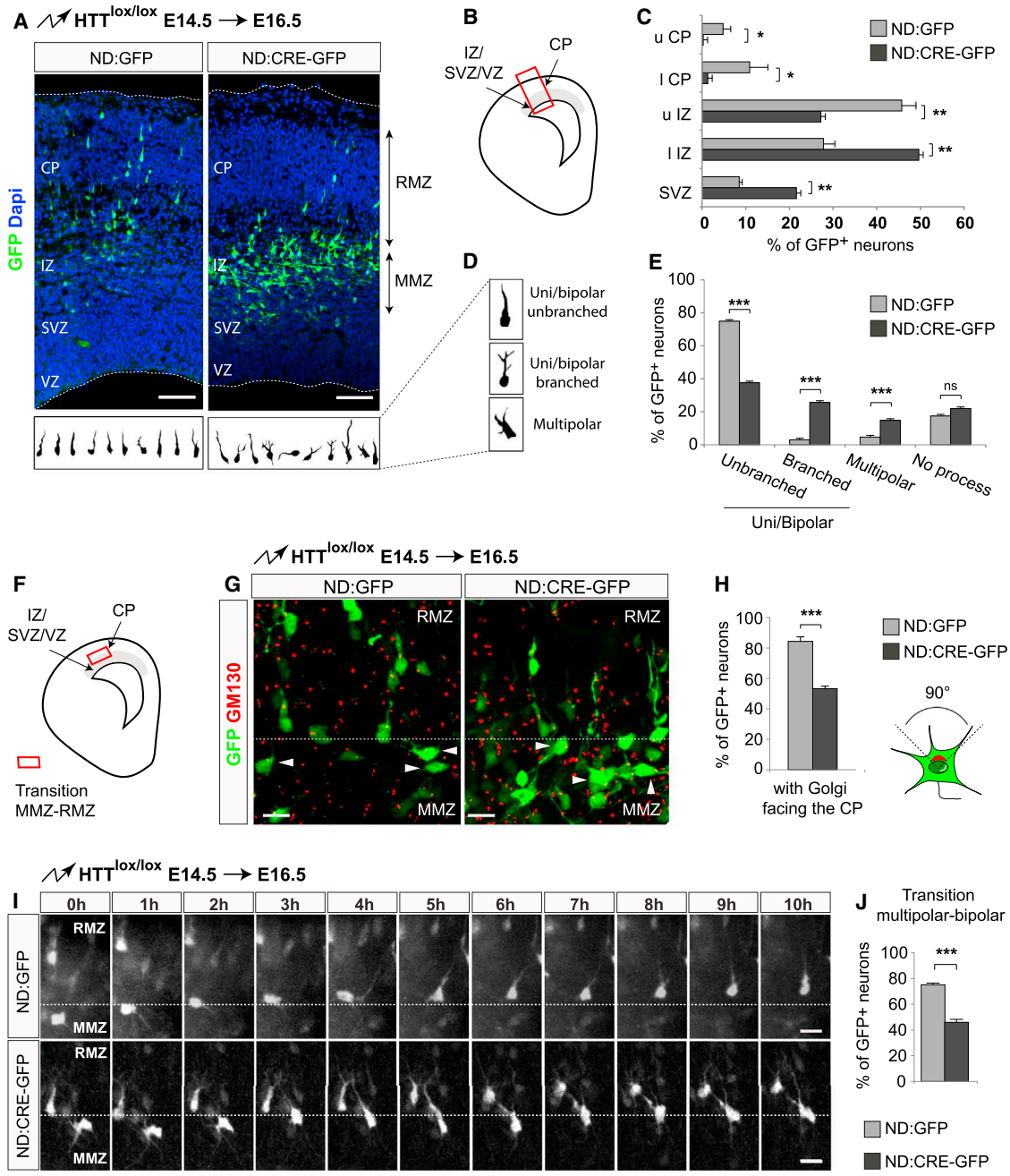


Figure 3. Acute HTT Depletion in Postmitotic Neurons Alters Neuronal Polarization

HTT was depleted in postmitotic projection neurons by electroporation of ND:GFP (control) or ND:CRE-GFP plasmids in E14.5 HTT$^{lox/lox}$ embryos. Cortices were analyzed at E16.5.

(A) Coronal sections of E16.5 embryos were immunostained for GFP and Nuclei counterstained with Dapi. Lower panel: computer-based reconstruction of the shapes of representative GFP-positive neurons. MMZ, multipolar migration zone. RMZ, radial migration zone. Scale bars, 50 μm.

(B) Cartoon illustrating the region shown in (A).

(C) Quantitative analysis showing the distribution of GFP-positive (GFP$^+$) neurons across the different cortical regions (n = at least 4 brains per condition). uCP, upper cortical plate; lCP, lower cortical plate; uIZ, upper intermediate zone; lIZ, lower intermediate zone; SVZ, subventricular zone.

(D) Inset illustrating the various morphologies of neurons (lower part of RMZ).

(E) Percentage of electroporated neurons in lower RMZ with bipolar morphology (unbranched/branched), multipolar morphology, or without process after electroporation of ND:GFP (n = 7) or ND:CRE-GFP (n = 4) plasmids.

(F) Cartoon illustrating the region shown in (G).

(G) Immunostainings for GFP and GM130 (arrowheads) after electroporation of ND:GFP (n = 6) or ND:CRE-GFP (n = 4). Scale bars, 25 μm.

(legend continued on next page)

electroporated neurons expressed CRE recombinase (Figure S3B) and lower levels of HTT than neighboring unelectroporated cells (Figure S3C).

Consistent with previous studies (Jossin and Cooper, 2011), 2 days after the electroporation of E14.5 embryos, control neurons were migrating through the upper IZ and CP (also named the radial migration zone [RMZ]). By contrast, HTT-depleted neurons were mostly confined to the lower IZ and upper SVZ (also named the multipolar migration zone [MMZ]) (Figures 3A–3C). Neurons migrating in the RMZ are known to adopt a bipolar morphology. A smaller proportion of $HTT^{lox/lox}$ ND:CRE-GFP neurons than control neurons adopted this morphology (63.3% ± 1.9% in $HTT^{lox/lox}$ ND:CRE-GFP neurons versus 77.9% ± 3.2% in $HTT^{lox/lox}$ ND:GFP neurons) (Figures 3D and 3E). By contrast, a significantly higher proportion of $HTT^{lox/lox}$ ND:CRE-GFP neurons than $HTT^{lox/lox}$ ND:GFP neurons showed highly branched leading processes (25.7% ± 1.9% in HTT-depleted neurons versus 3% ± 0.9% in control neurons).

Extensive branching of leading processes can result from defects in the transition from multipolar to bipolar stage (Elias et al., 2007; Heng et al., 2008). We used the position of the Golgi apparatus as a marker of cell polarity because when cells polarize, they orient the Golgi apparatus toward the CP. We stained cortical sections from $HTT^{lox/lox}$-electroporated embryos for the Golgi matrix protein GM130 (Figures 3F and 3G). In embryos electroporated with ND:GFP, the Golgi apparatus of most upper MMZ neurons was oriented toward the CP (84.3% ± 3%), whereas the Golgi apparatus was misoriented in cells electroporated with ND:CRE-GFP (53.3% ± 1.6%, Figure 3H). These observations suggest that absence of HTT alters neuronal polarization.

To examine further the role of HTT during the acquisition of bipolar morphology, we used time-lapse videomicroscopy to analyze the dynamics of polarizing neurons in the upper MMZ and lower RMZ (Figures 3F and 3I and Movies S1 and S2). In contrast to the control neurons, many HTT-depleted neurons extended and retracted their processes without adopting the bipolar morphology required to start radial migration. Indeed, a smaller proportion of HTT-depleted neurons than control neurons underwent a multipolar to bipolar transition (45.9% ± 2.2% in HTT-depleted neurons versus 75.2% ± 1.2% in control neurons) (Figure 3J). Furthermore, the analysis of the migratory paths showed that control multipolar neurons in this region moved straight up toward the CP (Figure S3D and Movies S3 and S4). By contrast, most HTT-depleted neurons moved in random directions, which further suggests that HTT is required for multipolar cells to adopt a bipolar morphology and to migrate toward the CP.

Newborn bipolar neurons attach to the radial glia to initiate their locomotive mode of migration. We investigated whether loss of HTT affected this process. We first analyzed whether HTT was present in the leading process of newborn neurons. Endogenous HTT is expressed in all cells of the transition zone (Figure S3E), which rendered its intracellular distribution in individual postmitotic neurons difficult to assess (Figure S3E). We thus electroporated E14.5 embryos with ND:GFP and mcherry-tagged full-length HTT (FLHTT) plasmids (Figure S3F). Both endogenous and exogenously produced HTT were present in the cell body and the leading process of newly generated cortical neurons. We next quantified the attachment of leading processes to radial glia fibers by measuring the angle formed between the leading process of ND:CRE-GFP and ND:GFP electroporated neurons, and the adjacent radial glia in the lower part of the RMZ. Not only were there fewer ND:CRE-GFP than ND:GFP cells becoming bipolar and attaching to the radial glial fiber in HTT-depleted neurons (Figures S3G and S3H), the angle of attachment was higher in HTT-depleted than in control neurons (25.8° ± 1.3° in mutant versus 8.5° ± 1.1° in control). We conclude that HTT regulates the multipolar-bipolar transition of cortical neurons and their attachment to the radial glia fibers.

Huntingtin Is Necessary for the Maintenance of the Bipolar Morphology of Cortical Projection Neurons during the Locomotive Mode of Migration

We then investigated how the depletion of HTT affects later stages when cells migrate through the CP. We electroporated E14.5 $HTT^{lox/lox}$ embryos with ND:CRE-GFP and ND:GFP constructs and examined the position of control and HTT-depleted cells in the cortical wall 4 days later (Figures 4A and S4A). At E18.5, most control neurons had reached the upper layers (bin 1 to 3), whereas many CRE-expressing neurons failed to do so (94% ± 1.4% in control mice versus 74.3% ± 1.7% in mutant mice) (Figures 4A and 4B). The ectopic expression of a construct encoding a full-length HTT tagged with mcherry (HTTFL) restored radial migration in electroporated neurons to levels similar to those observed in control conditions (92.4% ± 3.5% of neurons reached the upper cortex; Figures 4A, 4B, and S4B). HTTFL was not toxic (data not shown) but few cells were electroporated, most probably because the plasmid encoding HTTFL is 15.1 kb (Pardo et al., 2010). Interestingly, HTT-depleted projection neurons were still detected in the deep layers after birth at P2 and most neurons trapped in deep layers expressed the upper-layer marker Cux1 (Figure S4C). This suggests that HTT depletion impairs migration but not laminar specification.

To assess the dynamic of these events, we electroporated E14.5 $HTT^{lox/lox}$ embryos with ND:CRE-GFP or ND:GFP constructs and analyzed organotypic brain cultures using time-lapse videomicroscopy 3 days later (E17.5) (Figures 4C–4H). We specifically focused on neurons that had adopted a bipolar shape and were migrating in the CP (Figure 4D). GFP-positive neurons were recorded for 8 hr. The velocity of migrating $HTT^{lox/lox}$

(H) Percentage of electroporated neurons with Golgi apparatus facing the CP in upper MMZ. The cartoon illustrates a multipolar neuron with the Golgi apparatus facing the CP (ND:GFP: n = 6 brains; ND:CRE-GFP: n = 4 brains).

(I) Organotypic slices were obtained 2 days after in utero electroporation of ND:GFP or ND:CRE-GFP plasmids in E14.5 $HTT^{lox/lox}$ embryos. Sequences from a 10 hr time-lapse experiment are shown. Scale bars, 25 μm.

(J) Percentage of neurons exiting the MMZ in a bipolar shape during the 10 hr recording (ND:GFP: n = 5 brains; ND:CRE-GFP: n = 5 brains).

Student's t test; error bars, SEM; ns, not significant, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

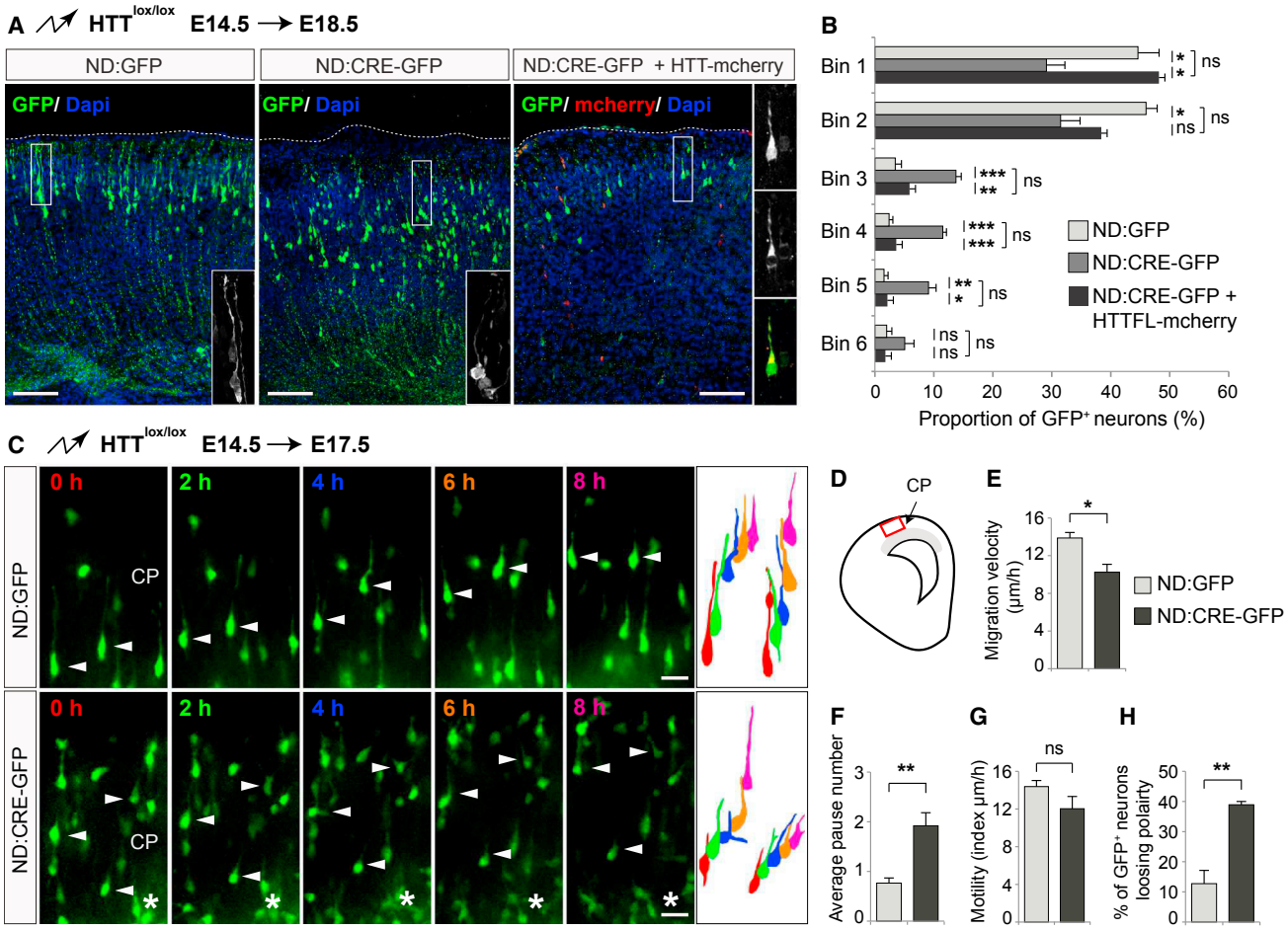


Figure 4. HTT Regulates Neuronal Polarization and Radial Migration

(A) Cortical coronal sections of E18.5 HTT$^{lox/lox}$ embryos electroporated at E14.5 with ND:GFP, ND:CRE-GFP plasmids or ND:CRE-GFP and HTTFL (HTT-mcherry) plasmids. Sections were immunostained for GFP and mcherry. Nuclei were counterstained with Dapi. Scale bars, 100 μm.

(B) Quantitative analysis showing the distribution of GFP-positive (GFP$^+$) neurons across the cortex divided into six equal bins (n = 4 brains per condition). One-way ANOVA; error bars, SEM; ns, not significant, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

(C) Organotypic slices are obtained 3 days after in utero electroporation of ND:GFP or ND:CRE-GFP plasmids in E14.5 HTT$^{lox/lox}$ embryos. Sequences from 8 hr time-lapse experiments are shown. Drawings in the right panels illustrate typical morphologies observed during radial migration. Scale bars, 25 μm.

(D) Cartoon illustrating the regions analyzed in (C).

(E–H) Quantitative analysis of time-lapse experiments as in (C). Migration velocity (E), average pause number (F), motility index (G), and percentage of neurons undergoing bipolar-multipolar-bipolar transition (H) are shown (n = 4 independent time-lapse experiments per condition). Student's t test; error bars, SEM; ns, not significant, *p < 0.05, **p < 0.01.

ND:CRE-GFP neurons was lower than that of control neurons (10.2 ± 0.8 μm/hr ± in HTT-depleted neurons versus 13.9 ± 0.6 μm/hr in control neurons) (Figure 4E). However, HTT-depleted neurons paused more often than control neurons (Figure 4F). When pauses were subtracted from the analysis, the motility index was similar in both conditions (Figure 4G). Furthermore, bipolar neurons electroporated with ND:CRE-GFP lost their shape more readily than ND:GFP neurons during the recording (Figures 4C and 4H and Movies S5 and S6). Collectively, these results show that HTT ensures progression through the successive phases of radial migration by regulating both the initial multipolar-bipolar transition and the maintenance of polarization during migration.

HTT Mediates It Effects through RAB11-Dependent NCAD Trafficking

As HTT binds RAB11 and regulates RAB11-dependent recycling activity (Elias et al., 2015; Li et al., 2008), we hypothesized that HTT may affect neuronal polarization and maintenance through the RAB11-mediated trafficking of NCAD in cortical neurons. We first analyzed their distribution in the developing neocortex. These proteins showed overlapping expression in the IZ at E14.5 where cells undergo multipolar-bipolar transition (Figure 5A). To describe HTT and NCAD distribution in individualized neurons, we electroporated E14.5 embryos with ND:GFP. We found that HTT and NCAD colocalized in leading process of migrating neurons (Figure 5B).

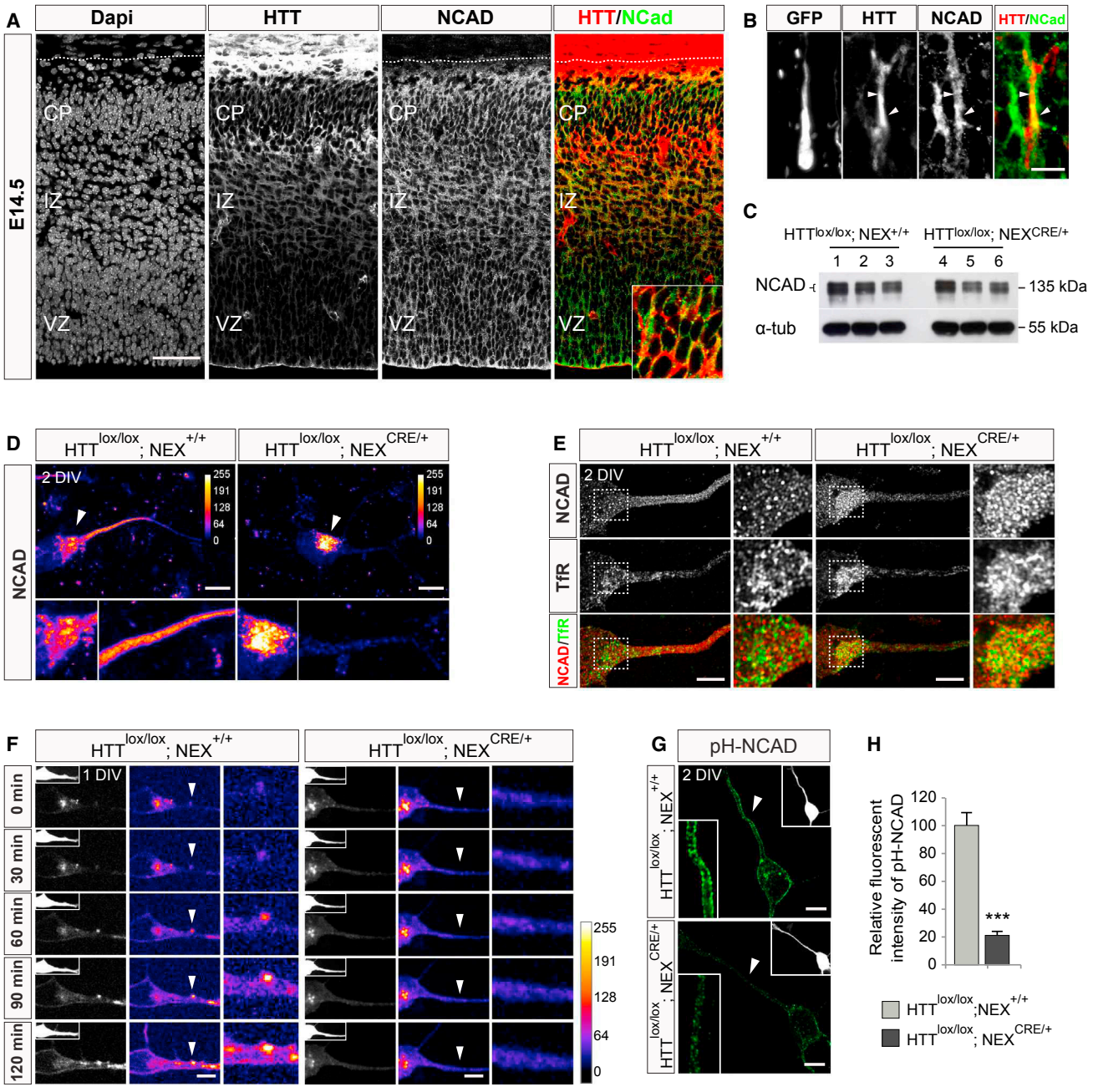


Figure 5. HTT Mediates NCAD Trafficking during Cortical Development

(A) E14.5 wild-type cortical coronal sections are stained for NCAD and HTT. Nuclei were counterstained with Dapi. VZ, ventricular zone; IZ, intermediate zone; CP, cortical plate. Scale bar, 50 μm.

(B) Immunostaining for GFP, HTT, and NCAD after electroporation of ND:GFP in E14.5 wild-type embryos. Scale bar, 20 μm.

(C) NCAD and α-tubulin (α-tub) immunoblotting analyses of lysates from primary cultures of $HTT^{lox/lox}$;$NEX^{+/+}$ (control) and $HTT^{lox/lox}$; $NEX^{CRE/+}$ (mutant) cortical neurons (E14.5).

(D) NCAD immunostaining of primary cultures of control and mutant cortical neurons. Dynamic range of fluorescent intensity is displayed as a pseudocolor representation. As indicated by the color bar, white or blue represents strong or weak fluorescent intensity. Arrowheads show the perinuclear accumulation of NCAD. Scale bar, 20 μm.

(E) NCAD and Transferrin receptor (TfR, marker for recycling endosomes) immunostainings of primary cultures of control and mutant cortical neurons. Scale bar, 10 μm.

(F) Time-lapse images showing control and mutant cortical neurons expressing pH-NCAD and DsRed (upper insets). High magnification (indicated by arrowheads; right panels) is shown. As indicated by the color bar, white or blue represents strong or weak fluorescent intensity. Scale bar, 10 μm.

(legend continued on next page)

We next isolated cortical neurons from $HTT^{lox/lox}$;$NEX^{+/+}$ and $HTT^{lox/lox}$;$NEX^{CRE/+}$ mice at E14.5. Immunoblotting showed that the loss of HTT specifically in cortical neurons did not perturb the overall expression of NCAD (Figure 5C). We analyzed the subcellular distribution of NCAD by immunostaining. In control neurons in culture, NCAD was present both in the cell body and growing neurites, whereas in mutant cells, it accumulated in the perinuclear region, suggesting that HTT is required for the trafficking of NCAD to neuronal processes (Figure 5D). We then assessed the subcellular localization of NCAD accumulation induced by HTT loss. In control neurons, NCAD co-localized partially with calnexin, GM130, TGN38, and transferrin receptor, markers for endoplasmic reticulum, Golgi network, trans-Golgi network, and recycling endosomes, respectively (Figures 5E and S5). The abnormal accumulation of NCAD in HTT-depleted neurons co-localized with transferrin receptor but barely with calnexin, GM130, and TGN38 suggesting that HTT depletion induced defects in vesicular recycling of NCAD in neurons.

We then analyzed specifically cell surface NCAD by expressing pHluorin-N-cadherin (pH-NCAD) plasmid (Bian et al., 2015) (Figures 5F–5H). We first used time-lapse videomicroscopy to assess the dynamic behavior of surface NCAD in live cells 24 hr after plating at the time when pH-NCAD started to be expressed (Figures 5F and Movies S7 and S8). In $HTT^{lox/lox}$;$NEX^{+/+}$ neurons, the signal for the surface NCAD progressively increased in cell body and neurites, while it was almost absent in $HTT^{lox/lox}$;$NEX^{CRE/+}$ neurons during 120 min movies. As a consequence, 2 days after plating, surface NCAD was detected in cell bodies and processes of control neurons. By contrast, surface NCAD intensity was much lower in mutant neurons (100% ± 9.2% in control neurons versus 21.1% ± 2.9% in mutant neurons) (Figures 5G and 5H).

We asked whether HTT mediates its effect through the regulation of RAB11. We expressed different variants of GFP-tagged RAB11 in cultures of $HTT^{lox/lox}$;$NEX^{+/+}$ and $HTT^{lox/lox}$;$NEX^{CRE/+}$ neurons (Figures 6A–6C). In control neurons, the expression of wild-type RAB11 ($RAB11^{WT}$) or the constitutively active $RAB11^{Q70L}$ (a permanently GTP-bound state) did not influence the distribution of NCAD. The dominant-negative $RAB11^{S22N}$ (a permanently GDP-bound state) accumulated in the cytoplasm and affected the localization of NCAD (Figures 6A and 6B). In comparison, expression of $RAB11^{WT}$ or $RAB11^{Q70L}$ variants rescued, at least in part, the defects in NCAD localization induced by the absence of HTT.

To address the functional relevance of these findings in vivo, we electroporated E14.5 $HTT^{lox/lox}$ embryos with HA-tagged NCAD (NCAD-HA; 0.5 μg/μL) (Kawauchi et al., 2010) and ND:CRE-GFP or ND:GFP constructs and analyzed the distribution of NCAD. In vivo NCAD localization was concentrated in the perinuclear region of cells in the absence of HTT, whereas it was present in the leading process in control cells (Figures 6D and 6E). The expression of $RAB11^{WT}$ restored the localization of NCAD in leading process. Together, this shows that HTT is instrumental for the trafficking of NCAD to neuronal processes in a RAB11-dependent manner.

We then wondered whether NCAD and $RAB11^{WT}$ could rescue the delay in migration phenotype induced by loss of HTT. We focused on this phenotype, as it is a global readout of HTT postmitotic loss. We electroporated E14.5 $HTT^{lox/lox}$ embryos with ND:CRE-GFP and RAB11 or NCAD-HA constructs (Figures 6F and 6G). We used 1.5 μg/μL NCAD-HA plasmid concentration, as a lower concentration (used in Figure 6E) was not sufficient to observe a rescue phenotype (data not shown). Remarkably, most control neurons and HTT-depleted neurons electroporated with RAB11 or NCAD-HA had reached the upper layers at E18.5, whereas many CRE-expressing neurons failed to do so (74.3% ± 1.7% in ND:CRE-GFP; 86.5% ± 2.1% in ND:CRE-GFP+RAB11, 79.8% ± 2.7% in NDCRE-GFP+NCAD-HA versus 94% ± 1.4% in ND:GFP conditions). However, the rescue of loss of HTT-induced defects by NCAD was not complete and a significant proportion of NCAD-HA-expressing neurons stayed in deeper layers of the neocortex. This may be linked to the fact that expression of NCAD-HA per se led to abnormalities in neuronal migration in control cortices (Figures S6A and S6B; previously described in Kawauchi et al., 2010; Rago et al., 2014). In contrast, RAB11 had no effect on control neurons (Figures S6A and S6B) and almost all HTT-depleted neurons expressing RAB11 reached the upper layers.

Overall, these findings show that HTT regulates NCAD trafficking through a RAB11-dependent process, which subsequently affects neuronal polarization and migration in the developing cortex.

PolyQ-HTT Impairs Migration of Newborn Cortical Neurons

Because part of the HD pathological events may be attributable to the loss or modifications of the normal functions of wild-type HTT (Saudou and Humbert, 2016), we next asked whether the HD-causing mutation in HTT would impact on migration. We electroporated E14.5 $HTT^{lox/lox}$ embryos with ND:CRE-GFP and HTT-17Q or HTT-68Q (Figure 7A). These constructs encode the first 480 amino acid fragments of wild-type (HTT-17Q) or polyQ-HTT (HTT-68Q) (Molina-Calavita et al., 2014). Loss of HTT led to a delay in migration and the wild-type 480 fragment was sufficient to recapitulate the function of HTT during migration (Figures 7A–7C and S7). In contrast, polyQ-HTT was not able to compensate for the loss of HTT, showing that HD pathological HTT has lost the capacity to promote neuronal migration.

We also wondered whether RAB11 could compensate for the delay in migration observed when polyQ-HTT was expressed. Expression of RAB11 rescued polyQ-HTT-induced defect in migration, suggesting that RAB11 acts downstream of HTT (Figures 7A–7C). These data are in agreement with previous in vitro studies showing that RAB11 activity is impaired in HD conditions, and this impairment can be rescued by expressing RAB11 (Li et al., 2009).

(G) Primary cultures of control and mutant cortical neurons are co-transfected with pH-NCAD and Ds-Red and stained for GFP (green, high magnification in lower inset) and DsRed (upper insets). Scale bar, 10 μm.

(H) Quantitative analysis of fluorescent intensity of surface NCAD (pH-NCAD) in the distal region of the longest neurite of transfected cells as in (F). Data are from three independent experiments. Student's t test; error bars, SEM; ***$p < 0.001$.

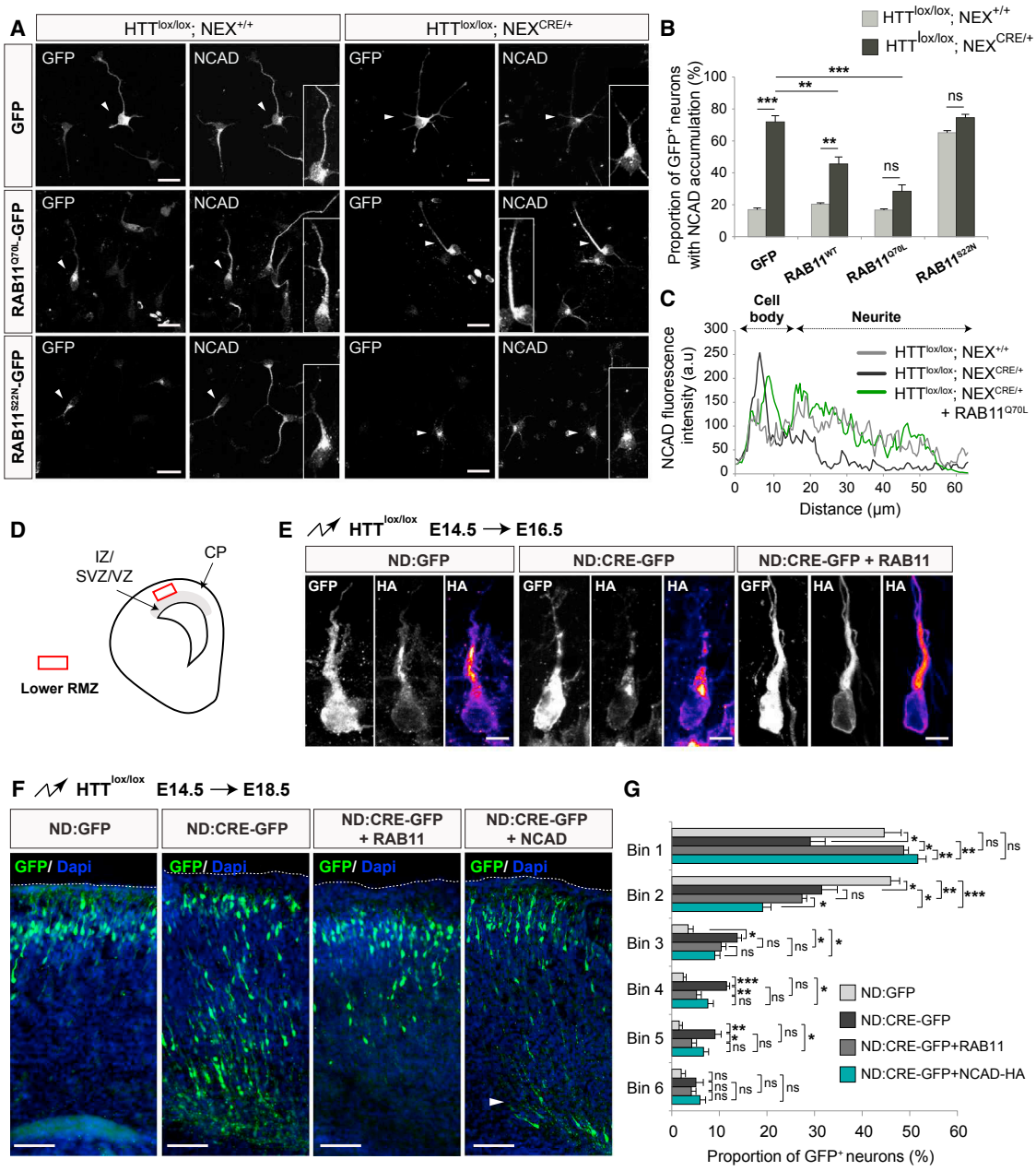


Figure 6. RAB11 Rescues Loss of HTT-Induced Defects on NCAD Localization and Neuronal Migration

(A) Primary cultures of cortical neurons from control ($HTT^{lox/lox}$;$NEX^{+/+}$) and mutant ($HTT^{lox/lox}$; $NEX^{CRE/+}$) embryos are transfected with the indicated plasmids and immunostained with anti-GFP and -NCAD antibodies. Scale bars, 25 μm.

(B) Percentage of control and mutant cortical neurons transfected with the indicated plasmids showing a perinuclear accumulation of NCAD. Data are from three independent experiments.

(C) Representative line scan analysis showing the distribution of NCAD in the indicated conditions.

(D) Cartoon illustrating the region shown in (E).

(E) Cortical coronal sections of embryos electroporated with NCAD-HA and the indicated plasmids. Sections were immunostained for GFP and HA. Scale bars, 10 μm.

(F) Cortical coronal sections of E18.5 $HTT^{lox/lox}$ embryos electroporated at E14.5 with indicated plasmids. Sections were immunostained for GFP and nuclei were counterstained with Dapi. Scale bars, 100 μm.

(G) Quantitative analysis showing the distribution of GFP-positive (GFP^+) neurons across the cortex divided into six equal bins (n = at least 3 brains per condition). One-way ANOVA; error bars, SEM; ns, not significant, *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$.

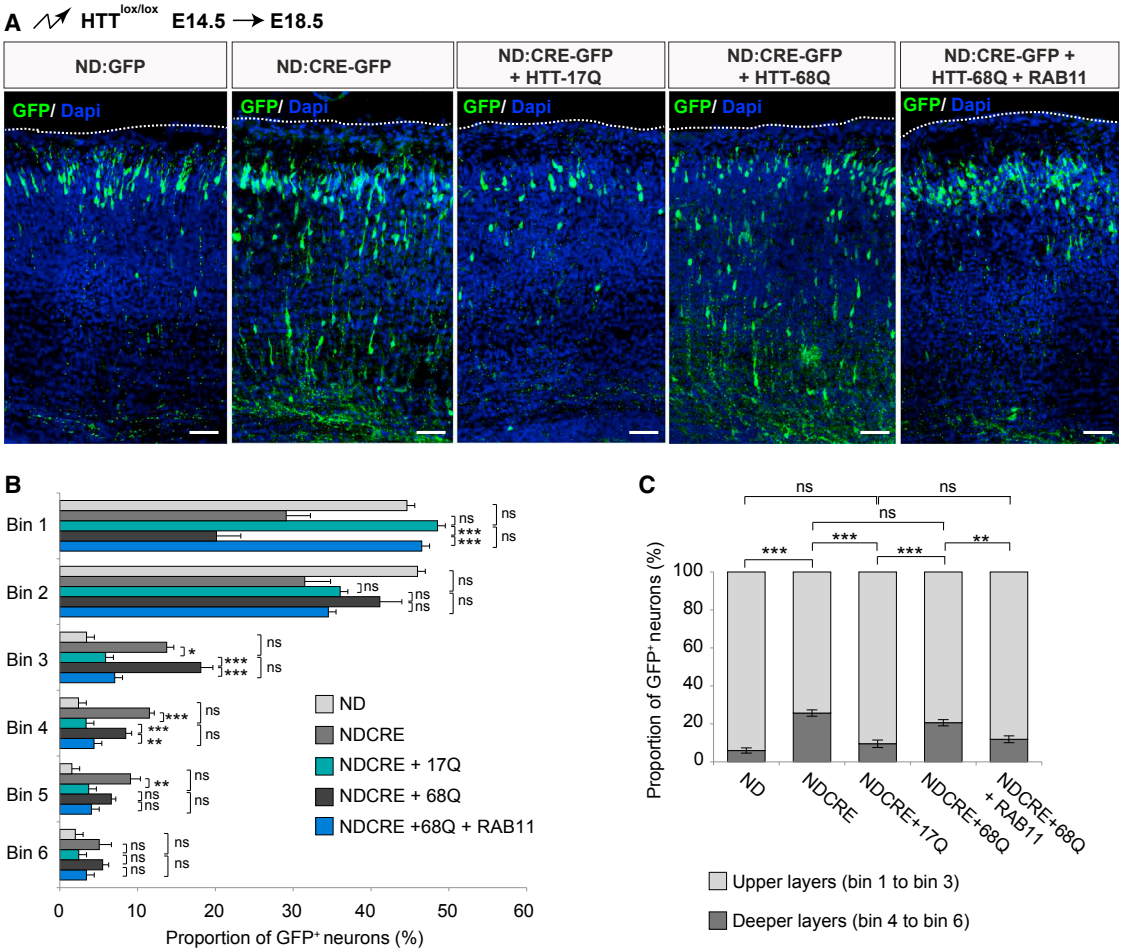


Figure 7. PolyQ-HTT Impairs Radial Migration of Newborn Cortical Neurons

(A) Cortical coronal sections of E18.5 $HTT^{lox/lox}$ embryos electroporated at E14.5 with indicated plasmids. Sections were immunostained for GFP. Nuclei were counterstained with Dapi. Scale bars, 50 μm.

(B) Quantitative analysis showing the distribution of GFP-positive (GFP^+) neurons across the cortex divided into six equal bins (n = at least 3 brains per condition).

(C) Quantitative analysis showing the proportion of GFP-positive (GFP^+) neurons in upper layers (bin 1 to bin 3) and deeper layers (bin 4 to bin 6; n = 3 brains per condition) of cortex. One-way ANOVA; error bars, SEM; ns, not significant, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

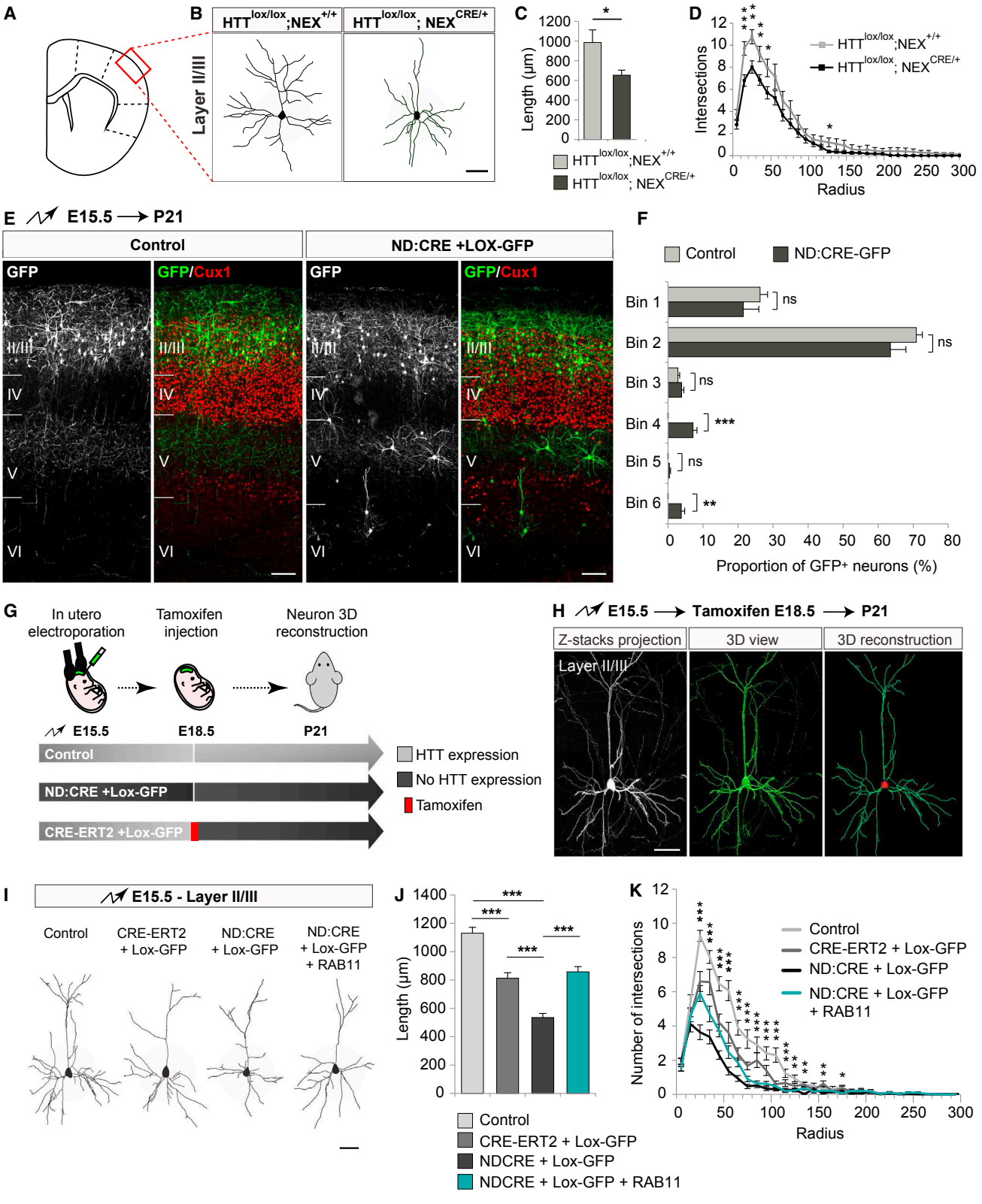
Taken together, we show that polyQ-HTT impacts on cortical radial migration in a RAB11-dependent manner by a loss-of-function mechanism.

Cortical Defects Induced by the Postmitotic Loss of HTT Are Maintained in Adult Brains

We then used the $HTT^{lox/lox}$;$NEX^{CRE/+}$ genetic mouse model to test whether HTT depletion in newly generated postmitotic neurons affects the brain in P21 young adults. We performed BrdU birthdating assays and found no differences between P21 control and mutant animals born to mice administered BrdU at E12.5 (data not shown). As expected, in $HTT^{lox/lox}$;$NEX^{+/+}$ and $HTT^{lox/lox}$;$NEX^{CRE/+}$ animals born to mice administered BrdU at E15.5, most BrdU-positive cells were located in the upper cortical layers (Figures S8A and S8B). However, in $HTT^{lox/lox}$;$NEX^{CRE/+}$ animals, a significant proportion of neurons failed to migrate and stayed in the deep cortical layers (14.1% ± 2% in mutant versus 5% ± 0.6% in control mice). Consistent with these findings, the deep layers and the lower part of the superficial layers contained substantially more Cux1-expressing neurons in mutant mice than in their control littermates (Figure S8A).

We next investigated whether the depletion of HTT affects neuronal morphology; therefore, we stained control and mutant cortical coronal sections using the Golgi-Cox method and traced the dendrites of pyramidal neurons in layer II/III (Figures 8A and 8B). Sholl analysis revealed that in mutant mice, the dendrites of layer II/III neurons were shorter than in control mice (655.2 μm ± 45.4 μm in mutant versus 1,006.5 μm ± 136 μm in control; Figure 8C) and dendritic arborization was less complex (Figure 8D).

Thus, the defects of cortical lamination induced by the specific loss of HTT after neuronal differentiation are maintained in young adults and are accompanied by changes in the arborization of projection neurons.



(legend on next page)

Adult Neuronal Morphology Depends on Developmental Expression of HTT

We next precisely asked whether the P21 morphological changes observed in absence of HTT arise from developmental functions of HTT. We first co-electroporated E15.5 $HTT^{lox/lox}$ brains with ND:CRE-GFP and a CRE-dependent GFP reporter (Lox-GFP) (Matsuda and Cepko, 2007) and analyzed the distribution of GFP-positive neurons in P21 brains (Figures 8E and 8F). We combined the use of ND:CRE-GFP and Lox-GFP constructs to amplify the signals allowing visualization at P21 stage. Compared to controls in which all electroporated neurons have reached the Cux1-positive upper cortical layers, a significant proportion of HTT-depleted neurons failed to reach these layers and was trapped in the deepest layers (11.3% ± 1.9%) showing that HTT-mediated regulation of cortical lamination is cell autonomous.

We then used in utero electroporation to specifically decrease HTT levels during embryonic and postnatal stages or postnatal stages only (Figure 8G). To delete HTT from development to P21 in differentiated neurons destined to become layer II/III neurons, we co-electroporated E15.5 $HTT^{lox/lox}$ brains with ND:CRE-GFP and Lox-GFP constructs. To delete HTT when projection neurons have terminated their migration and reached their location in the cortex, we co-electroporated E15.5 $HTT^{lox/lox}$ brains with a tamoxifen-dependent ERT2-CRE-ERT2 construct (CRE-ERT2) (Matsuda and Cepko, 2007) and Lox-GFP. We then injected pregnant mice carrying these embryos with tamoxifen at E18.5. As expected, removing HTT from postnatal neurons in these conditions did not affect their laminar location (Figures S8C and S8D). To analyze neuronal morphology in the different conditions, we performed three-dimensional reconstruction of layer II/III individualized neurons followed by sholl analysis (Figures 8H–8K). Postnatal deletion of HTT induced a decrease of dendritic length (813 μm ± 38.8 μm in CRE-ERT2 neurons versus 1,131 μm ± 40.8 μm in control conditions; Figures 8I and 8J) and dendritic branching (Figures 8I and 8K). Strikingly, we observed an even stronger decrease of dendritic length (535.3 μm ± 29.2 μm) and dendritic branching when HTT was depleted from embryonic development to P21. Finally, we co-electroporated E15.5 $HTT^{lox/lox}$ brains with ND:CRE-GFP, Lox-GFP, and RAB11 constructs and found that loss of HTT-induced P21 abnormalities in lamination and neuronal morphogenesis were rescued by expressing RAB11 (Figures 8I–8K, S8C, and S8D).

Taken together, these results unequivocally show that although HTT participates to postnatal regulation of dendritic morphogenesis, the RAB11-dependent polarization defects induced by embryonic loss of HTT participate to impaired adult neuronal morphology.

DISCUSSION

HTT is a large stable protein that acts as a scaffold in several cellular pathways including the regulation of intracellular dynamics of various cargoes (Saudou and Humbert, 2016). Notably, HTT mediates vesicular recycling by binding to and regulating RAB11 (Li et al., 2008; Power et al., 2012). We recently showed that HTT also regulates RAB11-dependent recycling during epithelial morphogenesis (Elias et al., 2015), which ensures the microtubule- and kinesin-1-dependent apical vesicular translocation of PAR3-aPKC. Kawauchi and colleagues reported that RAB11 is involved in the transition from multipolar to bipolar migration (Kawauchi et al., 2010). They found that RAB11 regulates the trafficking of NCAD to cortical neuronal processes via recycling endosomes. We observe here that in HTT-deficient neurons, NCAD accumulates in the cell body, not in neuronal processes. An active form of RAB11 rescues this phenotype. We thus propose a model in which HTT is required for the transition from multipolar to bipolar morphology, which occur at least in part through the RAB11-dependent trafficking of NCAD. Indeed, while NCAD expression largely rescues the migration delay induced by HTT depletion, we cannot exclude that HTT mediates part of its effect through the RAB11-dependent recycling of other cargoes including polarity complexes like PAR3-aPKC.

HTT acts in a cell-autonomous manner since HTT-mediated abnormalities in NCAD recycling in neurons are sufficient to alter cellular polarization, independently of radial glia physiology. Interestingly, Rago and collaborators reported different effects on the migratory behavior of newborn neurons depending on the specific cell type in which NCAD was depleted (Rago et al., 2014). Consistent with this, knockdown of HTT in all cells of the E12.5 neuroepithelium strongly affects neuronal migration (Tong et al., 2011), while in our study the postmitotic deletion

Figure 8. The Role of HTT during Development Contributes to Adult Neuronal Morphology

(A) Cartoon of P21 coronal brain section indicating the region of interest and the neurons that were analyzed in (B)–(D).

(B) Representative traces of cortical pyramidal neurons in layer II/III from Golgi-Cox-stained P21 brain sections from control and mutant mice. Scale bars, 50 μm.

(C and D) Quantification of dendritic outgrowth (C) and Sholl analysis (D) of neurons described in (B) (n = 4 brains per condition). Student's t test; error bars, SEM; ns, not significant, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

(E) Cortical coronal sections of P21 $HTT^{lox/lox}$ brains electroporated at E15.5 with ND:CRE-GFP and Lox-GFP plasmids. Sections were immunostained for GFP and Cux1. Nuclei were counterstained with Dapi. Scale bars, 100 μm.

(F) Quantitative analysis showing the distribution of GFP-positive (GFP^+) neurons across the cortex divided into six equal bins (n = 3 brains per condition). Student's t test; error bars, SEM; ns, not significant, **p < 0.01, ***p < 0.001.

(G) Experimental procedure to delete HTT in layer II/III neurons from embryonic neuronal differentiation to P21 or from the end of neuronal migration to P21. Control corresponds to wild-type mice electroporated with ERT2-CRE-ERT2 (CRE-ERT2) + Lox-GFP. Other conditions: $HTT^{lox/lox}$ mice were electroporated as indicated.

(H) Representative images illustrating the different steps of the three-dimensional (3D) reconstruction of dendritic arborization. A P21 layer II/III neuron is shown: E15.5 embryos were electroporated with ERT2-CRE-ERT2 and lox-GFP constructs and CRE expression was induced upon tamoxifen injection of E18.5 pregnant mice. Scale bars, 50 μm.

(I–K) Representative traces (I), quantification of dendritic outgrowth (J), and Sholl analysis (K) of layer II/III cortical neurons from P21 brains in the indicated conditions (n = 3 brains per condition). Scale bar, 50 μm (I). One-way ANOVA; error bars, SEM; ns, not significant, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

of HTT did not affect the migration of layer VI neurons. Overall, our data clearly show that the postmitotic expression of HTT is required for the proper positioning of neurons along the CP.

Neuronal dendritic arborization is acquired during late cortical development, when neurons have finished migrating to their correct position in the cortex. Our study demonstrates that HTT is crucial for adult dendritic morphology. We show that dendritic morphology in young adults is impacted by the embryonic loss of HTT, corroborating previous studies (McKinstry et al., 2014). In addition, we unequivocally demonstrate that HTT functions during both the embryonic and postnatal development periods contribute to dendritic morphogenesis. Further work is required to identify the exact molecular mechanisms underlying the role of HTT during postnatal dendritic maturation. The early loss of HTT induced stronger defects than those observed when HTT was depleted postnatally. This phenotype may be explained by the fact that, in addition to postnatal maturation defects, delayed migrating neurons may have inappropriate spatiotemporal specific signals provided by cortical target regions.

The morphogenesis of dendrites is crucial for the proper functional integration in neuronal circuitry and the establishment of neuronal connectivity. Defects in dendritic morphogenesis lead to neuronal network dysfunctions associated with human neurodevelopmental diseases (Copf, 2016). Thus, our study provides further evidence that HD may be added to the list of neurodevelopmental disorders. A recent work shows that expressing mutant HTT during development is sufficient to induce some HD phenotypes in mouse (Molero et al., 2016). We previously found that polyQ-HTT leads to changes in the developing cortex by interfering with mitosis of neuronal progenitors (Molina-Calavita et al., 2014). We now observe that polyQ-HTT impairs migration of newly generated neurons, further suggesting that development is abnormal in HD. Consistent with the idea, the intracranial adult brain volume of carriers of the HD mutation is smaller than that of controls, even before the onset of the disease, which probably reflects abnormal development (Nopoulos et al., 2010). The evaluation of basic anthropometric measurements shows that children at risk of HD have disproportionately small heads, suggestive of abnormal brain growth (Lee et al., 2012). Early developmental abnormalities may contribute to the susceptibility of projection neurons in HD patients (Heinsen et al., 1994; Nana et al., 2014; Rosas et al., 2002, 2008). Finally, developmental defects may underlie specific prodromal neurological signs of HD (Tabrizi et al., 2009), which are increasingly studied because preventive treatment strategies targeting the presymptomatic stages are of major importance given the monogenetic nature of HD.

In conclusion, our study reveals that HTT is a key intrinsic regulator of the RAB11-NCAD polarity pathway during cortical development. Furthermore, we unequivocally provide evidence that HTT function during development impacts on neuronal positioning and morphology in the adult cortex.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mice

A full description of mouse lines and genotyping is available in Supplemental Information. For BrdU birthdating assay, E12.5 or E15.5 pregnant female received a single intraperitoneal injection of BrdU (Sigma, 50 mg/kg). Tamoxifen (Sigma, 100 mg/kg) was injected intraperitoneally in E18.5 pregnant female.

All experiments were performed in accordance with local animal welfare committee (Comité Local Grenoble Institute Neurosciences, C2EA-04) and EU guidelines (directive 2010/63/EU). Every precaution was taken to minimize stress and the number of animals used in each series of experiments.

DNA Constructs

Plasmids DNA were prepared using a Plasmid Endofree Maxi Kit (QIAGEN). pNeuroD-IRES-GFP (ND:GFP) and pNeuroD-IRES-CRE-GFP (ND:CRE-GFP) were as in (Volvert et al., 2014). To obtain pCAGGS-pARIS-FL-mcherry construct (HTTFL), we inserted the AgeI-BstBI fragment of the corresponding pARIS-FL-mcherry construct (Pardo et al., 2010) in the pCAGGS plasmid. GFP-RAB11A wild-type (WT), dominant-negative (S22N), and constitutively active (Q70L) (RAB11^{WT}, RAB11^{S22N}, and RAB11^{Q70L}, respectively) constructs were obtained from B. Goud (Institut Curie, France). RAB11-WT and NCAD-HA were obtained from T. Kawauchi (Keio University School of Medicine, Japan). pH-NCAD was obtained from Xiang Yu (Institute of Neuroscience, Shangai, China). pCAG-ERT2CreERT2 (plasmid 13777) and pCALNL-GFP (plasmid 13770) were purchased from Addgene.

In Utero Electroporation

Timed-pregnant mice were anesthetized with isoflurane in oxygen carrier, and the uterine horns were exposed through a midline abdominal incision. Plasmid solutions containing 1.5–3 μg/μL of DNA, mixed with 0.05% Fast Green, were injected into the lateral ventricles of the embryos using a heat-pulled capillary and a Femtojet microinjector (VWR International). Electroporation (five pulses of 35 V for 50 ms with an interval of 950 ms) was performed using 5 mm platinum tweezers electrodes (CUY650P5, Sonidel) connected to a NEPA21 electroporator (NepaGene).

Tissue Processing and Labeling, Immunocytochemistry, and Immunoblotting

Embryonic brains were dissected in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) solution in PBS at 4°C overnight. For postnatal brains, animals were deeply anesthetized on ice (P0 and P2 animals) or by intraperitoneal injection of a solution containing 7.4 mg/kg xylazine (Rompun, 2%; Bayer) and 146 mg/kg ketamine (Imalgène 500; Mérieux) (P21 animals). Animals were perfused transcardially with PBS followed by 4% PFA. Brains were dissected and postfixed overnight in 4% PFA. Fixed samples were cryoprotected overnight in 20% sucrose in PBS at 4°C, embedded in OCT Compound (VWR International), cryosectioned (10–20 μm), and placed onto slides for analyses (SuperFrost-plus, Thermoscientific). A full description of immunocyto- and histochemistry, immunoblotting, Golgi-Cox staining, and preparation of primary cultures of cortical neurons is available in Supplemental Information.

Time-Lapse Videomicroscopy

HTT$^{lox/lox}$ embryos were electroporated with appropriate plasmids at E14.5. Two or three days later, embryos were dissected and brains processed for organotypic slice culture as described (Polleux and Ghosh, 2002). Individual slices were imaged with an inverted confocal microscope (SP5, Leica). Movies were composed of sequential 500 ms stills, taken at 30 min intervals over periods of at least 10 hr. ImageJ software was used for quantitative evaluation of migration velocities and time pausing by manually recording the distance traveled by the cell body of GFP-positive neurons over the imaging period. For time-lapse analysis on dissociated neurons: individual cells were imaged a using an inverted microscope (Axio Observer, Zeiss) with a 63× 1.46 NA oil-immersion objective coupled to a spinning-disk confocal system (CSU-W1-T3; Yokogawa) connected to an EM-CDD camera (ProEM+1024, Princeton Instrument).

Image Analyses

Confocal images were acquired using an inverted confocal microscopy (LSM710, Zeiss) and analyzed using NIH ImageJ (PC version: http://rsbweb.nih.gov/ij/). High-resolution images were acquired using an inverted confocal

microscope (LSM710, Zeiss) with Airyscan detector and a 63× objective (1.4 NA, Zeiss). VZ, IZ, and CP were distinguished based on cell density and staining (Nestin and βIII-tubulin). Nearly identical areas in the presumptive somatosensory cortex of anatomically matched brain sections were chosen for analyses. For cell density analyses, cells were counted in ImageJ in selected same size areas. For binned analyses, the cortex was divided into six equal bins and all GFP^+ or $BrdU^+$ neurons in each bin were counted. Subdivisions (lower and upper parts) of the IZ and CP were delineated by an equal partitioning of each zone into subregions. For analysis of neuronal morphology in the lower part of RMZ (E16.5), the percentage of neurons exhibiting the following morphologies was calculated: multipolar (at least three processes), unipolar/bipolar, unipolar/bipolar stage with highly branched leading processes, or no processes. Scan function of ImageJ was used to reveal fluorescence intensity (pixels/area) of NCAD along neurites. Only neurites longer than one soma diameter were taken into account. Images were collected under identical non-saturating conditions. For the quantitative estimation of perinuclear NCAD accumulation, cortical neurons (2DIV) were immunostained with anti-NCAD and -GFP antibodies. The criterion for perinuclear NCAD accumulation was the high fluorescence intensity of NCAD at the perinuclear region defined by ImageJ software. As indicated by the color bar in Figure 5D, white or blue represents strong or weak fluorescent intensity. For pH-NCAD analysis, primary cortical neurons were immunostained with anti-GFP (pH-NCAD) and -DsRed antibodies and fluorescent signals were measured using ImageJ software. DsRed fluorescent signals were also measured and the ratio of EGFP to DsRed fluorescent signals was calculated.

To analyze dendritic length and arborization, we traced cell bodies and apical and basal dendrites using the Neurolucida software (MBF Bioscience, 40×). Total dendrite outgrowth and Sholl analysis were calculated (Neurolucida software). The dendritic tree of individual GFP-expressing cortical neurons was examined in detail by three-dimensional (3D) confocal imaging of GFP fluorescence. Stacks of serial optical sections were captured with a Zeiss LSM710 confocal microscope equipped with an X40 oil-immersion objective. Sholl analysis was performed on 3D reconstructions of dendritic arborizations generated using the NeuronStudio software package (http://research.mssm.edu/cnic/tools-ns.html).

Data Analyses

GraphPad Prism 6.0 software was used for statistical analyses. Complete statistical analyses with number of measures are detailed in Supplemental Experimental Procedures. All results were expressed as mean ± SEM and statistical significance was assessed using a two-tailed Student's t test or one-way ANOVA, followed by a Tukey's multiple comparisons test.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, eight figures, and eight movies and can be found with this article online at http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.11.035.

A video abstract is available at http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.11.035#mmc11.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.B. and S.H. designed research, analyzed data, and wrote the manuscript. M.B., J.L., and C.B. performed research.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank F. Saudou, J.C. Deloulme, S. Garel, T. Kawauchi, L. Nguyen and X. Yu for reagents and/or discussions; E. Aparicio, D. Grunwald, E. Martin, Y. Saoudi and H. Yu for help with experiments; staff of the Grenoble Institut des Neurosciences animal and imaging facilities for advice and technical help; members of the S.H. and Saudou laboratories for helpful comments; Fondation Bettencourt Schueller for equipment and Association Huntington France (AHF) for continuous support. This work was supported by grants from Agence Nationale pour la Recherche (ANR-12-BLANC-SVSE4, S.H.), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM DEQ20120323715, équipe labellisée, S.H.), and Cancéropôle Ile-de France (INCA_6517, S.H.). S.H. is an INSERM investigator. M.B. was supported by an NERF Ile de France and FRM post-doctoral fellowships.

Received: May 19, 2016
Revised: September 25, 2016
Accepted: November 16, 2016
Published: December 22, 2016

REFERENCES

Bian, W.J., Miao, W.Y., He, S.J., Qiu, Z., and Yu, X. (2015). Coordinated Spine Pruning and Maturation Mediated by Inter-Spine Competition for Cadherin/Catenin Complexes. Cell *162*, 808–822.

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

Copf, T. (2016). Impairments in dendrite morphogenesis as etiology for neurodevelopmental disorders and implications for therapeutic treatments. Neurosci. Biobehav. Rev. *68*, 946–978.

Dietrich, P., Shanmugasundaram, R., Shuyu, E., and Dragatsis, I. (2009). Congenital hydrocephalus associated with abnormal subcommissural organ in mice lacking huntingtin in Wnt1 cell lineages. Hum. Mol. Genet. *18*, 142–150.

Dragatsis, I., Levine, M.S., and Zeitlin, S. (2000). Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. Nat. Genet. *26*, 300–306.

Duyao, M.P., Auerbach, A.B., Ryan, A., Persichetti, F., Barnes, G.T., McNeil, S.M., Ge, P., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., Joyner, A.L., et al. (1995). Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. Science *269*, 407–410.

Elias, L.A., Wang, D.D., and Kriegstein, A.R. (2007). Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. Nature *448*, 901–907.

Elias, S., McGuire, J.R., Yu, H., and Humbert, S. (2015). Huntingtin Is Required for Epithelial Polarity through RAB11A-Mediated Apical Trafficking of PAR3-aPKC. PLoS Biol. *13*, e1002142.

Gärtner, A., Fornasiero, E.F., Munck, S., Vennekens, K., Seuntjens, E., Huttner, W.B., Valtorta, F., and Dotti, C.G. (2012). N-cadherin specifies first asymmetry in developing neurons. EMBO J. *31*, 1893–1903.

Godin, J.D., Colombo, K., Molina-Calavita, M., Keryer, G., Zala, D., Charrin, B.C., Dietrich, P., Volvert, M.L., Guillemot, F., Dragatsis, I., et al. (2010). Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis. Neuron *67*, 392–406.

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.

Heinsen, H., Strik, M., Bauer, M., Luther, K., Ulmar, G., Gangnus, D., Jungkunz, G., Eisenmenger, W., and Götz, M. (1994). Cortical and striatal neurone number in Huntington's disease. Acta Neuropathol. *88*, 320–333.

Heng, J.I., Nguyen, L., Castro, D.S., Zimmer, C., Wildner, H., Armant, O., Skowronska-Krawczyk, D., Bedogni, F., Matter, J.M., Hevner, R., and Guillemot, F. (2008). Neurogenin 2 controls cortical neuron migration through regulation of Rnd2. Nature *455*, 114–118.

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.

Kawauchi, T., Sekine, K., Shikanai, M., Chihama, K., Tomita, K., Kubo, K., Nakajima, K., Nabeshima, Y., and Hoshino, M. (2010). Rab GTPases-dependent endocytic pathways regulate neuronal migration and maturation through N-cadherin trafficking. Neuron *67*, 588–602.

Kriegstein, A.R., and Noctor, S.C. (2004). Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. Trends Neurosci. *27*, 392–399.

Lee, J.K., Mathews, K., Schlaggar, B., Perlmutter, J., Paulsen, J.S., Epping, E., Burmeister, L., and Nopoulos, P. (2012). Measures of growth in children at risk for Huntington disease. Neurology *79*, 668–674.

Li, X., Sapp, E., Valencia, A., Kegel, K.B., Qin, Z.H., Alexander, J., Masso, N., Reeves, P., Ritch, J.J., Zeitlin, S., et al. (2008). A function of huntingtin in guanine nucleotide exchange on Rab11. Neuroreport *19*, 1643–1647.

Li, X., Standley, C., Sapp, E., Valencia, A., Qin, Z.H., Kegel, K.B., Yoder, J., Comer-Tierney, L.A., Esteves, M., Chase, K., et al. (2009). Mutant huntingtin impairs vesicle formation from recycling endosomes by interfering with Rab11 activity. Mol. Cell. Biol. *29*, 6106–6116.

Matsuda, T., and Cepko, C.L. (2007). Controlled expression of transgenes introduced by in vivo electroporation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *104*, 1027–1032.

McKinstry, S.U., Karadeniz, Y.B., Worthington, A.K., Hayrapetyan, V.Y., Ozlu, M.I., Serafin-Molina, K., Risher, W.C., Ustunkaya, T., Dragatsis, I., Zeitlin, S., et al. (2014). Huntingtin is required for normal excitatory synapse development in cortical and striatal circuits. J. Neurosci. *34*, 9455–9472.

Molero, A.E., Arteaga-Bracho, E.E., Chen, C.H., Gulinello, M., Winchester, M.L., Pichamoorthy, N., Gokhan, S., Khodakhah, K., and Mehler, M.F. (2016). Selective expression of mutant huntingtin during development recapitulates characteristic features of Huntington's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *113*, 5736–5741.

Molina-Calavita, M., Barnat, M., Elias, S., Aparicio, E., Piel, M., and Humbert, S. (2014). Mutant huntingtin affects cortical progenitor cell division and development of the mouse neocortex. J. Neurosci. *34*, 10034–10040.

Nana, A.L., Kim, E.H., Thu, D.C., Oorschot, D.E., Tippett, L.J., Hogg, V.M., Synek, B.J., Roxburgh, R., Waldvogel, H.J., and Faull, R.L. (2014). Widespread heterogeneous neuronal loss across the cerebral cortex in Huntington's disease. J. Huntingtons Dis. *3*, 45–64.

Nasir, J., Floresco, S.B., O'Kusky, J.R., Diewert, V.M., Richman, J.M., Zeisler, J., Borowski, A., Marth, J.D., Phillips, A.G., and Hayden, M.R. (1995). Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. Cell *81*, 811–823.

Nopoulos, P.C., Aylward, E.H., Ross, C.A., Johnson, H.J., Magnotta, V.A., Juhl, A.R., Pierson, R.K., Mills, J., Langbehn, D.R., and Paulsen, J.S.; PREDICT-HD Investigators Coordinators of Huntington Study Group (HSG) (2010). Cerebral cortex structure in prodromal Huntington disease. Neurobiol. Dis. *40*, 544–554.

Pardo, R., Molina-Calavita, M., Poizat, G., Keryer, G., Humbert, S., and Saudou, F. (2010). pARIS-htt: an optimised expression platform to study huntingtin reveals functional domains required for vesicular trafficking. Mol. Brain *3*, 17.

Polleux, F., and Ghosh, A. (2002). The slice overlay assay: a versatile tool to study the influence of extracellular signals on neuronal development. Sci. STKE *2002*, pl9.

Power, D., Srinivasan, S., and Gunawardena, S. (2012). In-vivo evidence for the disruption of Rab11 vesicle transport by loss of huntingtin. Neuroreport *23*, 970–977.

Rago, L., Beattie, R., Taylor, V., and Winter, J. (2014). miR379-410 cluster miRNAs regulate neurogenesis and neuronal migration by fine-tuning N-cadherin. EMBO J. *33*, 906–920.

Reiner, A., Del Mar, N., Meade, C.A., Yang, H., Dragatsis, I., Zeitlin, S., and Goldowitz, D. (2001). Neurons lacking huntingtin differentially colonize brain and survive in chimeric mice. J. Neurosci. *21*, 7608–7619.

Rosas, H.D., Liu, A.K., Hersch, S., Glessner, M., Ferrante, R.J., Salat, D.H., van der Kouwe, A., Jenkins, B.G., Dale, A.M., and Fischl, B. (2002). Regional and progressive thinning of the cortical ribbon in Huntington's disease. Neurology *58*, 695–701.

Rosas, H.D., Salat, D.H., Lee, S.Y., Zaleta, A.K., Pappu, V., Fischl, B., Greve, D., Hevelone, N., and Hersch, S.M. (2008). Cerebral cortex and the clinical expression of Huntington's disease: complexity and heterogeneity. Brain *131*, 1057–1068.

Sakakibara, A., and Hatanaka, Y. (2015). Neuronal polarization in the developing cerebral cortex. Front. Neurosci. *9*, 116.

Saudou, F., and Humbert, S. (2016). The Biology of Huntingtin. Neuron *89*, 910–926.

Shikanai, M., Nakajima, K., and Kawauchi, T. (2011). N-cadherin regulates radial glial fiber-dependent migration of cortical locomoting neurons. Commun. Integr. Biol. *4*, 326–330.

Sultan, K.T., Brown, K.N., and Shi, S.H. (2013). Production and organization of neocortical interneurons. Front. Cell. Neurosci. *7*, 221.

Tabrizi, S.J., Langbehn, D.R., Leavitt, B.R., Roos, R.A., Durr, A., Craufurd, D., Kennard, C., Hicks, S.L., Fox, N.C., Scahill, R.I., et al.; TRACK-HD investigators (2009). Biological and clinical manifestations of Huntington's disease in the longitudinal TRACK-HD study: cross-sectional analysis of baseline data. Lancet Neurol. *8*, 791–801.

Tong, Y., Ha, T.J., Liu, L., Nishimoto, A., Reiner, A., and Goldowitz, D. (2011). Spatial and temporal requirements for huntingtin (Htt) in neuronal migration and survival during brain development. J. Neurosci. *31*, 14794–14799.

Volvert, M.L., Prévot, P.P., Close, P., Laguesse, S., Pirotte, S., Hemphill, J., Rogister, F., Kruzy, N., Sacheli, R., Moonen, G., et al. (2014). MicroRNA targeting of CoREST controls polarization of migrating cortical neurons. Cell Rep. *7*, 1168–1183.

White, J.K., Auerbach, W., Duyao, M.P., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., Joyner, A.L., and MacDonald, M.E. (1997). Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion. Nat. Genet. *17*, 404–410.

Zeitlin, S., Liu, J.P., Chapman, D.L., Papaioannou, V.E., and Efstratiadis, A. (1995). Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. Nat. Genet. *11*, 155–163.

Zhang, J., Woodhead, G.J., Swaminathan, S.K., Noles, S.R., McQuinn, E.R., Pisarek, A.J., Stocker, A.M., Mutch, C.A., Funatsu, N., and Chenn, A. (2010). Cortical neural precursors inhibit their own differentiation via N-cadherin maintenance of beta-catenin signaling. Dev. Cell *18*, 472–479.

Neuron, Volume *93*

Supplemental Information

Huntingtin-Mediated Multipolar-Bipolar Transition of Newborn Cortical Neurons Is Critical for Their Postnatal Neuronal Morphology

Monia Barnat, Julien Le Friec, Caroline Benstaali, and Sandrine Humbert

INVENTORY OF SUPPLEMENTARY INFORMATION

Huntingtin-mediated Multipolar-Bipolar Transition of Newborn Cortical Neurons is Critical for their Postnatal Neuronal Morphology

Monia Barnat, Julien Le Friec, Caroline Benstaali and Sandrine Humbert

SUPPLEMENTARY FIGURES AND LEGENDS **page 2-17**

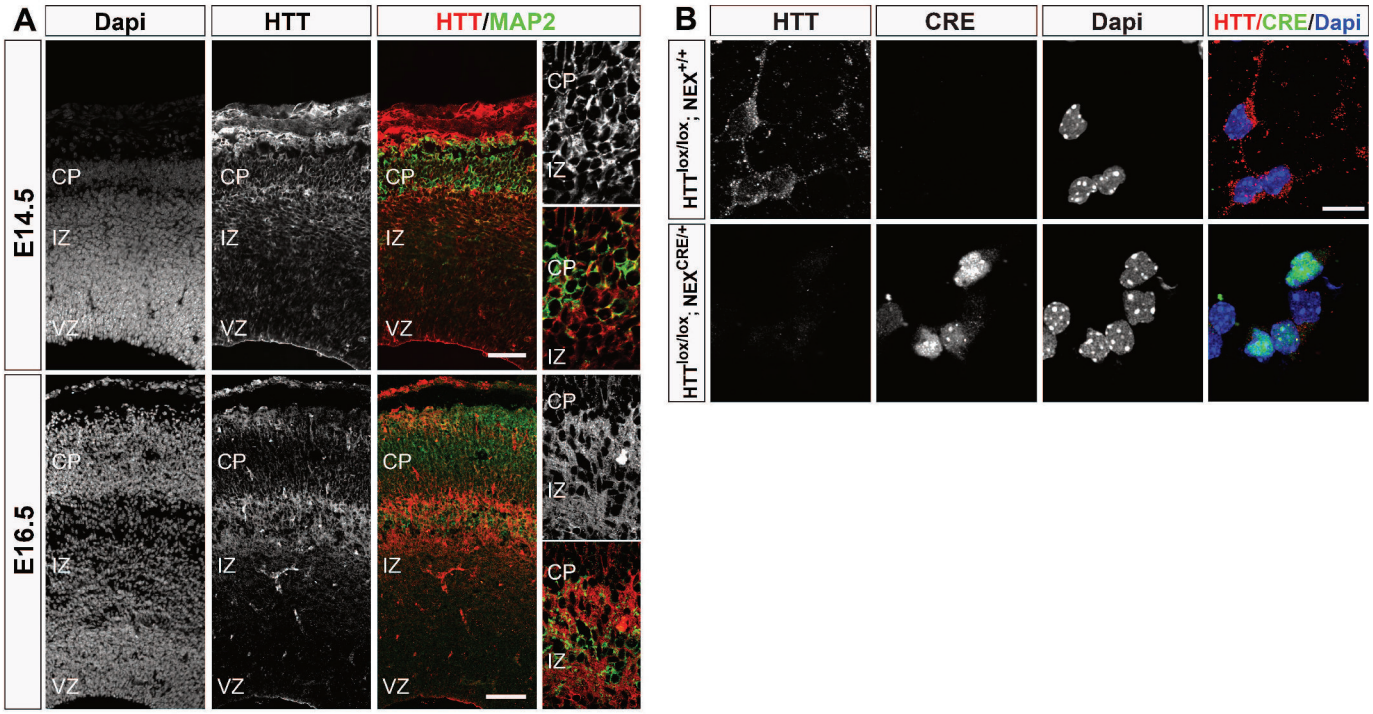
SUPPLEMENTARY MOVIE LEGENDS **pages 18-19**

SUPPLEMENTARY EXPERIMENTAL PROCEDURES **page 20-22**

STATISTICAL ANALYSES **pages 23-36**

SUPPLEMENTARY REFERENCES **page 37**

SUPPL FIGURE 1 (related to FIGURE 1)

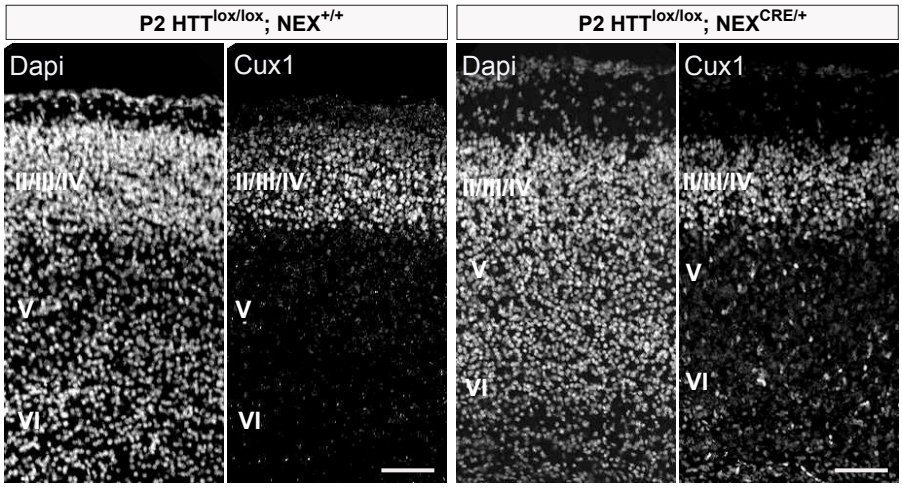


Supplementary Figure 1 (Related to Figure 1).

(A) Immunostaining for HTT and MAP2 of 14.5 and E16.5 wild-type cortical coronal sections. VZ, ventricular zone; IZ, intermediate zone; CP, cortical plate. Scale bars, 50 µm.

(B) HTT and CRE immunolabeling of $HTT^{lox/lox}$; $NEX^{+/+}$ and $HTT^{lox/lox}$; $NEX^{CRE/+}$ cultured cortical neurons. Scale bars, 20 µm. Nuclei are counterstained with Dapi.

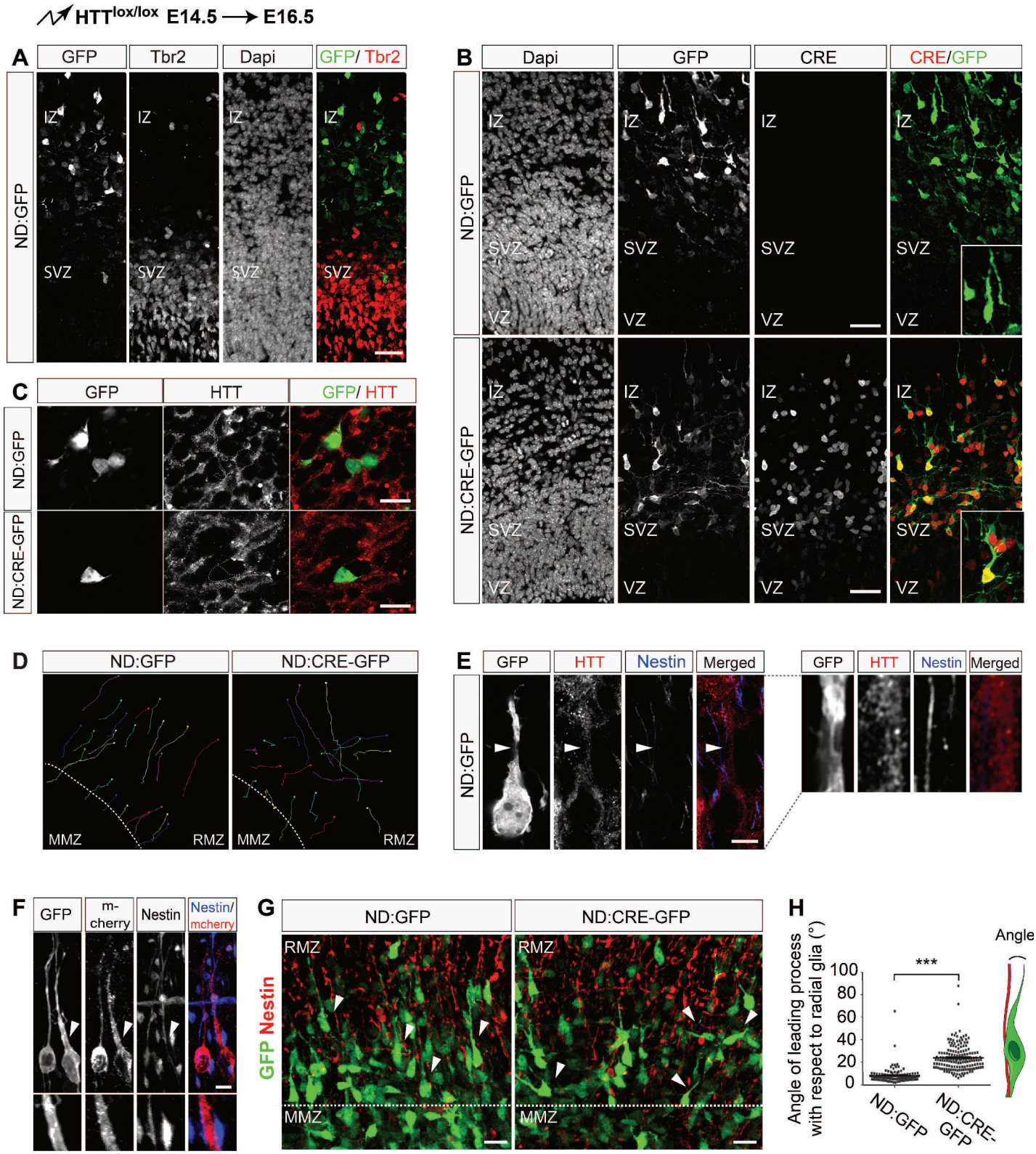
SUPPL FIGURE 2 (related to FIGURE 2)



Supplementary Figure 2 (Related to Figure 2).

Cux1 immunostaining of P2 cortical coronal sections of $HTT^{lox/lox}$; $NEX^{+/+}$ and $HTT^{lox/lox}$; $NEX^{CRE/+}$ brains. Nuclei are counterstained with Dapi. Scale bars, 100 µm.

SUPPL FIGURE 3 (related to FIGURE 3)



Supplementary Figure 3 (Related to Figure 3).

(A) GFP and Tbr2 immunostaining of cortical coronal sections. E14.5 $HTT^{lox/lox}$ embryos are electroporated with ND:GFP and analyzed at E16.5. Scale bars, 50µm.

(B) GFP and CRE or (C) GFP and HTT immunostaining of E16.5 cortical coronal sections. In (B) and (C), E14.5 $HTT^{lox/lox}$ embryos are electroporated with ND:CRE-GFP and ND:GFP and analyzed at E16.5. Scale bars, 50µm.

(D) Drawing paths illustrating individual neurons exiting the multipolar migration zone (MMZ, colored lines, see also supplemental movie 3). RMZ: radial migration zone.

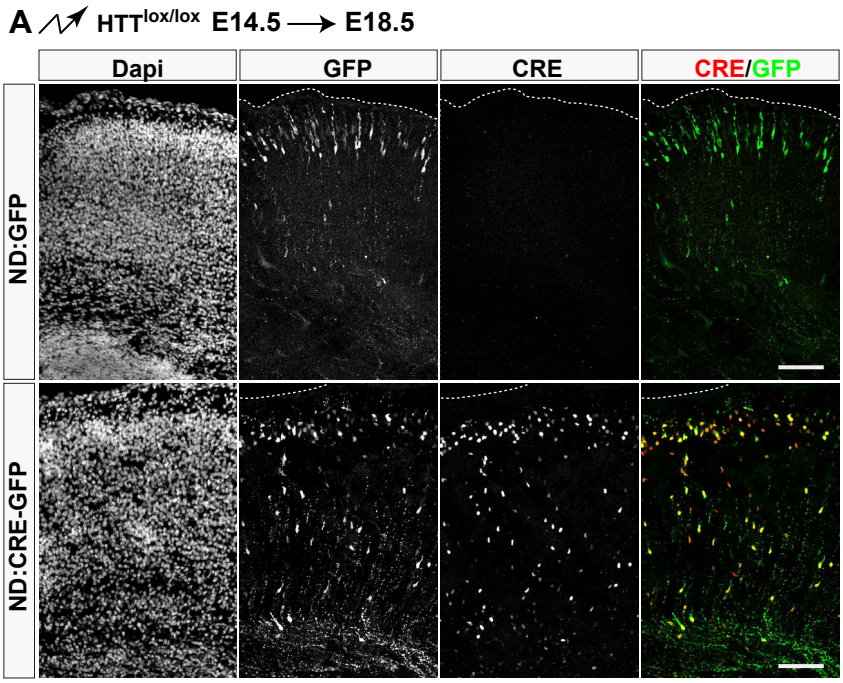
(E) GFP, HTT and Nestin immunostaining of E16.5 cortical coronal sections after E14.5 in utero electroporation with ND:GFP. Arrowheads indicate the location of higher magnification of leading processes (right). Scale bar, 10µm.

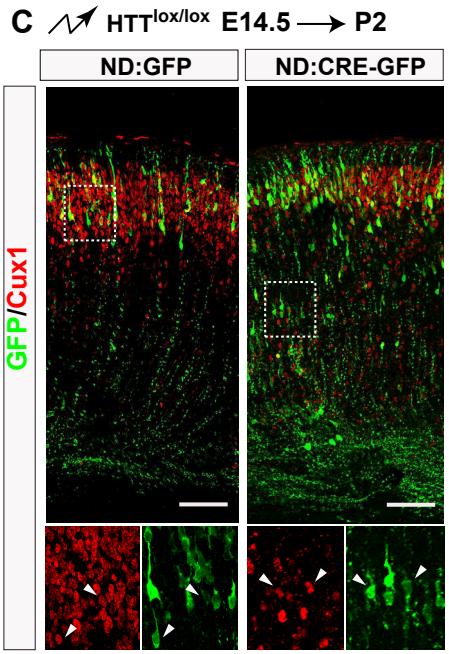
(F) To allow the visualization of individual cells, E16.5 control cortices were electroporated with plasmids expressing mcherry-tagged full-length HTT (FLHTT). Immunostainings for GFP, mcherry and Nestin are shown. Scale bar, 10µm.

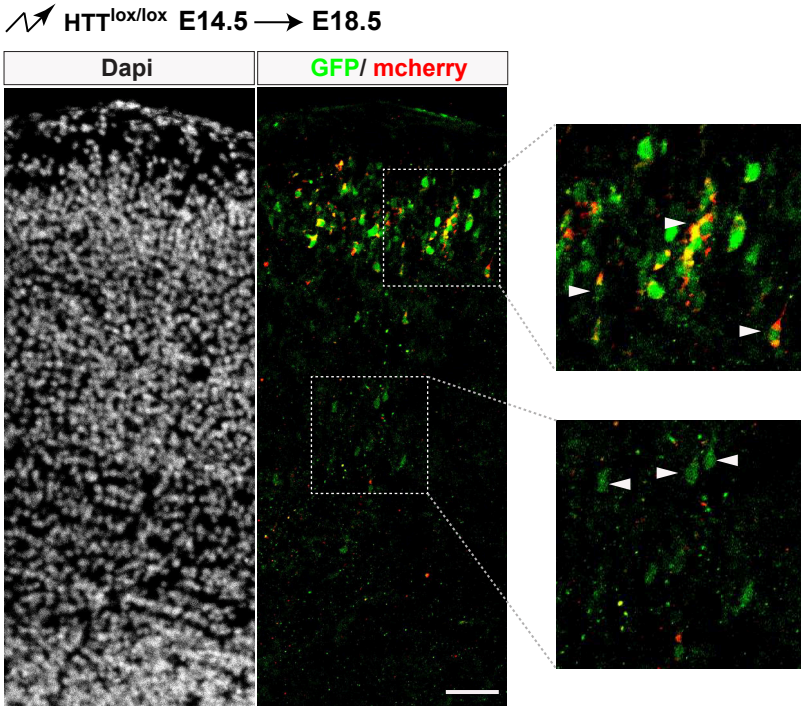
(G) Electroporation of ND:GFP or ND:CRE-GFP plasmids were performed in E14.5 $HTT^{lox/lox}$ embryos and brains analyzed two days later. Immunostainings for GFP and Nestin are shown. Scale bars, 25 µm.

(H) Distribution of the angles between the glial fiber (Nestin) and $HTT^{lox/lox}$ neurons expressing ND:GFP or ND:CRE-GFP plasmids. Measures were performed in the RMZ (n = 3 brains per conditions). The cartoon shows the angle formed by the leading process of bipolar neurons (green) with respect to adjacent radial glia (red). Mann-Whitney U test; error bars, SEM; ***$p < 0.001$. Scale bars, 10µm.

SUPPL FIGURE 4 (related to 4)







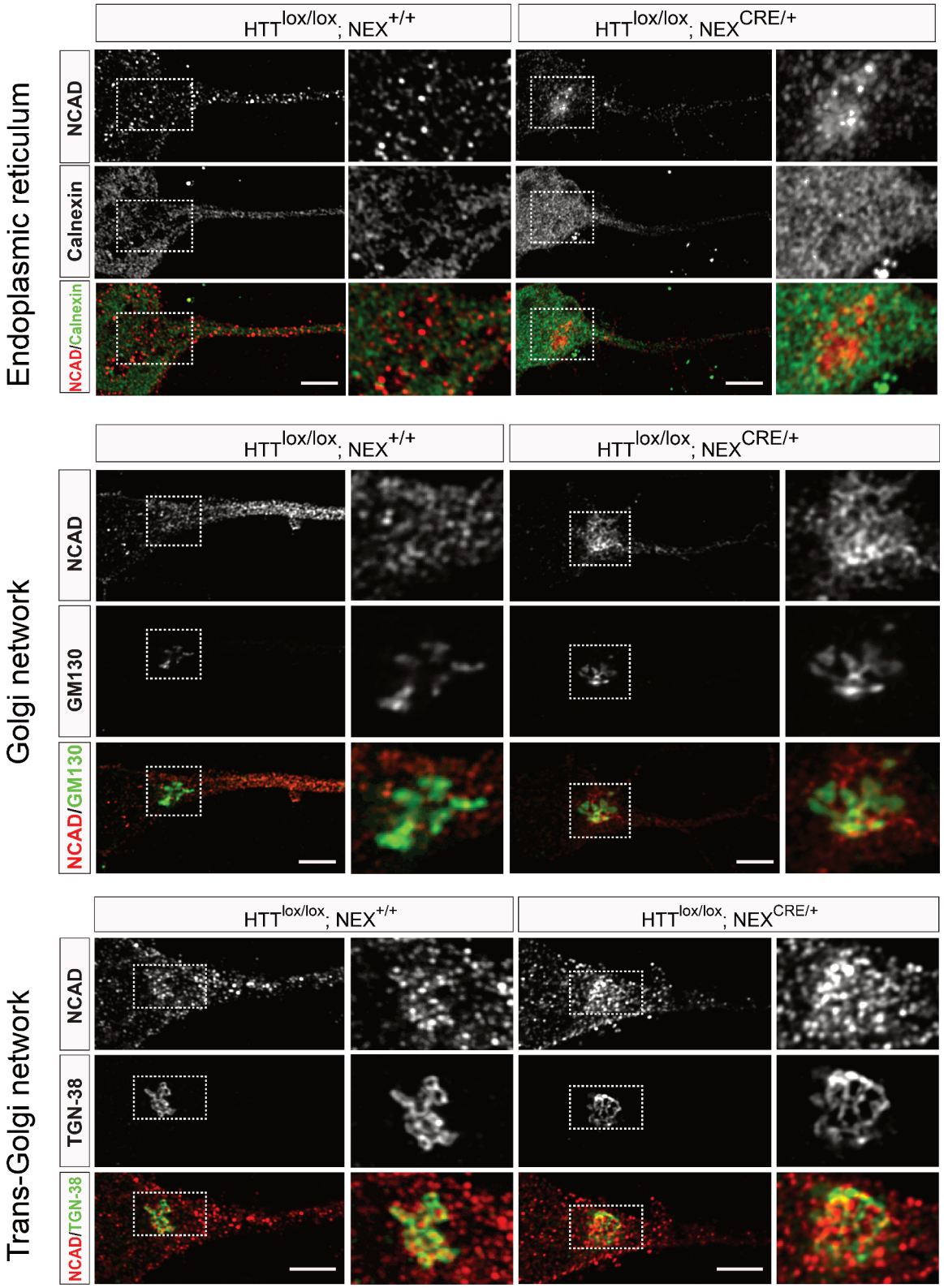
Supplementary Figure 4 (Related to Figure 4).

(A) GFP and CRE immunostaining of cortical sections. $HTT^{lox/lox}$ embryos are electroporated with ND:GFP or ND:CRE-GFP at E14.5 and analyzed at E18.5. Scale bars, 100 µm.

(B) GFP and mCherry immunostaining of cortical sections. $HTT^{lox/lox}$ embryos are electroporated with ND:CRE-GFP and mcherry-tagged full-length HTT (FLHTT) at E14.5 and analyzed at E18.5. Neurons expressing CRE-GFP and FLHTT (yellow) have reached the CP in contrast to neurons expressing CRE-GFP alone (green). Nuclei are counterstained with Dapi. Scale bar, 50 µm.

(C) GFP and Cux1 immunostaining of cortical sections of embryos electroporated with ND:GFP or ND:CRE-GFP at E14.5 and analyzed at P2. Higher magnifications indicate electroporated Cux1-positive neurons localized in deep layers in ND:CRE-GFP condition. Scale bars, 100 µm.

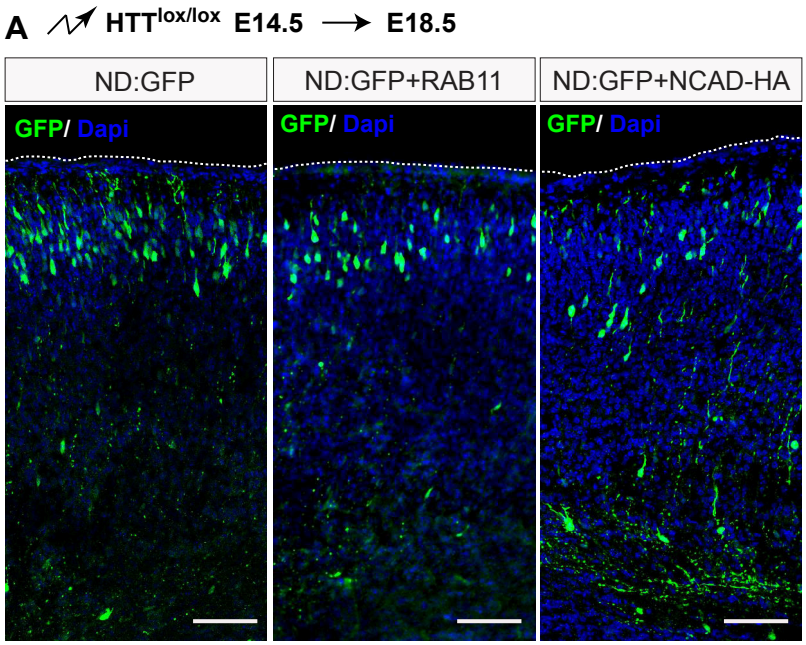
SUPPL FIGURE 5 (related to FIGURE 5)

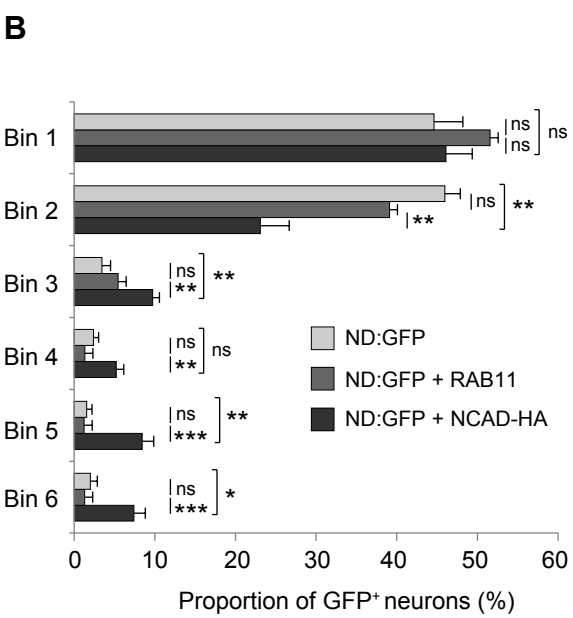


Supplementary Figure 5 (Related to Figure 5).

Primary cultures of cortical neurons from $HTT^{lox/lox}$; $NEX^{+/+}$ and $HTT^{lox/lox}$; $NEX^{CRE/+}$ embryos are immunostained with anti-NCAD and anti-calnexin, anti-GM130 or anti-TGN38, markers for endoplasmic reticulum, Golgi network and trans-Golgi network, respectively (top to bottom). Scale bars, 10µm.

SUPPL FIGURE 6 (related to FIGURE 6)



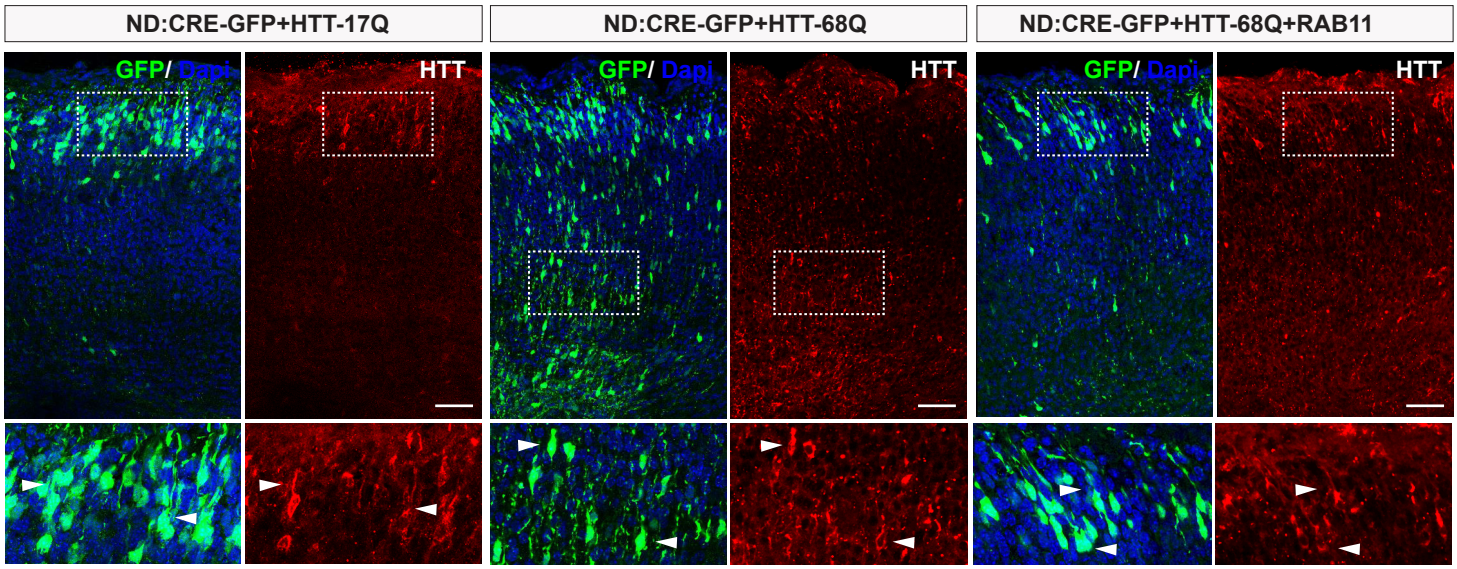


Supplementary Figure 6 (Related to Figure 6).

(A) Cortical coronal sections of $HTT^{lox/lox}$ E18.5 brains electroporated at E14.5 as indicated. Sections are immunostained for GFP and counterstained with Dapi. Scale bars, 100 µm.

(B) Quantitative analysis showing the distribution of GFP positive (GFP^+) neurons across the cortex divided into 6 equal bins (n = 3 brains per condition). One-way ANOVA; error bars, SEM; ns, not significant, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

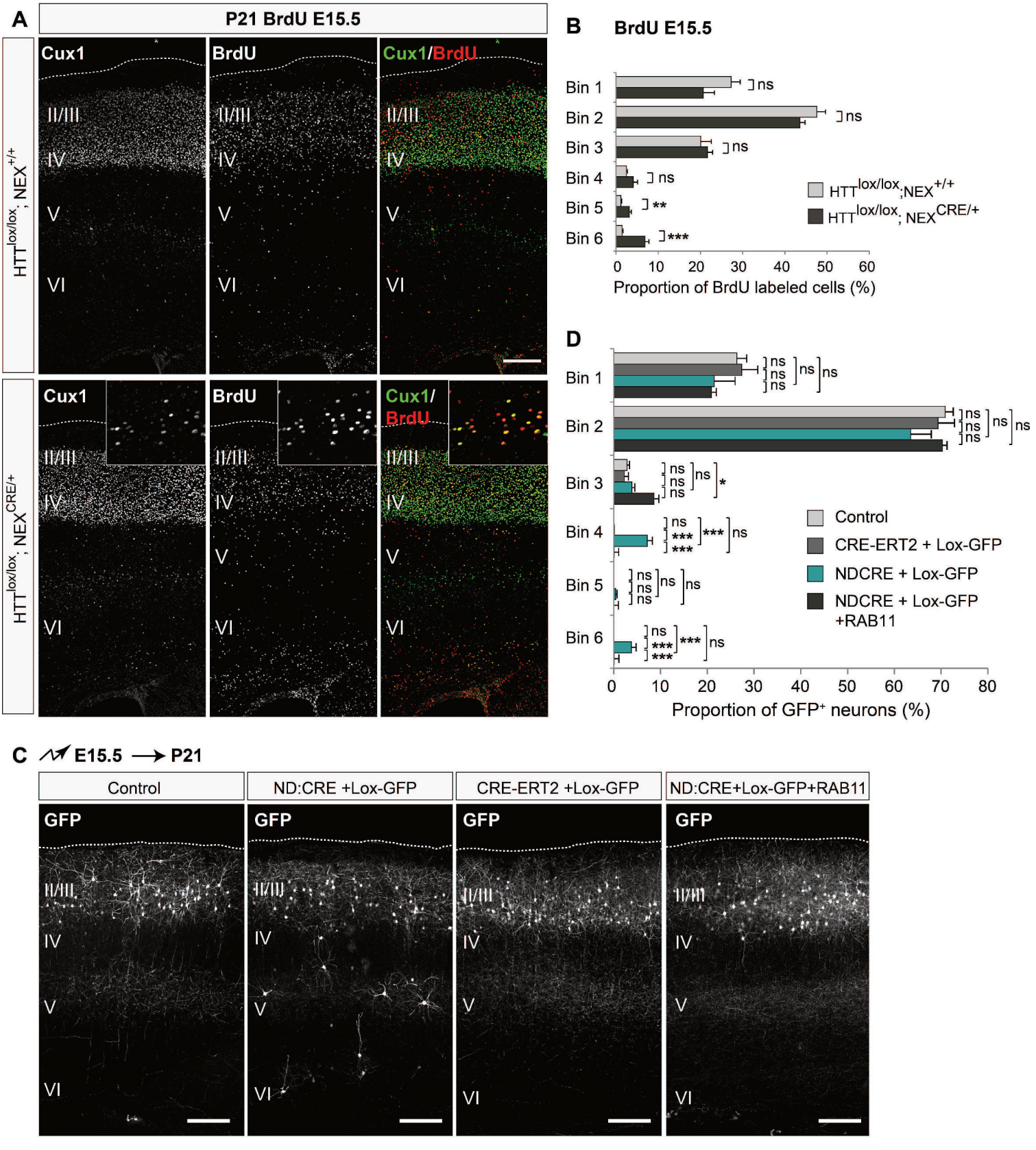
SUPPL FIGURE 7 (related to FIGURE 7)



Supplementary Figure 7 (Related to Figure 7).

Cortical coronal sections of E18.5 $HTT^{lox/lox}$ embryos electroporated at E14.5 with indicated plasmids. Sections were immunostained for GFP and HTT. Nuclei were counterstained with Dapi. Scale bars, 50µm.

SUPPL FIGURE 8 (related to FIGURE 8)



Supplementary Figure 8 (Related to Figure 8).

(A) Pregnant $HTT^{lox/lox}$;$NEX^{+/+}$ (control) and $HTT^{lox/lox}$;$NEX^{CRE/+}$ (mutant) mice were injected with BrdU at E15.5 and P21 brain coronal sections were analyzed by immunostaining for Cux1 and BrdU. Scale bars, 200 µm.

(B) Cortical sections were divided into six equal bins. Quantitative assessment of the percentage of BrdU-positive neurons in each bin (n = at least 5 brains per condition).

(C) Cortical coronal sections of $HTT^{lox/lox}$ P21 brains electroporated at E15.5 with indicated plasmids. Sections are immunostained for GFP. Scale bars, 200 µm.

(D) Quantitative analysis showing the distribution of GFP positive (GFP^{+}) neurons across the cortex divided into 6 equal bins (n = 3 brains per condition). One-way ANOVA; error bars, SEM; ns, not significant, *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$.

SUPPLEMENTARY MOVIE LEGENDS

Movie S1 (Related to Figure 3): Multipolar GFP-expressing projection neurons migrating in upper MMZ and lower RMZ of cultured brain slices from E16.5 $HTT^{lox/lox}$ mouse cortices electroporated with ND:GFP at E14.5. Individual slices are imaged with an inverted confocal microscope (SP5, Leica). Frames are taken at 30 min intervals over periods of 11 hours (see frame images Fig. 4A, upper panel).

Movie S2 (Related to Figure 3): Multipolar GFP-expressing projection neurons migrating in upper MMZ and lower RMZ of cultured brain slices from E16.5 $HTT^{lox/lox}$ mouse cortices electroporated with ND:CRE-GFP at E14.5. Individual slices are imaged with an inverted confocal microscope (SP5, Leica). Frames are taken at 30 min intervals over periods of 11 hours (see frame images Fig. 4A, lower panel).

Movie S3 (Related to Figure S3): GFP-expressing projection neurons migrating in IZ and CP of cultured brain slices from E16.5 $HTT^{lox/lox}$ mouse cortices electroporated with ND:GFP at E14.5. Individual slices are imaged with an inverted confocal microscope (SP5, Leica). Frames are taken at 30 min intervals over periods of 10 hours.

Movie S4 (Related to Figure S3): GFP-expressing projection neurons migrating in IZ and CP of cultured brain slices from E16.5 $HTT^{lox/lox}$ mouse cortices electroporated with ND:CRE-GFP at E14.5. Individual slices are imaged with an inverted confocal microscope (SP5, Leica). Frames are taken at 30 min intervals over periods of 10 hours.

Movie S5 (Related to Figure 4): Bipolar GFP-expressing projection neurons migrating in CP of cultured brain slices from E17.5 $HTT^{lox/lox}$ mouse cortices electroporated with ND:GFP at

E14.5. Individual slices are imaged with an inverted confocal microscope (SP5, Leica). Frames are taken at 30 min intervals over periods of 10 hours (see frame images Fig. 5C, upper panel).

Movie S6 (Related to Figure 4): Bipolar GFP-expressing projection neurons migrating in CP of cultured brain slices from E17.5 $HTT^{lox/lox}$ mouse cortices electroporated with ND:CRE-GFP at E14.5. Individual slices are imaged with an inverted confocal microscope (SP5, Leica). Frames are taken at 30 min intervals over periods of 10 hours (see frame images Fig. 5C, lower panel).

Movie S7 (Related to Figure 5): $HTT^{lox/lox}$;$NEX^{+/+}$ dissociated cortical neuron expressing pH-NCAD (left) and DsRed (right) 24 hours after plating. Individual slices are imaged with an inverted microscope (Axio Observer, Zeiss). Frames are taken at 4 min intervals over periods of 120 minutes (see frame images Fig. 5F).

Movie S8 (Related to Figure 5): $HTT^{lox/lox}$;$NEX^{CRE/+}$ dissociated cortical neuron expressing pH-NCAD (left) and DsRed (right) 24 hours after plating. Individual slices are imaged with an inverted microscope (Axio Observer, Zeiss). Frames are taken at 4 min intervals over periods of 120 minutes (see frame images Fig. 5F).

SUPPLEMENTARY EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mice and genotyping

To conditionally inactivate the Huntingtin gene in mice (HTT), $HTT^{lox/lox}$ mice (Dragatsis et al., 2000) were crossed with $NEX^{CRE/+}$ mice (Goebbels et al., 2006) to obtain $HTT^{lox/+}$ $NEX^{CRE/+}$ mice, and genetic invalidation of HTT was performed after crossing the latter with $HTT^{lox/lox}$. The resulting $HTT^{lox/lox}$;$NEX^{+/+}$ or $HTT^{lox/+}$;$NEX^{CRE/+}$ (controls) and $HTT^{lox/lox}$;$NEX^{CRE/+}$ (HTT conditional knockout) littermates were analyzed. Genotyping of individual mouse was performed by isolating DNA from the tail, and PCR amplification was performed using the following primers to detect HTT lox alleles: HTT forward (CATTTGATTCTTACAGGTAGCCTG) and HTT reverse (CTAAAGCGCATGCTCCAGACTG). The following primers were used to detect CRE recombinase: CRE forward (GAGTCCTGGAATCAGTCTTTTTC) and CRE reverse (CCGCATAACCAGTGAAACAG).

Preparation and transfection of mouse primary cortical neurons

Primary cortical cultures were prepared from E15.5 mouse embryos. The cerebral cortices were treated with trypsin (0.025% at 37°C for 20 min) and the reaction was stopped with trypsin inhibitor solution containing DNAse. Neurons were dissociated by several passages through a Pasteur pipette. Transfection of dissociated neurons was performed by the Amaxa Nucleofector system (Lonza). Neurons were plated on glass coverslips or on culture dishes coated with polylysine and laminin (Sigma) and maintained in Neurobasal medium supplemented with glutamax and B27 (all reagents from Thermo Fisher Scientific).

Preparation of cell extracts and immunoblotting experiments

Dissociated cortical neurons plated for 48 h were lysed in NP40 buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 1 mM Na3VO4, 1% Nonidet P40 (NP40), 0.02% NaN3), containing protease inhibitor cocktail (Sigma), and centrifuged at 11,000 x g for 10 min at 4°C. Samples were heated at 95°C for 5 min before loading on a SDS-polyacrylamide gel. After transfer, nitrocellulose membranes were blocked with 5% nonfat dry milk and incubated with primary antibodies. After thorough washing, membranes were incubated with secondary IgG-HRP antibodies raised against each corresponding primary antibody.

Immunohistochemistry and immunocytochemistry

Samples were washed with PBS-Triton (0.3%; PBST) and blocked at room temperature for 2 h in PBS containing 10% normal goat serum (NGS, Life Technologies) before incubation with primary antibodies diluted in 5% NGS in PBST. All primary antibodies were incubated overnight at 4°C. The following primary antibodies were used: anti-HTT 4C8 (1:400; rabbit, Euromedex), anti-βIII-tubulin (TUJ1, 1:250, mouse, Merck Millipore), anti-Nestin (1:250, rabbit, Abcam), anti-CRE recombinase (1:500, rabbit, Covance), anti-MAP2 (1:200, rabbit, Merck Millipore), anti-CDP (Cux1,1:500, rabbit, Santa Cruz), anti-Tbr2 (1:500, rabbit, Merck Millipore), anti-Tbr1 (1:500, rabbit, Merck Millipore), anti-BrdU (1:200, rat, AbD Serotec), anti-GFP (1:500, chicken, Merck Millipore), anti-GM130 (1:500, mouse, BD Transduction Laboratories), anti-TGN38 (1:1000, rabbit, Santa Cruz), anti-Calnexin (1:500, rabbit, Sigma), anti-transferrin receptor (1:500, mouse, Thermo Fisher Scientific), anti-α-tubulin (1:500 for Western blotting; provided by C. Janke; Institut Curie, France), anti-mcherry (from platform of Institut Curie, France), anti-NCAD (1:500, rabbit and mouse, Abcam), anti-HA (1:500, rabbit, Santa Cruz Biotechnology), anti-RAB11A (1:250; rabbit, Cell signaling Technology). After several rinses in 5% NGS-PBST, samples were incubated with appropriate AlexaFluor-

conjugated secondary antibodies (Molecular Probes,Thermo Fisher Scientific) for 1 h at room temperature. After several rinses in 5% NGS-PBS, nuclei were counterstained with Dapi (Roche) and samples were mounted in fluorescent mounting medium (Dako).

For BrdU birth dating assay, E12.5 or E15.5 pregnant female received a single intraperitoneal injection of BrdU (Sigma) at 50 mg/kg. Tamoxifen (Sigma) was injected intraperitoneally in E18.5 pregnant female at 100 mg/kg. Brains were perfused, fixed and sectioned at P0 or P21. For BrdU staining, sections were treated with 1 M HCl at 45 °C for 30 min, then incubated at 4 °C overnight with mouse antibody to BrdU (1:200, rat, AbD Serotec).

Golgi-Cox staining

Golgi-Cox stainings were performed on mutant mice and their gender-matched littermate controls. Briefly, mice were deeply anesthetized and perfused with PBS. After dissection, brains were incubated two days in Golgi-Cox solution in the dark then in 30% sucrose in PBS at 4°C for one week. 100 µm thickness brain sections were rinsed in distilled water, mounted on slides (SuperFrost®-plus, Thermoscientific) and treated with ammonium hydroxide for 30 minutes. Sections were rinsed in distilled water, dehydrated in 70%, 80%, 95% and absolute ethanol, cleared twice in xylene and mounted in Eukitt mounting medium (Sigma).

STATISTICAL ANALYSES

Figure 1D
Data are from: control: 5 embryos, mutant: 6 embryos.
Mann-Whitney U test **p = 0.0043
Figure 1F
Data are from: control: 4 embryos, mutant: 3 embryos.
Student's t test
VZ: p = 0.2428
IZ: **p = 0.0071
CP: ***p<0.0001
Cortex: ***p = 0.0008
Figure 1G
Data are from: control: 3 embryos, mutant: 4 embryos.
Student's t test
VZ: p = 0.9351
IZ: **p = 0.0099
CP: **p = 0.0028
Cortex: **p = 0.0027
Figure 1H
Data are from: control: 3 embryos, mutant: 4 embryos
IZ: ***p = 0.0006
CP: p = 0.9349

Figure 2B
Data are from: control: 6 pups; mutant: 5 pups
Student's t test
***p = 0.0003
Figure 2D
Data are from: control: 3 pups; mutant: 4 pups
Student's t test
Bin1: p = 0.1299
Bin2: p = 0.3575
Bin3: p = 0.9704
Bin4: p = 0.5514
Bin5: p = 0.8117
Bin6: p = 0.1524
Figure 2E
Data are from: control: 3 pups; mutant: 4 pups
Student's t test
Bin1: p = 0.6921
Bin2: **p = 0.0044
Bin3: p = 0.8671
Bin4: p = 0.2089
Bin5: **p = 0.0409
Bin6: ***p<0.001

Figure 3C
Data are from: ND:GFP: 4 embryos; ND:CRE-GFP: 5 embryos
Student's t test

Upper CP: *p = 0.0231
Lower CP: *p = 0.0355
Upper IZ: **p = 0.0024
Lower IZ: **p = 0.0011
SVZ: **p = 0.0017

Figure 3E

Data are from: ND:GFP: 7 embryos (340 cells); ND:CRE-GFP: 4 embryos (210 cells)
Student's t test
Bipolar unbranched: ***p<0.0001
Bipolar branched: ***p<0.0001
Multipolar: ***p<0.0001
No process: p = 0.329

Figure 3H

Data are from: ND:GFP: 6 embryos (132 cells); ND:CRE-GFP: 4 embryos (115 cells)
Student's t test
***p<0.0001

Figure 3J

Data are from: ND-GFP: 5 embryos (100 cells); ND-CRE-GFP: 5 embryos (85 cells)
Student's t test
***p<0.001

Figure 4B

Data are from: ND:GFP: 4 embryos; ND:CRE-GFP: 4 embryos; ND:CRE-GFP + FL-HTT-mcherry: 4 embryos
One-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparisons test

Bin 1: ANOVA; F(2,9) = 7.138, *p = 0.0139

ND:GFP, ND-CRE-GFP	*
ND:GFP, ND-CRE-GFP + FL-HTT-mcherry	ns
ND:CRE-GFP, ND-CRE-GFP + FL-HTT-mcherry	*

Bin 2: ANOVA F(2,9)=5 , p = 0.0346

ND:GFP, ND-CRE-GFP	*
ND:GFP, ND-CRE-GFP + FL-HTT-mcherry	ns
ND:CRE-GFP, ND-CRE-GFP + FL-HTT-mcherry	ns

Bin 3: F(2,9) = 19.20, ***p = 0.0006

ND:GFP, ND-CRE-GFP	***
ND:GFP, ND-CRE-GFP + FL-HTT-mcherry	ns
ND:CRE-GFP, ND-CRE-GFP + FL-HTT-mcherry	**

Bin 4: F(2,9) = 26.44, ***p = 0.0002

ND:GFP, ND-CRE-GFP	***
ND:GFP, ND-CRE-GFP + FL-HTT-mcherry	ns
ND:CRE-GFP, ND-CRE-GFP + FL-HTT-mcherry	***

Bin 5: F(2,9) = 10.61, p = 0.0043

ND:GFP, ND-CRE-GFP	ns
ND:GFP, ND-CRE-GFP + FL-HTT-mcherry	ns
ND:CRE-GFP, ND-CRE-GFP + FL-HTT-mcherry	ns

Bin 6: ANOVA F = F(2,9) = 1.568, p=0.2605

ND:GFP, ND-CRE-GFP	ns
ND:GFP, ND-CRE-GFP + FL-HTT-mcherry	ns
ND:CRE-GFP, ND-CRE-GFP + FL-HTT-mcherry	ns

Figure 4E
Data are from: ND:GFP: 44 cells (from 4 embryos); ND:CRE-GFP: 64 cells (from 4 embryos)
Student's t test
***p<0.0001
Figure 4F
Data are from: ND:GFP: 44 cells (from 4 embryos); ND:CRE-GFP: 64 cells (from 4 embryos)
Student's t test
***p = 0.0066
Figure 4G
Data are from: ND:GFP: 44 cells (from 4 embryos); ND:CRE-GFP: 64 cells (from 4 embryos)
Student's t test
p = 0.1562
Figure 4H
Data are from: ND:GFP: 44 cells (from 4 embryos); ND:CRE-GFP: 64 cells (from 4 embryos)
Student's t test
**p = 0.0012

Figure 5H
Data are from three independent experiments: control (90 cells); mutant (90 cells).
Student's t test
***p<0.0001

Figure 6B
Data are from three independent experiments: control GFP (219 cells); Control+RAB11^{WT} (113 cells); Control+RAB11^{Q70L} (96 cells); Control+RAB11^{S22N} (111 cells); mutant GFP (198 cells); mutant+RAB11^{WT} (121 cells); mutant+RAB11^{Q70L} (75 cells); mutant+RAB11^{S22N} (115 cells).
One-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparisons test
ANOVA F(7,321) = 46.42; p***<0.001

Control+GFP; mutant+GFP	***
Control+GFP; Control+RAB11^{WT}	ns
Control+GFP; mutant+RAB11^{WT}	**
Control+GFP; Control+RAB11^{Q70L}	ns
Control+GFP; mutant+RAB11^{Q70L}	ns
Control+GFP; Control+RAB11^{S22N}	***
Control+GFP; mutant +RAB11^{S22N}	***
Mutant +GFP; Control+RAB11^{WT}	***
Mutant +GFP; mutant+RAB11^{WT}	**
Mutant +GFP; Control+RAB11^{Q70L}	***
Mutant +GFP; mutant+RAB11^{Q70L}	***
Mutant +GFP; Control+RAB11^{S22N}	ns
Mutant +GFP; mutant +RAB11^{S22N}	ns
Control+RAB11^{WT} ; mutant+RAB11^{WT}	**
Control+RAB11^{WT} ; Control+RAB11^{Q70L}	ns
Control+RAB11^{WT}, mutant+RAB11A^{Q70L}	ns
Control+RAB11^{WT}; Control+RAB11^{S22N}	***

Control+RAB11^{WT}; mutant+RAB11^{S22N}	***
Mutant+RAB11^{WT} ; Control+RAB11^{Q70L}	**
Mutant+RAB11^{WT} ; mutant+RAB11^{Q70L}	ns
Mutant+RAB11^{WT} ; Control+RAB11^{S22N}	*
Mutant+RAB11^{WT} ; mutant+RAB11^{S22N}	**
Control+RAB11^{Q70L}; mutant+RAB11^{Q70L}	ns
Control+RAB11^{Q70L}; Control+RAB11^{S22N}	***
Control+RAB11^{Q70L} ; mutant+RAB11^{S22N}	***
Mutant+RAB11^{Q70L}, control+RAB11^{S22N}	***
Mutant+RAB11^{Q70L}, mutant+RAB11^{S22N}	***
Control+RAB11^{S22N}, mutant+RAB11^{S22N}	ns

Figure 6G

Data are from: ND:GFP: 4 embryos; ND:CRE-GFP: 4 embryos; ND:CRE-GFP + RAB11-WT: 4 embryos; ND:CRE-GFP + NCAD-HA: 3 embryos

One-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparisons test

Bin 1: ANOVA F(3,26) = 4.646,p = 0.0099**	
ND:GFP, ND:CRE-GFP	*
ND:GFP, ND:CRE-GFP + RAB11	ns
ND:GFP, ND:CRE-GFP + NCAD-HA	ns
ND:CRE-GFP, ND-CRE-GFP + RAB11	*
ND:CRE-GFP, ND-CRE-GFP + NCAD-HA	**
ND:CRE-GFP + RAB11, ND-CRE-GFP + NCAD-HA	ns
Bin 2: ANOVA F(3,26) = 12.22,*p<0.001**	
ND:GFP, ND:CRE-GFP	*
ND:GFP, ND:CRE-GFP + RAB11	**
ND:GFP, ND:CRE-GFP + NCAD-HA	***
ND:CRE-GFP, ND-CRE-GFP + RAB11	ns
ND:CRE-GFP, ND-CRE-GFP + NCAD-HA	*
ND:CRE-GFP + RAB11, ND-CRE-GFP + NCAD-HA	*
Bin 3: ANOVA F(3,26) = 4.207,*p = 0.0149	
ND:GFP, ND:CRE-GFP	*
ND:GFP, ND:CRE-GFP + RAB11	*
ND:GFP, ND:CRE-GFP + NCAD-HA	ns
ND:CRE-GFP, ND-CRE-GFP + RAB11	ns
ND:CRE-GFP, ND-CRE-GFP + NCAD-HA	ns
ND:CRE-GFP + RAB11, ND-CRE-GFP + NCAD-HA	ns
Bin 4: ANOVA F(3,26) = 7.803,*p<0.001**	
ND:GFP, ND:CRE-GFP	***
ND:GFP, ND:CRE-GFP + RAB11	ns
ND:GFP, ND:CRE-GFP + NCAD-HA	*
ND:CRE-GFP, ND-CRE-GFP + RAB11	**
ND:CRE-GFP, ND-CRE-GFP + NCAD-HA	ns
ND:CRE-GFP + RAB11, ND-CRE-GFP + NCAD-HA	ns
Bin 5: ANOVA F(3,16) = 7.17,p = 0.0012**	
ND:GFP, ND:CRE-GFP	**
ND:GFP, ND:CRE-GFP + RAB11	ns
ND:GFP, ND:CRE-GFP + NCAD-HA	*
ND:CRE-GFP, ND-CRE-GFP + RAB11	*

ND:CRE-GFP, ND-CRE-GFP + NCAD-HA	ns
ND:CRE-GFP + RAB11, ND-CRE-GFP + NCAD-HA	ns
Bin 6: ANOVA F(3,16) = 1.114, p = 0.3612	
ND:GFP, ND:CRE-GFP	ns
ND:GFP, ND:CRE-GFP + RAB11	ns
ND:GFP, ND:CRE-GFP + NCAD-HA	ns
ND:CRE-GFP, ND-CRE-GFP + RAB11	ns
ND:CRE-GFP, ND-CRE-GFP + NCAD-HA	ns
ND:CRE-GFP + RAB11, ND-CRE-GFP + NCAD-HA	ns

Figure 7B

Data are from: ND:GFP: 4 embryos; ND:CRE-GFP: 4 embryos; ND:CRE-GFP+HTT-17Q: 3 embryos; ND:CRE-GFP+HTT-68Q: 4 embryos; ND:CRE-GFP+HTT-68Q+RAB11: 4 embryos

One-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparisons test

Bin 1: ANOVA; F(4,33) = 11.23, ***p<0.001	
ND:GFP, ND:CRE-GFP	*
ND:GFP, ND:CRE-GFP+17Q	ns
ND:GFP, ND:CRE-GFP+68Q	**
ND:GFP, ND:CRE-GFP+68Q+RAB11	ns
ND:CRE-GFP, ND:CRE-GFP+17Q	ns
ND:CRE-GFP, ND:CRE-GFP+68Q	ns
ND:CRE-GFP, ND:CRE-GFP+68Q+RAB11	ns
ND:CRE-GFP+17Q, ND:CRE-GFP+68Q	***
ND:CRE-GFP+17Q, ND:CRE-GFP+68Q+RAB11	ns
ND:CRE-GFP+68Q, ND:CRE-GFP+68Q+RAB11	***
Bin 2: ANOVA F(4,33)=5 , p = 23.87	
ND:GFP, ND:CRE-GFP	*
ND:GFP, ND:CRE-GFP+17Q	ns
ND:GFP, ND:CRE-GFP+68Q	ns
ND:GFP, ND:CRE-GFP+68Q+RAB11	ns
ND:CRE-GFP, ND:CRE-GFP+17Q	ns
ND:CRE-GFP, ND:CRE-GFP+68Q	ns
ND:CRE-GFP, ND:CRE-GFP+68Q+RAB11	ns
ND:CRE-GFP+17Q, ND:CRE-GFP+68Q	ns
ND:CRE-GFP+17Q, ND:CRE-GFP+68Q+RAB11	ns
ND:CRE-GFP+68Q, ND:CRE-GFP+68Q+RAB11	ns
Bin 3: F(4,33) = 19.53, ***p<0.001	
ND:GFP, ND:CRE-GFP	**
ND:GFP, ND:CRE-GFP+17Q	ns
ND:GFP, ND:CRE-GFP+68Q	***
ND:GFP, ND:CRE-GFP+68Q+RAB11	ns
ND:CRE-GFP, ND:CRE-GFP+17Q	*
ND:CRE-GFP, ND:CRE-GFP+68Q	ns
ND:CRE-GFP, ND:CRE-GFP+68Q+RAB11	ns
ND:CRE-GFP+17Q, ND:CRE-GFP+68Q	***
ND:CRE-GFP+17Q, ND:CRE-GFP+68Q+RAB11	ns
ND:CRE-GFP+68Q, ND:CRE-GFP+68Q+RAB11	***
Bin 4: F(4,33) = 15.13, ***p<0.001	
ND:GFP, ND:CRE-GFP	***

ND:GFP, ND:CRE-GFP+17Q	ns
ND:GFP, ND:CRE-GFP+68Q	***
ND:GFP, ND:CRE-GFP+68Q+RAB11	ns
ND:CRE-GFP, ND:CRE-GFP+17Q	***
ND:CRE-GFP, ND:CRE-GFP+68Q	ns
ND:CRE-GFP, ND:CRE-GFP+68Q+RAB11	***
ND:CRE-GFP+17Q, ND:CRE-GFP+68Q	***
ND:CRE-GFP+17Q, ND:CRE-GFP+68Q+RAB11	ns
ND:CRE-GFP+68Q, ND:CRE-GFP+68Q+RAB11	**
Bin 5: F(4,33) = 7.701, ***p<0.001	
ND:GFP, ND:CRE-GFP	***
ND:GFP, ND:CRE-GFP+17Q	ns
ND:GFP, ND:CRE-GFP+68Q	**
ND:GFP, ND:CRE-GFP+68Q+RAB11	ns
ND:CRE-GFP, ND:CRE-GFP+17Q	**
ND:CRE-GFP, ND:CRE-GFP+68Q	ns
ND:CRE-GFP, ND:CRE-GFP+68Q+RAB11	**
ND:CRE-GFP+17Q, ND:CRE-GFP+68Q	ns
ND:CRE-GFP+17Q, ND:CRE-GFP+68Q+RAB11	ns
ND:CRE-GFP+68Q, ND:CRE-GFP+68Q+RAB11	ns
Bin 6: F(4,33) = 7.701, p=2.569	
ND:GFP, ND:CRE-GFP	ns
ND:GFP, ND:CRE-GFP+17Q	ns
ND:GFP, ND:CRE-GFP+68Q	ns
ND:GFP, ND:CRE-GFP+68Q+RAB11	ns
ND:CRE-GFP, ND:CRE-GFP+17Q	ns
ND:CRE-GFP, ND:CRE-GFP+68Q	ns
ND:CRE-GFP, ND:CRE-GFP+68Q+RAB11	ns
ND:CRE-GFP+17Q, ND:CRE-GFP+68Q	ns
ND:CRE-GFP+17Q, ND:CRE-GFP+68Q+RAB11	ns
ND:CRE-GFP+68Q, ND:CRE-GFP+68Q+RAB11	ns

Figure 7C

Data are from: ND:GFP: 4 embryos; ND:CRE-GFP: 4 embryos; ND:CRE-GFP+HTT-17Q: 3 embryos; ND:CRE-GFP+HTT-68Q: 4 embryos; ND:CRE-GFP+HTT-68Q+RAB11: 4 embryos

One-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparisons test

ANOVA; F(4,33) = 13.72, ***p<0.001

ND:GFP, ND:CRE-GFP	***
ND:GFP, ND:CRE-GFP+17Q	ns
ND:GFP, ND:CRE-GFP+68Q	***
ND:GFP, ND:CRE-GFP+68Q+RAB11	ns
ND:CRE-GFP, ND:CRE-GFP+17Q	***
ND:CRE-GFP, ND:CRE-GFP+68Q	ns
ND:CRE-GFP, ND:CRE-GFP+68Q+RAB11	**
ND:CRE-GFP+17Q, ND:CRE-GFP+68Q	***
ND:CRE-GFP+17Q, ND:CRE-GFP+68Q+RAB11	ns

Figure 8C
Data are from: control: 34 cells (4 mice); mutant: 35 cells (4 mice)
T test *p = 0.0177
Figure 8D
Data are from: control: 34 cells (4 mice); mutant: 35 cells (4 mice)
Student's t test
Radius 10: p = 0.1176
Radius 20: ***p = 0.006
Radius 30: **p = 0.0019
Radius 40: **p = 0.0068
Radius 50: *p = 0.0218
Radius 60: p = 0.1447
Radius 70: p = 0.1678
Radius 80: p = 0.1826
Radius 90: p = 0.2246
Radius 100: p = 0.4385
Radius 110: p = 0.4944
Radius 120: p = 0.2805
Radius 130: *p = 0.0477
Radius 140: p = 0.1402
Radius 150: p = 0.1616
Radius 160: p = 0.4277
Radius 170: p = 0.4956
Radius 180: p = 0.4425
Radius 190: p = 0.3837
Radius 200: p = 0.4598
Radius 210: p = 0.2211
Radius 220: p = 0.2211
Radius 230: p = 0.207
Radius 240: p = 0.1727
Radius 250: p = 0.2103
Radius 260: p = 0.2103
Radius 270: p = 0.1727
Radius 280: p = 0.2195
Radius 290: p = 0.2195
Radius 300: p = 0.1996

Figure 8F
Data are from: control: 3 mice; ND:CRE-GFP: 3 mice
Student's t test
Bin1: p = 0.3447; t(16) = 0.9737
Bin2: p = 0.1376; t(16) = 10.42
Bin3: p = 0.2313; t(16) = 1.244
Bin4: ***p<0.001; t(16) = 6.359
Bin5: p = 0.2288; t(16) = 1.251
Bin6: **p = 0.0015; t(16) = 3.825

Figure 8J
Data are from: Control: 30 cells (3 mice); CRE-ERT2 + Lox-GFP: 30 cells (3 mice); ND:CRE + Lox-GFP: 30 cells (3 mice); ND:CRE + Lox-GFP + RAB11: 30 cells (3 mice)

One-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparisons test

ANOVA F(3,116) = 44.31; ***p<0.001

Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	***
Control, ND:CRE + Lox-GFP	***
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	***
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	***
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	***

Figure 8K

Data are from: Control: 30 cells (3 mice); CRE-ERT2 + Lox-GFP: 30 cells (3 mice); ND:CRE + Lox-GFP: 30 cells (3 mice); ND:CRE + Lox-GFP + RAB11: 30 cells (3 mice)

One-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparisons test

Radius 10: ANOVA F(3,116) = 2.511; p = 0.0621

Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns

Radius 20: ANOVA F(3,116) = 1.619; p = 0.1888

Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns

Radius 30: ANOVA F(3,116) = 25.5; ***p<0.001

Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	***
Control, ND:CRE + Lox-GFP	***
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	***
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	***
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	**

Radius 40: ANOVA F(3,116) = 16.37; ***p<0.001

Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	***
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	***
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	***
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns

Radius 50: ANOVA F(3,116) = 19.38; ***p<0.001

Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	***
Control, ND:CRE + Lox-GFP	***
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	***
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	**
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns

Radius 60: ANOVA F(3,116) = 18.09; ***p<0.001

Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	**

Control, ND:CRE + Lox-GFP	***
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	***
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	**
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
Radius 70: ANOVA F(3,116) = 15.08; ***p<0.001	
Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	**
Control, ND:CRE + Lox-GFP	***
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	***
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	**
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
Radius 80: ANOVA F(3,116) = 15.33; ***p<0.001	
Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	**
Control, ND:CRE + Lox-GFP	***
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	***
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	*
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
Radius 90: ANOVA F(3,116) = 12.11; ***p<0.001	
Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	***
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	***
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	*
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	*
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
Radius 100: ANOVA F(3,116) = 12.87; ***p<0.001	
Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	*
Control, ND:CRE + Lox-GFP	***
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	***
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	*
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
Radius 110: ANOVA F(3,116) = 14.67; ***p<0.001	
Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	***
Control, ND:CRE + Lox-GFP	***
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	***
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
Radius 120: ANOVA F(3,116) = 7.949; *** p<0.001	
Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	***
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	***
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
Radius 130: ANOVA F(3,116) = 5.28; **p=0.0019	
Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	**

Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	**
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
Radius 140: ANOVA F(3,116) = 4.934; **p=0.0029	
Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	**
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	**
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
Radius 150: ANOVA F(3,116) = 1.421; p=0.2401	
Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
Radius 160: ANOVA F(3,116) = 5.074; **p=0.0025	
Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	**
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	*
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
Radius 170: ANOVA F(3,116) = 0.689; p=0.5605	
Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
Radius 180: ANOVA F(3,116) = 3.059; *p=0.0311	
Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
Radius 190: ANOVA F(3,116) = 0.6653; p=0.575	
Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
Radius 200: ANOVA F(3,116) = 0.6444; p=0.588	
Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns

CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
Radius 210: ANOVA F(3,116) = 0.6919; p=0.5588	
Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
Radius 220: ANOVA F(3,116) = 0.7541; p=0.5221	
Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
Radius 230: ANOVA F(3,116) = 0.09814; p=0.9609	
Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
Radius 240: ANOVA F(3,116) = 0.6784; p=0.567	
Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
Radius 250: ANOVA F(3,116) = 1.321; p=0.2708	
Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
Radius 260: ANOVA F(3,116) = 1.321; p=0.2708	
Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
Radius 270: ANOVA F(3,116) = 0.3333; p=0.8013	
Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	ns

CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
Radius 280: ANOVA F(3,116) = 1; p=0.3956	
Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
Radius 290: ANOVA F(2,87) = 1; p=0.3956	
Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
Radius 300: ANOVA F(2,87) = 1; p=0.3956	
Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns

Figure S3H

Data are from: ND-GFP: 114 cells (from 3 embryos); ND-CRE-GFP: 159 cells (from 3 embryos)

Mann-Whitney U test

***p<0.0001

Figure S6B

Data are from: ND:GFP: 3 embryos; ND:GFP + RAB11: 5 embryos; ND:GFP + NCAD-HA: 3 embryos

One-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparisons test.

Bin 1: ANOVA F(2,25) = 1.25, p=0.3038	
ND:GFP, ND:GFP + RAB11	ns
ND:GFP, ND:GFP + NCAD-HA	ns
ND:GFP + RAB11, ND:GFP + NCAD-HA	ns
Bin 2: ANOVA F(2,25) = 8.829, **p=0.0013	
ND:GFP, ND:GFP + RAB11	ns
ND:GFP, ND:GFP + NCAD-HA	**
ND:GFP + RAB11, ND:GFP + NCAD-HA	**
Bin 3: ANOVA F(2,25) = 8.667, **p=0.0014	
ND:GFP, ND:GFP + RAB11	ns
ND:GFP, ND:GFP + NCAD-HA	**
ND:GFP + RAB11, ND:GFP + NCAD-HA	**
Bin 4: ANOVA F(2,25) = 7.17, **p=0.0035	
ND:GFP, ND:GFP + RAB11	ns
ND:GFP, ND:GFP + NCAD-HA	ns
ND:GFP + RAB11, ND:GFP + NCAD-HA	**

Bin 5: ANOVA F(2,25) = 18.32, ***p <0.001

ND:GFP, ND:GFP + RAB11	ns
ND:GFP, ND:GFP + NCAD-HA	**
ND:GFP + RAB11, ND:GFP + NCAD-HA	***

Bin 6: ANOVA F(2,25) = 11.96, ***p <0.001

ND:GFP, ND:GFP + RAB11	ns
ND:GFP, ND:GFP + NCAD-HA	*
ND:GFP + RAB11, ND:GFP + NCAD-HA	***

Figure S8B

Student's t test

Data are from: control: 5 mice (4166 cells); mutant: 6 mice (2268 cells)

Bin1: p = 0.0843

Bin2: p = 0.1435

Bin3: p = 0.6003

Bin4: p = 0.148

Bin5: **p = 0.0033

Bin6: ***p<0.001

Figure S8D

Data are from: Control: 3 mice; ND:CRE + Lox-GFP: 3 mice; CRE-ET2 + Lox-GFP: 3 mice; ND:CRE + Lox-GFP + RAB11: 3 mice.

One-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparisons test

Bin 1: ANOVA F(3,32) = 1.026, p = 0.394

Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP+ RAB11	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns

Bin 2: ANOVA F(3,32) = 1.182, p = 0.3319

Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP+ RAB11	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns

Bin 3: ANOVA F(3,32)= 5.363, **p = 0.0042

Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP+ RAB11	*
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	**
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns

Bin 4: ANOVA F(3,32) = 39.63, ***p <0.001

Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	***
Control, ND:CRE + Lox-GFP+ RAB11	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	***
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns

ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	***
Bin 5: ANOVA F(3,32) = 1.566, p = 0.2167	
Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP+ RAB11	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
Bin 6: ANOVA F(2,24) = 14.18, ***p <0.001	
Control, CRE-ERT2 + Lox-GFP	ns
Control, ND:CRE + Lox-GFP	***
Control, ND:CRE + Lox-GFP+ RAB11	ns
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP	***
CRE-ERT2 + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	ns
ND:CRE + Lox-GFP, ND:CRE + Lox-GFP + RAB11	***

SUPPLEMENTARY REFERENCES

Dragatsis, I., Levine, M.S., and Zeitlin, S. (2000). Inactivation of hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. Nat Genet 26, 300-306.

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.

ARTICLE 2 : L'effet différentiel de la génération précoce ou tardive de neurones corticaux conduit à une lamination corticale périnatale aberrante dans le modèle zQ175.

Au cours de ma thèse, je me suis également intéressé à l'effet de la mutation de la HTT à l'état hétérozygote pendant la neurogenèse corticale. En effet, la plupart des études concernant les altérations du développement cortical dans le contexte de la MH se sont focalisées sur la déplétion de HTT ou sur l'étude de sa mutation à l'état homozygote, ce qui ne reproduit pas la physiopathologie de la maladie, les patients étant dans la grande majorité des cas porteurs d'un seul allèle de la HTT mutée. J'ai donc souhaité donner une vue d'ensemble de l'effet de la mutation, dans un contexte génétique se rapprochant le plus de l'Homme, sur la réserve de progéniteurs neuronaux, la migration radiale, la maturation neuronale et la lamination corticale périnatale. Toutes ces données étaient à ce jour manquantes.

Dans le cadre de cette étude, j'ai tout d'abord étudié l'expression de la HTT et l'effet de la mutation sur l'expression de la HTT sauvage pendant la neurogenèse corticale.

J'ai ensuite analysé l'impact de la mutation sur les populations de progéniteurs neuronaux apicaux et basaux par des approches d'immunohistochimie. J'ai évalué la quantité de ces progéniteurs tout au long de la neurogenèse corticale (de E12 à E17), l'évolution de leurs évènements mitotiques ainsi que leur capacité à proliférer. J'ai observé que dans les stades précoces, le nombre de divisions était accru et conduisait à un épuisement précoce de la réserve de progéniteurs apicaux.

J'ai ensuite caractérisé la capacité de migration des neurones nouvellement générés par une approche d'IUE et observé que les neurones générés tardivement étaient plus sensibles aux défauts de migration. De plus, la maturation des neurones post-mitotiques est elle aussi ralentie.

Enfin, j'ai analysé l'effet de la mutation sur la lamination du cortex à 7 jours de vie, moment où tous les neurones corticaux ont été générés et se sont positionnés. J'ai observé une augmentation de la quantité des neurones des couches profondes et une réduction de l'épaisseur des couches superficielles. Ces deux défauts sont le reflet des

défauts de prolifération et de migration observés pendant la neurogenèse embryonnaire.

Ces travaux sont en cours de préparation pour soumission, au titre suivant :

ABBERANT PERINATAL CORTICAL LAMINATION IN ZQ175 MODEL IS DUE TO DIFFERENTIAL EFFECT OVER EARLY AND LATE BORN CORTICAL NEURON GENERATION.

ABBERANT PERINATAL CORTICAL LAMINATION IN ZQ175 MODEL IS DUE TO DIFFERENTIAL EFFECT OVER EARLY AND LATE BORN CORTICAL NEURON GENERATION

INTRODUCTION

The cerebral cortex is a complex brain structure controlling high-order cognitive functions. It is composed of 80% of excitatory glutamatergic pyramidal neurons sorted in six layers and 20% of inhibitory GABAergic interneurons. Laminar organisation of the cortex arises from a highly regulated process called cortical neurogenesis.

Interneurons are generated from the ventral telencephalon and migrate tangentially in the developing cortex whereas excitatory neurons are produced in the ventricular zone (VZ) through the proliferation of radial glial cells (RGC). RGC are produced through the differentiation of neuroepithelial cells (NE) which constitute the scaffold of the developing cortex. RGC first amplify their own pool before the onset of neurogenesis. RGC go through direct and indirect neurogenesis through a transient amplification of intermediate progenitors in the intermediate zone (IZ) (Kriegstein and Noctor 2004, Agirman 2017). Newborn excitatory neurons then undergo a multipolar-bipolar transition. During this transition, non-polarized neurons extend a leading process toward the cortical plate (CP) and a trailing process toward the VZ. When the bipolar shape is adopted, cells start a locomotion-based motility called radial migration, along RGC fibers toward the CP. These migrating neurons adopt the proper molecular identity of the layer they are addressed to (Cooper 2014). Neuronal layers are sequentially produced in an “inside-out” pattern between embryonic days 12.5 (E12.5) and E15.5, meaning that deepest layers are generated first. Alteration of neuronal progenitor’s proliferation can either lead to megacephalia, microcephalia or lissencephalia, whereas migration defect leads to cortical lamination disorganisation which in both cases affect cognitive functions of individuals (Agirman 2017).

Huntington’s disease (HD) is a hereditary neurological disorder leading to psychiatric, cognitive and motor symptoms, which emerge during mild-adulthood. HD is characterized by a massive neuronal loss of cortical and striatal neurons. HD is caused by a mutation within the coding sequence for the Huntingtin protein (HTT), leading to the production of a mutated protein (mHTT). mHTT gains new toxic functions

and loses some of HTT normal functions (Saudou and Humbert 2016). HTT and mHTT both participate to cerebral structure development (Molero 2016, Arteaga-Bracho 2016). Pioneer studies have underline HTT as a requirement for proper embryonic development since its knock-out is embryonic lethal by E7.5 (Duyao et al., 1995; Nasir et al., 1995; Zeitlin et al., 1995). Following the same idea, studies loss of function and knock-in homozygous *Hdh*^{Q111} mouse models highlight the contribution of HTT and mHTT to proper neuronal progenitor proliferation through the regulation of the mitotic spindle orientation (Godin 2010, Molina-Calavita 2014). More recently, the role of HTT and mHTT during radial migration of newborn neurons was unravelled (Tong 2011; Barnat 2017). HTT and mHTT contribution to N-cadherin recycling during radial migration have direct implications for the establishment of cortical lamination and (Barnat 2017). In addition, HTT and mHTT also impact post-natal development and have a role in the acquisition of a correct dendritic morphology (McKinstry 2014, Barnat 2017). However, the impact of mHTT over cortical neurogenesis at heterozygous state remains elusive and an overview of cellular defects occurring in a proper physiopathological model of HD is still lacking.

In the present study, we proposed to build an overview of cortical neurogenesis using a knock-in mouse model at the heterozygous state, thus resembling the genetic situation of HD patients (referred as *HTT*$^{Q7/Q175}$) (Menalled 2012). This model depicts early onset of characteristic motor defects (Menalled 2012, Peng 2016). In addition, cortical neurons post-natal development is deficient and leads to aberrant morphology and abnormal electrical properties of layer V and II/III neurons (McKinstry 2014). These features could be mediated, at least in part, by an abnormal embryonic cortical development. To address this question, we compared control (*HTT*$^{Q7/Q7}$) and HD (*HTT*$^{Q7/Q175}$) cortices between E12.5 and E17.5 embryonic stages and analysed them at postnatal day P7. We observed that mHTT, depending on these embryonic stages, differentially affects cortical neurogenesis and thus the generated cortical layers. In HD, early stages were mostly impacted by an increased proliferation associated with a progenitor pool exhaustion at later stages. In contrast, at later stages, the radial migration of late born neurons was greatly impaired in HD and this was associated to a delay during neuronal sub-type specification. Embryonic cortical neurogenesis defects were associated to a direct neonatal brain disorganisation characterised by an increased number of deep layer neurons, an overall reduction of cortical plate thickness and ectopic upper layer neurons in deep layers. Thus, embryonic

development is altered in HD and these defects lead to postnatal cortical disorganisation.

RESULTS

HTT localisation and protein levels are modified in HD developing cortex.

We first studied HTT localisation by immuhistochemistry using two different anti-HTT antibodies (named 4C8 and D7F7) in E15.5 developing brains. The 4C8-recognizing epitope is localized from amino acid 36 to 161 of human HTT, whereas the D7F7-recognizing epitope is surrounding the 1120th amino acid of human HTT. In control brains (CT, HTT$^{Q7/Q7}$), these antibodies displayed the same pattern of HTT localisation: an apical enrichment at the ventricular surface, in the upper intermediate zone and the lower cortical plate (Fig. 1A). This suggests that both 4C8 and D7F7 antibodies are equally able to detect endogenous HTT *in vivo*. Interestingly, heterozygous HTT$^{Q7/Q175}$ individuals displayed an aberrant increase of HTT levels at the ventricular surface when the HTT-4C8 antibody was used. Indeed, mean pixel intensity at the ventricular surface is higher with the 4C8, but not with the D7F7 staining (Fig. 1B-C). In addition, the D7F7-mediated staining in HTT$^{Q7/Q175}$ brains shows a decreased level of HTT in the IZ (Fig. 1A,1C). Together, these results suggest that different forms of HTT may co-exist during embryonic development *in vivo*. In HD, mHTT may affect localisation of the HTT form specifically targeted by the 4C8 antibody, notably at the ventricular surface, whereas D7F7 may not be able to detect mHTT in the IZ. We thus assessed whether this mislocalised pattern of HTT could reflect an aberrant level of HTT expression by immunoblotting of dissected cortices at E15.5. We observed that the level of HTT expression was decreased in HTT$^{Q7/Q175}$ individuals (64.36±3.52% in HD versus 100±7.6% in CT, at least 3 brains analysed per condition). The reduction is due to a low level of expression of the mutated form (12.68±2.1% in HD versus 51.62±1.4% in CT) compared to the wild-type form in HTT$^{Q7/Q175}$ individuals (Fig. 1D-E).

Mutant HTT exhausts the pool of apical progenitors through an early increased proliferation.

HTT mislocalisation was prominent in the region that contains neuronal progenitors. We performed immunohistochemistry to specifically label neuronal progenitor populations using Pax6 and Tbr2 as markers for apical and intermediate progenitors, respectively. Pax6/Tbr2- double positive cells are early intermediate progenitors. We analysed the number of neuronal progenitors throughout the embryonic development

of control and HD cortices (from E12.5 to E17.5) (Fig. 2A,2B). At E12.5 and E13.5, no difference in the total number of progenitors was found between control and HD conditions. In contrast, we observed a striking decrease of HD apical progenitors (Pax6-positive cells, Pax6+) at later stages (from E14.5 to E17.5; Fig. 2C) (E14.5: 325±15 in HD versus 382±14 in CT; E15.5: 268±11 in HD versus 358±13 in CT; E16.5: 464±16 in HD versus 559±9 in CT; E17.5: 377±17 in HD versus 484±18 in CT; at least 3 brains analysed per condition). In $HTT^{Q7/Q175}$ mice, the amount of early intermediate progenitors (Pax6/Tbr2 double positive cells, Pax6+/Tbr2+) was significantly decreased and increased at embryonic stages E14.5 and E16.5, respectively (Fig. 2D). By contrast, the total amount of intermediate progenitors (Tbr2-positive cells, Tbr2+) was unchanged in HD condition from E13.5 to E17.5, suggesting that intermediate progenitors do not accumulate in $HTT^{Q7/Q175}$ mice (E13.5 : 111±7 in HD versus 100±5 in CT; E14.5 : 313±19 in HD versus 278±22 in CT ; E15.5 : 323±12 in HD versus 302±10 in CT ; E16.5 : 364±10 in HD versus 344±12 in CT ; E17.5 : 406±12 in HD versus 377±15 in CT, at least 3 brains analysed per condition) (Fig. 2E). Altogether, these results suggest a precocious exhaustion of the progenitor pool, which may occur through an increased amount of neurogenic division of apical progenitors during early stages.

Neuronal progenitors are cycling and proliferating cells that tend either to maintain a pool of cycling progenitors or to differentiate through a neurogenic division. We thus assessed the proliferation capacity of progenitors along corticogenesis by labelling cycling cells with a 1-hour pulse of BrdU. BrdU-positive cells (BrdU+ cells) quantification revealed that proliferation was increased in $HTT^{Q7/Q175}$ brains at all stages (12.5 : 359±5.8 in HD versus 307±6.2 in CT; E13.5 : 333.3±11.9 in HD versus 278.3±9.9 in CT ; E14.5 : 274±5 in HD versus 237±6 in CT; E15.5 : 270±7 in HD versus 220±6 in CT; E16.5 : in 241±9 in HD versus 206±8 in CT ; E17.5 : 274±6 in HD versus 226±7 in CT, at least 3 brains analysed per condition) (Fig. 3 A-B). We then identified the cell identity of BrdU+ cells at E12.5, E14.5 and E16.5. Interestingly, in HD brains, BrdU+ cells contained a higher number of Pax6+ apical progenitors compared to control condition at E12.5 (299±7 in HD versus 260±11, at least 3 brains analysed per condition) and E14.5 (177±8 in HD versus 135±7 in CT, at least 3 brains analysed per condition) but not at E16.5. However, at the later stage E16.5, the increase in the total amount of BrdU+ cells was due to a significantly increased amount of proliferating Tbr2+ intermediate progenitors (E16.5 : 61±6 in HD versus 41±4 in CT, at least 3 brains

analysed per condition) (Fig. 3C). These results are in accordance with our previous observation of a precocious exhaustion of the progenitor pool (Fig. 2) which is associated with an increased proliferation of progenitors (Fig. 2). Since the total amount of progenitors is not significantly different during early stages, we assessed whether the increased number of proliferating cells could be due to an increased S-phase length. To address this question, we used a BrdU pulse followed 1.5 hour later by an EdU pulse to estimate S-phase length through differential incorporation of thymidine analogues at E15.5. This revealed that the S-phase was significantly longer in HD condition (8.8±0.5 in HD versus 6.5±0.3 in CT, at least 3 brains analysed per condition), which may impact the overall cell cycle length and cell fate (Fig. 3D-F).

We then addressed the mitotic capacity of these progenitors from E12.5 to E17.5 by immunohistochemistry using Phospho-Histone 3 (PHH3) staining that specifically labels mitotic cells (Fig. 4). We counted the number of mitotic cells per field at the ventricular and ab-ventricular regions. During early stages of corticogenesis, we observed that the number of mitotic events was significantly higher in $HTT^{Q7/Q175}$ than in $HTT^{Q7/Q7}$ brains at E12.5 (36±1.6 in HD versus 31±1.6 in CT, at least 3 brains analysed per condition) and E13.5 (38±2.3 in HD versus 31±2 in CT, at least 3 brains analysed per condition) (Fig. 4A-C). Interestingly, in HD condition, the total of mitotic events tends to normalise from E14.5 to E16.5 until a dramatic drop off at E17.5 (21±1.6 in HD versus 30±3 in CT, at least 3 brains analysed per condition). The number of ventricular divisions followed the decrease in the quantity of apical progenitors at all stages (E12.5 : 34±1.8 in HD versus 26±1.9 in CT ; E13.5 : 30±1.9 in HD versus 24±1.7 in CT; E17.5 : 13±1.6 in HD versus 22±3.5 in CT, at least 3 brains analysed per conditions) (Fig. 4A-B,D). By contrast, ab-ventricular mitotic events were increased in $HTT^{Q7/Q175}$ compared to $HTT^{Q7/Q7}$ mice at all stages form E14.5 until E17.5 (E14.5 : 9±0.9 in HD versus 6±0.6 in CT ; E15.5 : 4.2±0.5 in HD versus 2.4±0.5 in CT ; E16.5 : 7.5±1 in HD versus 6.25±0.88 in CT ; E17.5 : 8.4±0.9 in HD versus 5.5±0.8 in CT, at least 3 brains analysed per condition) (Fig. 4A-B,E). We conclude that HTT mutation leads to an increased proliferation conducting a dramatic exhaustion of apical progenitor pool through a probable increased differentiation of progenitors into intermediate progenitors or neurons.

Late born post-mitotic neurons are more affected by a defective radial migration.

We previously observed that both HTT and mHTT were expressed in the upper IZ and lower CP where newborn post-mitotic cortical neurons undergo multipolar-bipolar transition before starting to migrate radially toward the CP. In addition, HTT is a key regulator of radial migration and mHTT is not able to fulfil its function (Tong 2011, Barnat 2017). However, it remains elusive whether the mutation at heterozygous state could impair radial migration. We thus tested how different neuronal populations could properly reach the CP in control and HD conditions. By *in utero* electroporation (IUE), we tracked migrating newborn neurons by introducing a GFP-expressing plasmid into neuronal progenitors of developing cortices from time-pregnant mice embryos. We analysed their migration 3 days later and quantified GFP-positive neurons distribution into six equal sub-regions (called bins) from the upper IZ to the top of the CP (Fig. 5). First, we tested the migration of layer V neurons by performing *IUE* at E13.5 (the date at which they are generated) and analysed their position at E17.5. No significant variation of their distribution between $HTT^{Q7/Q7}$ and $HTT^{Q7/Q175}$ developing cortices was observed (Fig. 5A-B). Next, we assessed the migration of layer IV neurons by performing IUE at E14.5 and the analysis at E18.5. This revealed an accumulation of these neurons in deep layers (bin 5 : 4.6±0.6% in HD versus 2.9±=0.8% in CT ; bin 6 : 4.7±0.4% in HD versus 1.6±0.3% in CT, at least 3 brains analysed per condition) (Fig. C-D). Finally, we tested the migration of upper layer II/III neurons by an IUE at E15.5 followed by an analysis at E19.5. This time again, while most control neurons have reached layer II/III, a significant proportion of GFP-positive neurons failed to reach the upper layers in HD condition (bin 2 : 19±1.7% in HD versus 28±3.5% in CT, at least 3 brains analysed per condition). This was associated with an significant accumulation of GFP-positive neurons in deep layers (bin 4 : 4.9±0.4% in HD versus 2.3±0.4% in CT) ; bin 5 (4.7±0.4% in HD versus 1.6±0.3% in CT) ; bin 6 (6.1±0.6% in HD versus 2.4±0.5% in CT, at least 3 brains analysed per condition) (Fig. E-F). We thus conclude that the mHTT, at the heterozygous state, is sufficient to induce radial migration defects and that late born neurons are the most affected by the mutation during their migration.

Mutant HTT affects cortical neuron maturation.

Proliferative and migration defects are both known to alter the cell fate, as well as cortical neurons maturation (Molyneaux 2007). To assess whether these defective proliferation and migration observed in $HTT^{Q7/Q175}$ braibs could alter neurons generation and the acquisition of their cellular identity, we performed co-

immunostaining to specifically label neuronal identity with Tbr1, Ctip2 and Satb2, neuronal markers of layer VI, layer V and callosal projecting neurons (mainly expressed by the upper layer II/III/IV neurons), respectively. During neuronal maturation, newborn post-mitotic neurons will first express all these markers at the same time, until they acquire their proper cell identity. This aquisition depends on the time they are born and on which layer they belong to (Fig. 6) (Molyneaux 2007, Martynoga 2018). Tracking this acquisition of cell identity from E12.5 to E17.5 revealed striking increase in Tbr1-positive neurons in layer VI from E15.5 to E17.5 in HD condition (E15.5: 377.2±11.1 in HD versus 301±15.7 in CT; E16.5 : 444.6±15.1 in HD versus 391.7±6.4 in CT; E17.5 : 498±10.6 in HD versus 426.9±18.3 in CT, at least 3 brains analysed per condition, Figure 6A-C). In contrast, no defects in number of Ctip2-positive neurons was observed (Fig.6A-B, 6D). We observed a transient increase of Satb2-positive neurons from E14.5 to E16.5 in $HTT^{Q7/Q175}$ brains (E14.5: 517±28 in HD versus 445.9±11 in CT ; 15.5 : 609±11.5 in HD versus 491.3±14 in CT ; E16.5 : 498.3±10.6 in HD versus 426.9±18.3 in CT, at least 3 brains analysed per condition) that does not longer persist at E17.5, suggesting a delayed cell identity acquisition of cortical neurons born later during corticogenesis (Fig. 6A-B, 6E).

Abnormal corticogenesis induces aberrant cortical lamination perinataly.

Proliferative, migration and maturation abnormalities are known to lead to aberrant cortical cytoarchitecture lamination (Agirman 2017). Interestingly, at postnatal stage P7 the overall CP thickness was significantly reduced in $HTT^{Q7/Q175}$ mice ($HTT^{Q7/Q7}$ 100±3.3% n=5 compared to $HTT^{Q7/Q175}$ 88.3±2.4% n=6) (Fig 7A-7C). We then wanted to identify the layer(s) in the CP that were responsible for this thickness reduction. We therefore labelled neurons from different layers using Cux1 (layer II/III/IV), Ctip2 (layer V), Tbr1 (layer VI) markers (Fig. 7). While layer VI thickness was unchanged in HD condition, it exhibited a higher neuronal density (134±5.7% n=6 in HD versus 100±5% in CT, at least 5 brains analysed per condition; Fig. 7A,7D) in accordance with our previous observation of increased proliferation in early developmental stages. Layer V thickness and neuronal density remained unchanged between control and HD conditions (Fig. 7B,7E). Finally, layer II/III/IV exhibited a significant decrease in layer thickness (80±1.9% in HD versus 100±2.8% in CT, at least 6 brains analysed per condition) associated with an increase of neuronal density (114±7.5% in HD versus 100±5.3% in CT, at least 6 brains analysed per condition, Fig. 7B,7F). Furthermore,

we also found an increased amount of out-layer Cux1-positive neurons (313.6±62.5% in HD versus 100±18% in CT, at least 6 brains analysed per condition, Fig. 7B,7F) which reflects the abnormal neuronal migration of late born neurons observed previously.

DISCUSSION

Previous studies in HD mouse models expressing mHTT at the homozygous state have demonstrated that the mutation of this crucial protein is responsible for an abnormal cortical development. However, these models do not recapitulate the pathophysiology of the human disease, since patients suffering from HD express only one allele of the mutated form of HTT.

Our study is the first to demonstrate that HTT mutation at the heterozygous state is sufficient to alter cortical neurogenesis. Indeed, all cellular processes involved in cortical neurogenesis, including proliferation of progenitors, radial migration and maturation of newborn cortical neurons, are altered in the presence of one allele of mHTT, suggesting that mHTT acts through a dominant-negative mechanism on cortical development. Furthermore, by analysing cortical neurogenesis from early to late stages, we provide a more global temporal view of the developmental alterations occurring in HD. This broad analysis allowed us to highlight a differential effect of mHTT over early and late born neurons which was never observed before (Fig. 8).

Previous studies stated that HTT depletion and mHTT were promoting neurogenic division through an aberrant orientation of the mitotic spindle pole (Godin 2010, Molina-Calavita 2014). Here, we corroborate these results in a genetically integrated mouse model at heterozygous state. We observed that mHTT induced cell proliferation defects along cortical neurogenesis. This was associated with cell cycle modification as shown by the elongated S-phase, known to favour neurogenic division (Estivill-Torrus 2002). Interestingly, we observed that progenitor pool tends to dramatically decrease along cortical neurogenesis in HD condition, sustaining a change of division mode. We observed that early stages (E12.5 and E13.5) displayed an increased number of mitotic events associated with increased numbers of layer VI neurons generated at this time-point, corroborating a specific increase of neurogenic division at early stages which was not present later on.

By contrast, late born neurons were the more affected during the process of radial migration. Indeed, the later a newborn post-mitotic is produced, and the more defective is its migration in the studied model. HTT function during radial migration is already described and mHTT incapacity to sustain its function is established (Tong 2011, Barnat 2017). Here, we demonstrated that one allele of the mutated form of HTT is

sufficient to recapitulate the migration defects. Different HD mouse models display an abnormal cortical development. However, the consequences of these developmental defects on post-natal brains remains poorly studied. Here, we show that the differential effect of mHTT on the proliferation and migration of newborn neurons is accompanied by an aberrant perinatal cortical architecture. More precisely, a global thinning of the cortex was observed, and it was associated with, among other defects, a thinning of layer II/III/IV, probably due to their delayed migration during embryonic development. As a result, these neurons could display an atrophied dendritic arborisation, which was previously documented in loss of function and zQ175 models (Barnat 2017, McKinstry 2014).

Altogether, our data support the hypothesis of a neurodevelopmental trouble in HD carriers. Consistent with this idea, the reduced perinatal cortical thickness corroborates previous analysis in HD carriers showing a smaller intracranial brain volume before the onset of the disease, probably reflecting an abnormal brain development (Nopoulos et al., 2010). This also applies to anthropomorphic measurements in children at risk for HD which display smaller heads, suggesting an abnormal brain growth (Lee 2012). Our characterisation of cortical neurogenesis within a zQ175 mouse model also provides a powerful tool to test embryonic treatment that could potentially rescue the developmental anomalies found in HD.

FIGURE 1

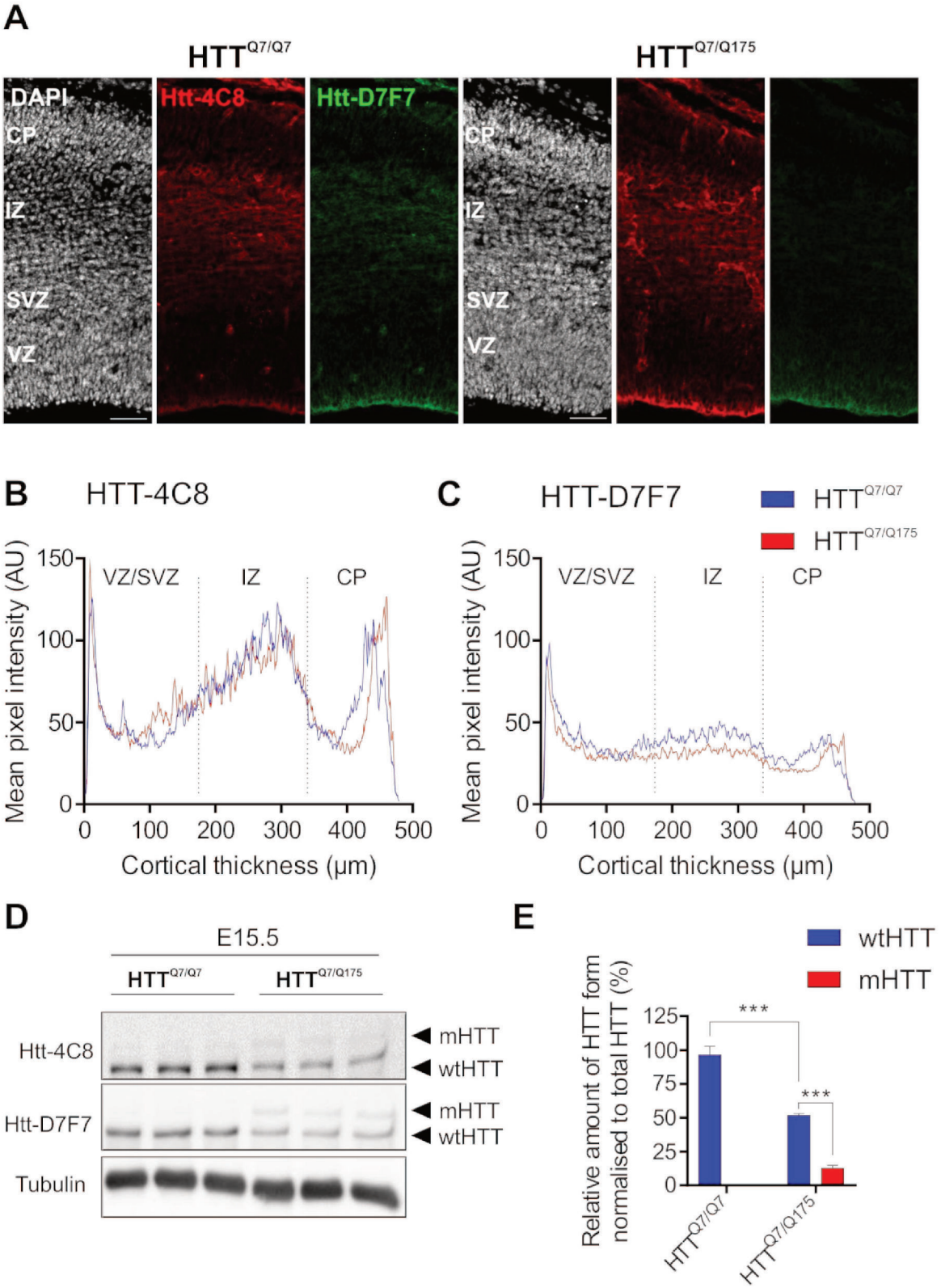

A
HTTQ7/Q7
HTTQ7/Q175
DAPI
Htt-4C8
Htt-D7F7
CP
IZ
SVZ
VZ
B
HTT-4C8
C
HTT-D7F7
HTTQ7/Q7
HTTQ7/Q175
Mean pixel intensity (AU)
VZ/SVZ
IZ
CP
Cortical thickness (µm)
D
E15.5
HTTQ7/Q7
HTTQ7/Q175
Htt-4C8
Htt-D7F7
Tubulin
mHTT
wtHTT
E
wtHTT
mHTT
Relative amount of HTT form normalised to total HTT (%)
***

Figure 1 : Mutation of HTT altered HTT distribution and quantity during corticogenesis

(A) Immunostaining for HTT using 4C8 (red) and D7F7 (green) antibodies on wild-type and mutant E15.5 cortical coronal sections, counterstained with DAPI (VZ, Ventricular Zone; SVZ, Sub-Ventricular Zone; IZ, Intermediate Zone; CP, Cortical Plate). (B) (C) Representative line scan analysis showing HTT distribution using 4C8 and D7F7 (at least 3 brains analysed per condition) (AU, Arbitrary Unit). (D) HTT 4C8, D7F7 and Tubulin immunobloting from E15.5 cortical lysate control and mutant (at least 3 brains analysed per condition). (E) Quantitative assessment of HTT levels detected by immunobloting with D7F7 antibody. All scale bars : 50µm. Two-way ANOVA; errors bars, SEM ; ***p<0,001.

FIGURE 2

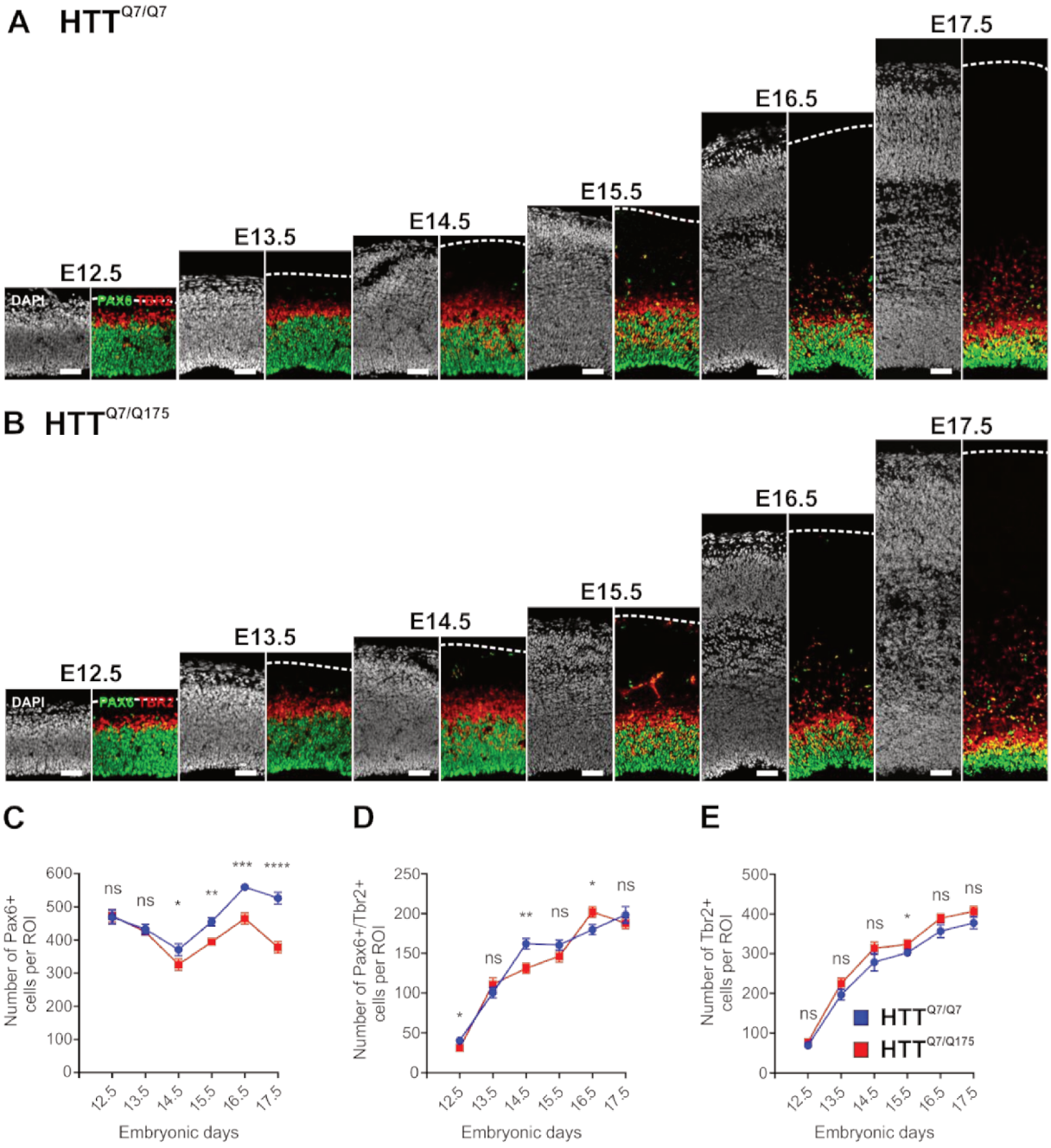


Figure 2 : HTT mutation affects apical progenitors along cortical development
(A) (B) Immunostaining of apical progenitors (PAX6, green) and basal progenitors (TBR2, red) on coronal sections of $HTT^{Q7/Q7}$ and $HTT^{Q7/Q175}$ cortices at indicated embryonic stages. Nuclei were counterstained with DAPI. (C) (D) (E) Quantitative analysis of the number of apical and basal progenitors in $HTT^{Q7/Q7}$ and $HTT^{Q7/Q175}$ cortices at indicated embryonic stages (at least 3 brains per condition and timepoints). All scale bars, 50µm. Student t test ; errors bars, SEM ; ns, non-significant ; *p < 0,05; **p<0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

FIGURE 3

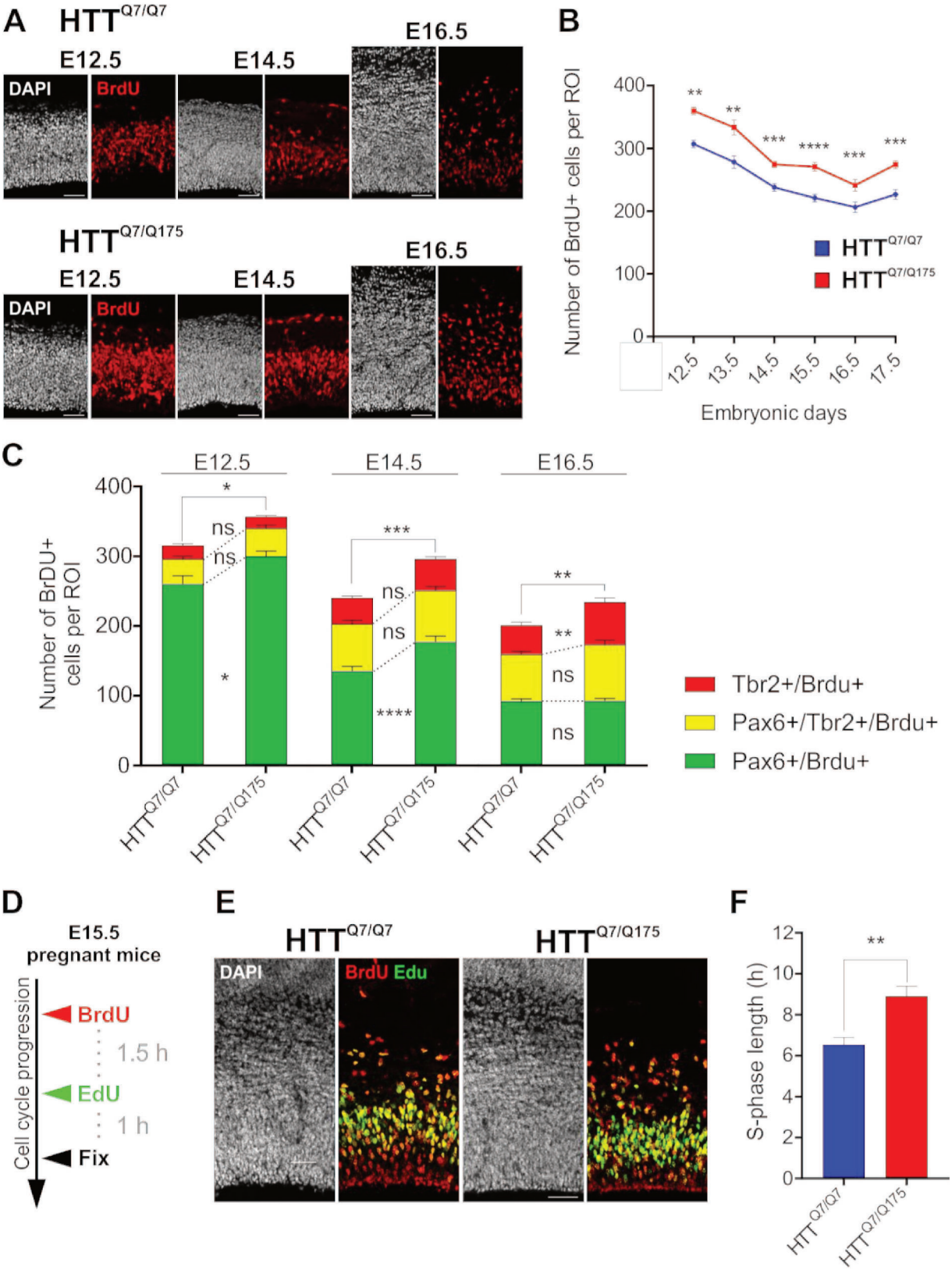

A
HTTQ7/Q7
E12.5
E14.5
E16.5
DAPI
BrdU
HTTQ7/Q175
B
Number of BrdU+ cells per ROI
400
300
200
100
0
**
**
***
****
***
***
HTTQ7/Q7
HTTQ7/Q175
12.5
13.5
14.5
15.5
16.5
17.5
Embryonic days
C
E12.5
E14.5
E16.5
Number of BrDU+ cells per ROI
400
300
200
100
0
*
ns
ns
*
***
ns
ns
****
**
**
ns
ns
HTTQ7/Q7
HTTQ7/Q175
HTTQ7/Q7
HTTQ7/Q175
HTTQ7/Q7
HTTQ7/Q175
Tbr2+/Brdu+
Pax6+/Tbr2+/Brdu+
Pax6+/Brdu+
D
E15.5
pregnant mice
Cell cycle progression
BrdU
1.5 h
EdU
1 h
Fix
E
HTTQ7/Q7
HTTQ7/Q175
DAPI
BrdU Edu
F
S-phase length (h)
12
10
8
6
4
2
0
**
HTTQ7/Q7
HTTQ7/Q175

Figure 3: HTT mutation increases proliferation of progenitors during cortical development.

(A) Coronal section of $HTT^{Q7/Q7}$ and $HTT^{Q7/Q175}$ cortices collected 1h later after Brdu injection in pregnant mice (at indicated embryonic stages) and immunostained for BrdU (red). Nuclei were counterstained with DAPI. (B) Quantitative analysis of the total number of BrdU-positive cells (BrdU+) in $HTT^{Q7/Q7}$ and $HTT^{Q7/Q175}$ cortices at indicated embryonic stages (at least 3 brains per condition and timepoints). (C) Quantification of BdrU-positive apical (PAX6) and basal (TBR2) progenitors at E12.5, E14.5 and E16.5 (at least 3 brains per condition and timepoints). (D) Experimental procedure to assess S-phase length estimation using a double injection of BrdU and EdU on pregnant mice timed at E15.5 (n=3 per conditions). (E) Immunostaining of BrdU (red) and EdU (green) on E15.5 coronal section. (F) Estimation of S-phase length in cycling progenitors at E15.5 (n=3 per condition). All scale bars, 50µm. Student t test; errors bars, SEM; ns, non-significant; *p < 0,05; **p<0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

FIGURE 4

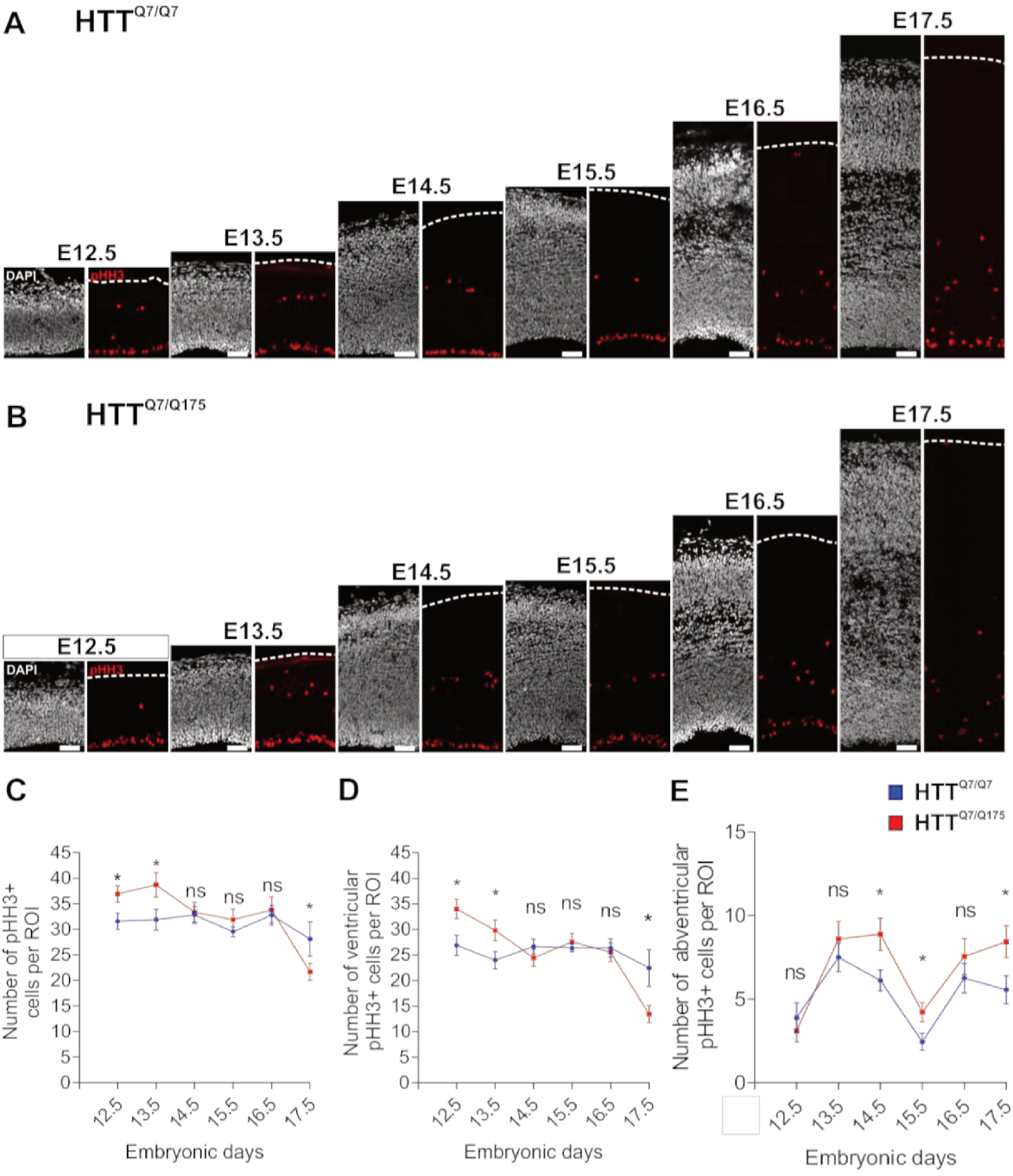


Figure 4 : HTT mutation differentially affects progenitor population mitotic events during cortical development

(A) (B) Immunostaining of mitotic cells (PHH3, red) on coronal sections of $HTT^{Q7/Q7}$ and $HTT^{Q7/Q175}$ cortices at indicated embryonic stages. Nuclei were counterstained with DAPI. (B) (C) (D) (E) Quantitative analysis of total, apical and basal mitotic cells in $HTT^{Q7/Q7}$ and $HTT^{Q7/Q175}$ cortices at indicated embryonic stages (at least 3 brains per condition and timepoints). All scale bars, 50µm. Student t test ; errors bars, SEM ; ns, non-significant ; *p < 0,05.

FIGURE 5

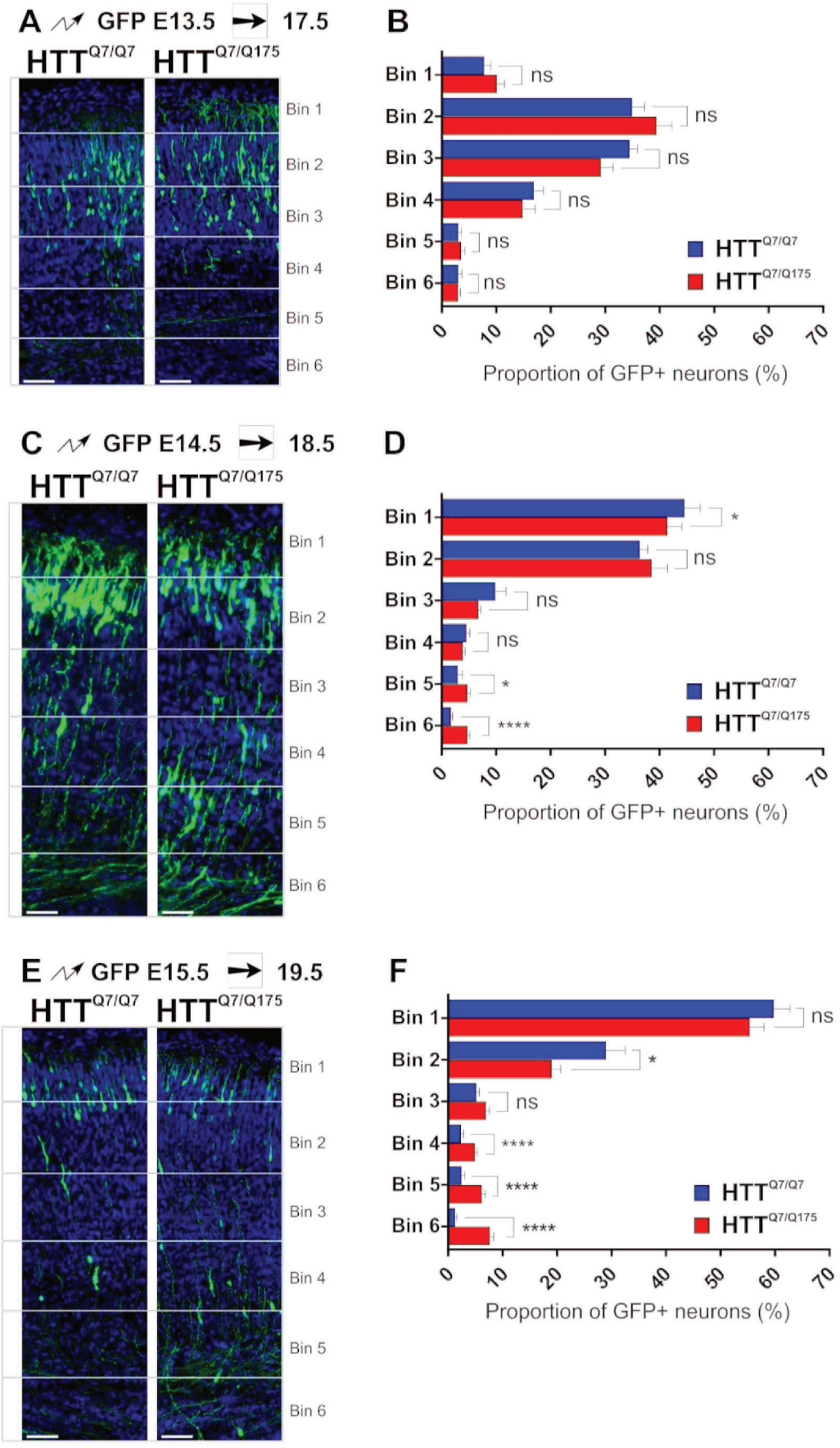

A GFP E13.5 → 17.5
HTTQ7/Q7
HTTQ7/Q175
Bin 1
Bin 2
Bin 3
Bin 4
Bin 5
Bin 6
B
ns
HTTQ7/Q7
HTTQ7/Q175
0 10 20 30 40 50 60 70
Proportion of GFP+ neurons (%)
C GFP E14.5 → 18.5
D
*
****
E GFP E15.5 → 19.5
F

Figure 5 : HTT mutation differentially impaired radial migration of newborn cortical neurons

(A) (C) (E) Coronal section of $HTT^{Q7/Q7}$ and $HTT^{Q7/Q175}$ cortices collected 4 day later after in utero electroporation in pregnant mice (at indicated embryonic stages) to specifically target newborn layer V, IV and II/III neurons. Sections are immunostained for GFP (green). Nuclei were counterstained with DAPI.

(B) (D) (F) Quantitative analysis of GFP-positive (GFP+) neurons distribution across the cortex divided into six equals bin (at least 3 brains per conditions and timepoints).

All scale bars, 50µm. Student t test; errors bars, SEM; ns, non-significant; *p < 0,05; **p<0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

FIGURE 6

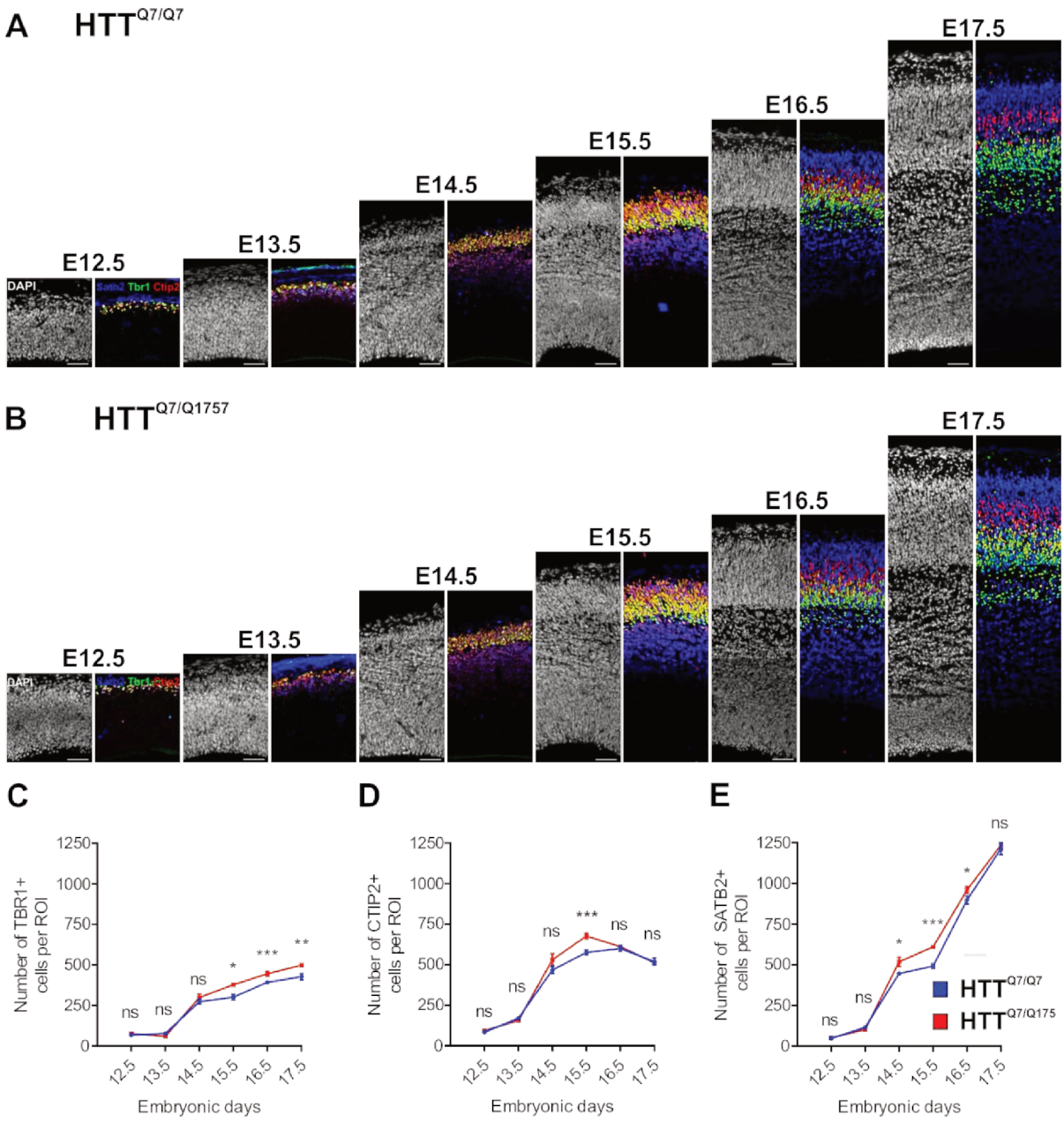


Figure 6 : HTT mutation delays maturation of newborn cortical neurons.
(A) (B) Coronal section of $HTT^{Q7/Q7}$ and $HTT^{Q7/Q175}$ cortices immunostained for TBR1 (green), CTIP2 (red) and SATB2 (blue) markers of layer VI, V and callosal projecting neurons respectively at indicated timepoints. Nuclei were counterstained with DAPI.
(C) (D) (E) Quantitative analysis of TBR1-positive (TBR1+), CTIP2-positive (CTIP2+) and SATB2-positive (SATB2+) neurons at indicated timepoints (at least 3 brains per condition and timepoints).
All scale bars, 50µm. Student t test; errors bars, SEM; ns, non-significant; *p < 0,05; **p<0,01; ***p < 0,001.

FIGURE 7

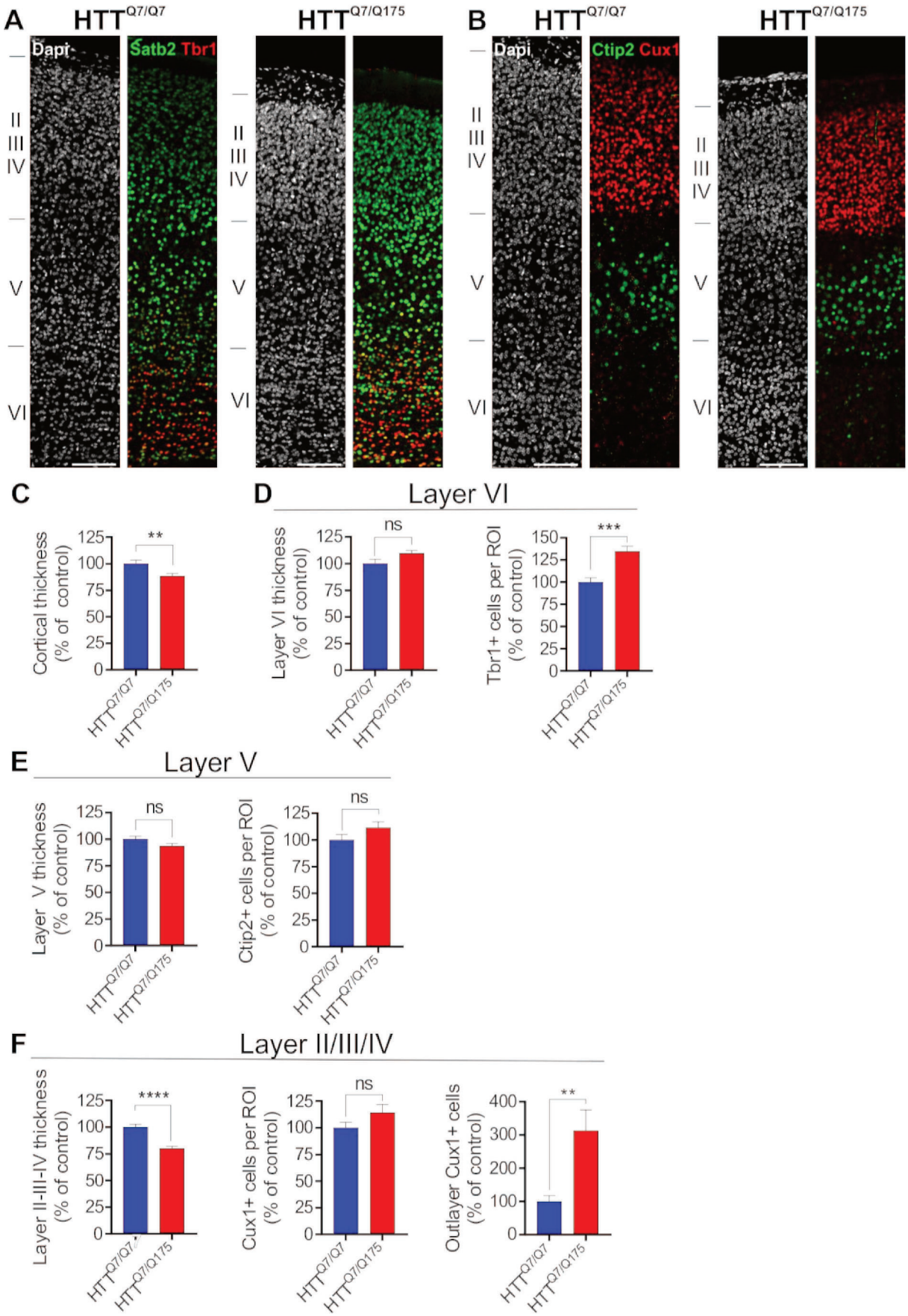

A
HTTQ7/Q7
HTTQ7/Q175
Dapi
Satb2 Tbr1
II
III
IV
V
VI
B
HTTQ7/Q7
HTTQ7/Q175
Dapi
Ctip2 Cux1
C
Cortical thickness (% of control)
**
D
Layer VI
Layer VI thickness (% of control)
ns
Tbr1+ cells per ROI (% of control)
***
E
Layer V
Layer V thickness (% of control)
ns
Ctip2+ cells per ROI (% of control)
ns
F
Layer II/III/IV
Layer II-III-IV thickness (% of control)
****
Cux1+ cells per ROI (% of control)
ns
Outlayer Cux1+ cells (% of control)
**

Figure 7 : HTT mutation differentially affects cortical lamination within cortical layers.

(A) Coronal section of $HTT^{Q7/Q7}$ and $HTT^{Q7/Q175}$ cortices at post-natal day 7 (P7), immunostained for SATB2 (green) and TBR1 (red) markers of callosal projecting neurons and layer VI neurons respectively. Nuclei were counterstained with DAPI. (B) Coronal section of $HTT^{Q7/Q7}$ and $HTT^{Q7/Q175}$ cortices at P7, immunostained for CUX1 (red) and CTIP2 (green) markers of layer II/III/IV and V neurons respectively. Nuclei were counterstained with DAPI. (C) Quantitative analysis of cortical plate thickness (at least 5 brains per conditions) (D) (E) (F) Quantitative analysis of layer thickness and number of TBR1-positive (TBR1+)cells, CTIP2-positive (CTIP2+) cells and CUX1-positive (CUX1+) cells within cortices and quantative analysis of CUX1 outlayer neurons (at least 5 per condition). All scale bars, 100µm. Student t test; errors bars, SEM; ns, non-significant; *p < 0,05; **p<0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001.

FIGURE 8

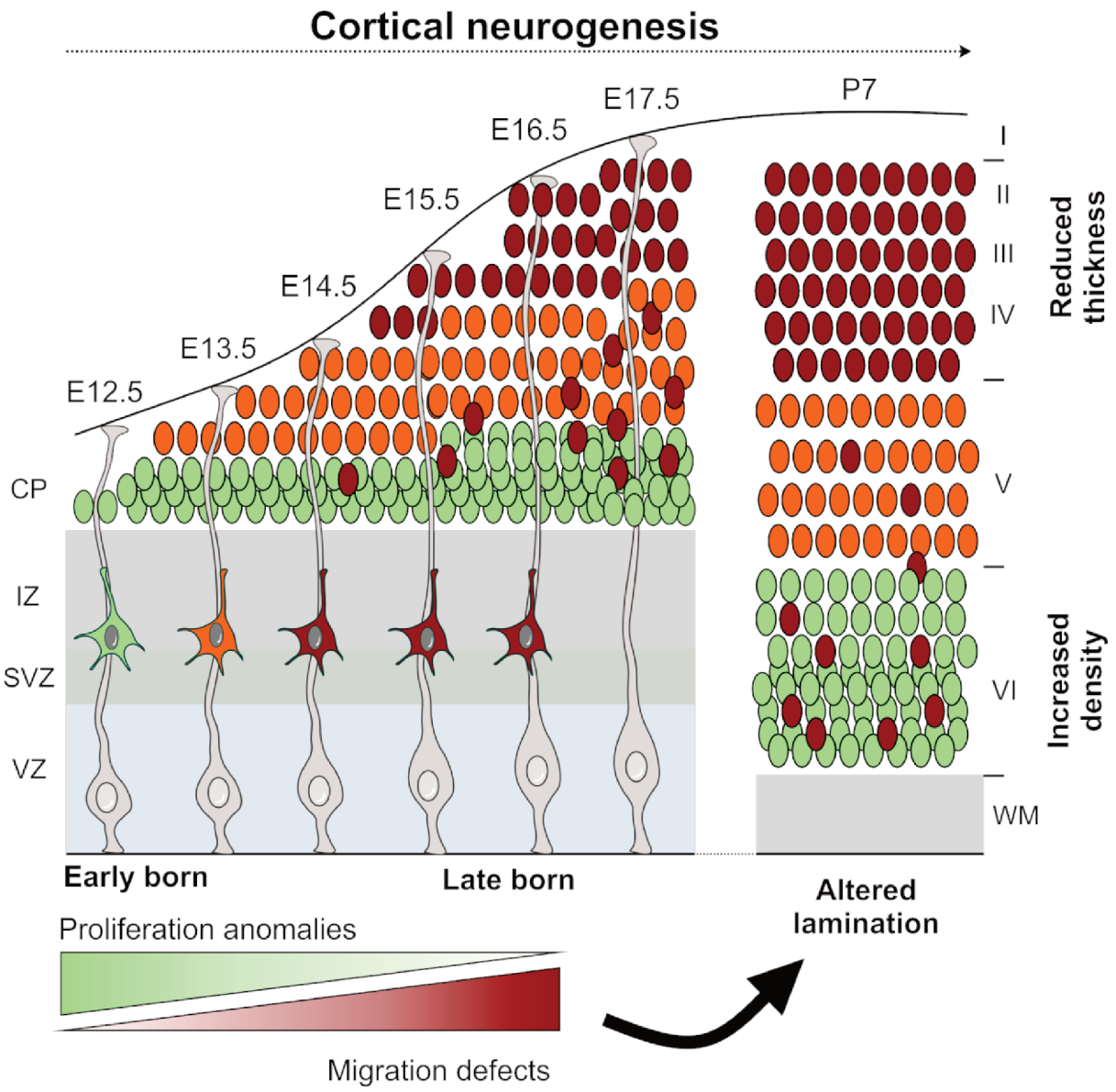


Figure 8 : Mutation of HTT differentially impact cortical neurons generation, maturation and migration leading to an aberrant cortical lamination.

$HTT^{Q7/Q175}$ mice displayed differential defects along cortical neurogenesis. Early stages E12.5 and E13.5 showed an increased level of neurogenic division leading to progenitor pool exhaustion. Later born neurons (E14.5 and E15.5) were mostly impacted during their radial migration. Altogether, cortical neurogenesis defects mediated by mHTT lead to abnormal cortical lamination with a reduced cortical thickness, a reduced layer II/III/IV thickness, ectopic upper-layer neurons in deep-layers and an increased number of layer VI neurons.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mice and genotyping

All experiments were performed in accordance with local animal welfare committee (Comité Local Grenoble Institute Neurosciences, C2EA-04) and EU guidelines (directive 2010/63/EU). Precautions were taken to minimize stress and the number of animals used in each series of experiments.

To study HTT mutation at heterozygous state, B6J.129S1-Htt^{tm1Mfc}/190ChdiJ (Menalled et al., 2003, Jackson Lab stock 027410) also known as B6J.zQ175 Knock-in (KI) heterozygous mouse were back-crossed into C57BL/6NRj congenic background (Janvier Lab) to generate B6N.zQ175 KI male. Heterozygous B6N.zQ175 KI male generated were mated with wild-type C57BL/6NRj (Janvier Lab) to generate littermate controls (HTT$^{Q7/Q7}$) and heterozygous individuals (HTT$^{Q7/Q175}$).

We systematically used littermate individuals for analysis. Genotyping of individual mouse was performed by isolating DNA from a biopsy for embryos (E12.5 to E17.5) or tail at postnatal stages (P7 and P21), and PCR amplification was performed using the following primers to detect knocked-in CAG expansion: *HTT* forward (CTG CAC CGA CCG TGA GTC C) and *HTT* reverse (GAA GGC ACT GGA GTC GTG AC).

DNA Constructs and In Utero Electroporation

Plasmids DNA were prepared using a Plasmid Endofree Maxi Kit (QIAGEN). pCAG-GFP (plasmid 11150) was purchased from Addgene. Timed-pregnant between E13.5 to 15.5 mice were anesthetized with isoflurane in oxygen carrier. Uterine horns were carried out through a median laparotomy. Plasmid solutions containing 1.5 µg/µL of DNA, mixed with 0.05% Fast Green, were injected into the lateral ventricles of the embryos using a heat-pulled capillary and a Femtojet microinjector (VWR International). Electroporation (five pulses of 35 V for 50 ms with an interval of 950 ms) was performed using 5 mm platinum tweezers electrodes (CUY650P5, Sonidel) connected to a NEPA21 electroporator (NepaGene).

Proliferation, Survival and S-phase length experiments

For proliferation and survival, 5-bromo-2′-deoxyuridine (BrdU) assay timed-pregnant between E12.5 to 17.5 mice were intraperitoneally injected with 100mg/kg of BrdU (Sigma), brains were dissected 1h later for proliferation at embryonic stage and

postnatal brains (P7 and P21) as previously described. For Brdu/Edu S-phase length assay intraperitoneal injection of 100mg/kg Brdu (Sigma) was followed 1.5 h later by 50 mg/kg 5-ethynyl-2′-deoxyuridine (EdU) injection and mice euthanatized 1 h later. S-phase length was estimated using the following formula :

$$S\ phase\ length = 1.5\frac{(\mathrm{BrdU+})}{(\mathrm{BrdU+}) - (\mathrm{EdU+})}$$

Tissue Processing

Embryonic brains were dissected in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) and fixed with with Antigenfix (Diapath) at 4°C overnight. For postnatal brains, animals were deeply anesthetized on ice (P7 animals) or by Dolethal (Centravet) intraperitoneal injection (P21 animals). Animals were perfused transcardially with Antigenfix (Diapath). Brains were dissected and post-fixed during 3 hours in Antigenfix (Diapath). Fixed samples were cryoprotected overnight in 20% sucrose (Euromedex) in PBS at 4°C, embedded in OCT Compound (VWR International), cryosectioned sagittaly or coronaly (20-35 µm), and placed onto slides for analyses (SuperFrost-plus, Thermoscientific).

Immunohistochemistry

Samples were washed with PBS-Triton (0.3%; PBST). All samples were treated with citrate buffer pH6 antigen retriever 1X (Sigma) 10 min at 95°C in vapour cooker (Seb) and washed in PBST. Brdu assay slides were additionally treated with 4.75% HCl PBS for 20 min at room temperature and washed in PBST. All slides were blocked at room temperature for 2h in PBST containing 5% Bovine Serum Albumin (BSA, Euromedex) before incubation with primary antibodies diluted BSA 1% PBST. All primary antibodies were incubated overnight at 4°C. The following primary antibodies were used: anti-HTT 4C8 (1:400; rabbit, Euromedex), anti-HTT D7F7 (1:400:rabbit, Ozyme), anti-CDP (Cux1,1:500, rabbit, Santa Cruz), anti-Tbr1 (1:500, rabbit, Abcam), anti-Tbr2 (1:500, rat, Fisher Scientific), anti-BrdU (1:100, mouse, BD Biosciences), anti-GFP (1:500, chicken, Merck Millipore), anti-Satb2 (1:500, mouse, Abcam) anti-Ctip2 (1:500, rat, Abcam), anti-phospho-Histone-H3 (1:500, mouse, Ozyme) and anti-Pax6 (1:300, rabbit, Eurogentec). After several 3 rinses in BSA 1% PBST, tissues were incubated with adapted AlexaFluor-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes,Thermo Fisher Scientific) for 2 h at room temperature. After several rinses in BSA 1% PBST,

nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (1:4000, Invitrogen) and samples were mounted in fluorescent mounting medium (Dako). EdU-labeled cells were visualized following a 15-min click reaction (5% Tris 2 M pH 7, 80.9% H2O, 4% CuSO4 100 mM, 0.1% Cyanine 3 Azide 1 mM, 10% Ascorbic acid 1 M).

Preparation of brain extracts and immunoblotting

Developing cortices (E13.5 and E15.5) were dissected in PBS at 4°C and were lysed in NP40 buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 1 mM Na3VO4, 1% Nonidet P40 (NP40), 0.02% NaN3), containing protease inhibitor cocktail (Sigma). Lysates were centrifuged at 11,000 x g for 10 min at 4°C. Samples were then heated at 95°C for 5 min before loading on a SDS-polyacrylamide gel. After transfer onto nitrocellulose membranes, membranes were blocked with 5% BSA 0.1% Tween-X100 Tris-buffered saline (TBST) and incubated with primary antibodies (1:1000) in 5% BSA TBST at 4°C overnight. After thorough washing, membranes were incubated with secondary IgG-HRP antibodies corresponding to primary antibody.

Image Analyses

Confocal images were acquired using an inverted confocal microscopy (LSM710, Zeiss) with 20x 0.8 NA objective (Zeiss) and analysed using NIH ImageJ (PC version: http://rsbweb. nih.gov/ij/). Nearly identical areas in the presumptive somatosensory and visual cortex of anatomically matched brain sections were chosen for analyses. For cell absolute quantification analyses, cells were counted in ImageJ in 200 µm large area containing apical to pial surfaces. For binned analyses, the cortex was divided into six equal bins and all GFP+ or BrdU+ neurons in each bin were counted. For mitotic event analysis, PHH3+ cells were counted as abventricular division if the distance from the ventricular surface was higher than 100µm.

Data Analysis

GraphPad Prism 7.0 software was used for statistical analyses. All results were expressed as mean ± SEM and statistical significance was assessed using a two-tailed test with 0.05 statistical threshold. Normality of distribution was assessed using Shapiro-Wilk test and standard deviation with Fisher test. Mean comparison were assessed with Student's t test, Mann-Whitney or one-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparisons test, depending of experiment parameters.

1. Huntingtine et neurogenèse corticale

La Huntingtine est exprimée tout au long du développement cérébral et son expression augmente progressivement au cours de la neurogenèse corticale et de la maturation post-natale (Bhide 1996). Certains de ses rôles ont été élucidés, notamment lors de la division des progéniteurs apicaux (Godin 2010, Molina-Calavita 2014) et son rôle dans la migration neuronale a été spéculé (Tong 2011). Mes travaux ont permis de montrer que (i) la mutation de la HTT à l'état hétérozygote altère le développement cortical de façon différente entre les stades précoces et tardifs en conduisant à une lamination aberrante (Le Friec en préparation) et (ii) le rôle de la HTT dans les neurones post-mitotiques au cours de leur migration radiale et de leur maturation dendritique (Barnat 2017). Cependant, la plupart de ses fonctions aux cours du développement cortical restent méconnues. En effet, la HTT est une protéine d'échafaudage qui pourrait, de par ses interactions moléculaires, participer à de nombreux processus cellulaires au cours de développement cortical (Saudou & Humbert 2016, figure 36).

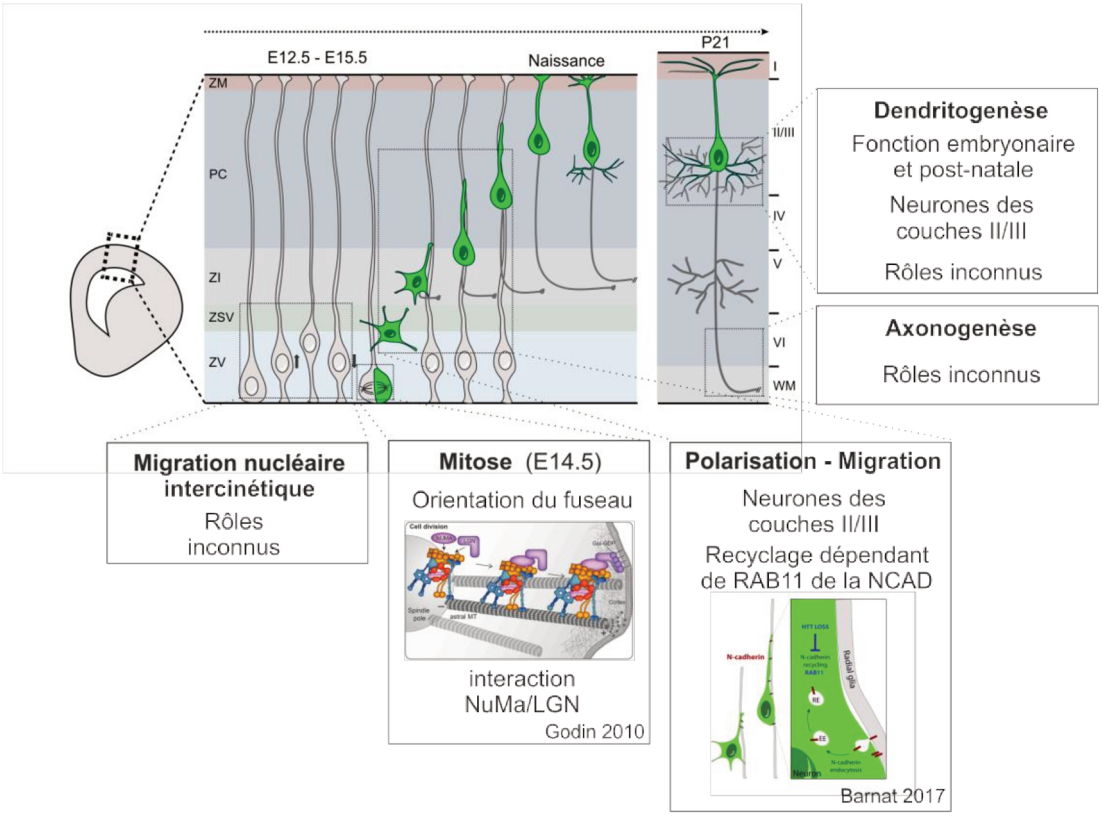


Figure 36 : Rôles identifiés de la HTT au cours du développement cortical embryonnaire et post-natal

1.1. Polarité apico-basale des progéniteurs neuronaux

La HTT est requise pour la formation du tissu neuroépithélial. Les approches utilisant des morpholinos dirigés contre la HTT induisent de sévères défauts d'adhésion cellulaire. Ceci conduit à une distribution anormale des jonctions NCAD et des jonctions serrées ZO1 (Lo Sardo 2012). Dans des tissus non-neuronaux, la HTT contribue au maintien de la polarité apico-basale dans l'épithélium mammaire en régulant le transport du complexe PAR dépendant de RAB11 (Elias 2015). La HTT est en effet requise pour la localisation apicale de PAR3 et APKC. Cette localisation apicale est régulée par le transport du complexe par la kinésine Kif5b le long des microtubules auquel contribue la HTT (McGuire 2006, Elias 2015). Dans ce processus, la HTT interagit avec RAB11 et facilite le transport vésiculaire apical de PAR3 et APKC (Elias 2015). Même si ce mécanisme n'a jamais été mis en évidence au cours de la neurogenèse corticale, il est probable que la perte de HTT et sa mutation contribuent à altérer le transport baso-latéral des jonctions adhérentes et du complexe PAR3/APKC dans le contexte développemental. Dans les RGs, PAR3 co-localise avec la NCAD, la β-caténine et ZO-1 (Bultje 2009). PAR3/APKC sont répartis asymétriquement lors des divisions neurogéniques favorisant la délamination de la cellule (Marthiens & ffrench-Constant 2009). La localisation de la HTT et mHTT enrichies à la membrane apicale et basolatérale, au cours de la neurogenèse renforce l'idée d'un potentiel rôle de la HTT dans le maintien de la polarité apico-basal au cours de la neurogenèse. Les phénotypes observés dans le modèle *Nestin-Cre:Hdh*$^{Flox/Flox}$ et *HdhQ111* semble favoriser l'hypothèse de défauts de polarité des RG au vu de l'augmentation du nombre de divisions asymétriques (Godin 2010, Molina-Calavita 2014). Cet aspect mérite donc d'être étudié plus en détails. Ce qui pourrait dans un premier temps être effectué par une analyse immunohistochimique des principaux acteurs PAR3, APKC, ZO1 et NCAD au cours du développement dans le modèle zQ175.

1.2. Orientation du fuseau

La HTT est exprimée dans les cellules en division et se localise aux pôles du fuseau mitotique et sur les microtubules astraux. Au cours de la mitose, la HTT, via son interaction avec la dynéine, est localisée aux pôles du fuseau où elle favorise l'accumulation de NuMa et LGN (Godin 2010). Ce mécanisme semble être un mécanisme commun à certains tissus puisqu'il est également observé pendant le développement de la glande mammaire (Elias 2014). Au cours de la neurogenèse corticale, l'orientation du fuseau est un processus finement régulé dans lequel la perte et la mutation de la HTT conduit à des défauts de neurogenèse. Ce phénotype a été observé au stade embryonnaire E14.5, c'est-à-dire pendant la génération des neurones de la couche IV. Or, d'après le modèle dans lequel les progéniteurs progressent de façon dynamique et séquentielle dans différents états transcriptionnels tout au long du

développement cortical (Telley 2019), il serait intéressant : (i) d'analyser l'expression de la HTT dans les progéniteurs aux différents stade de développement ainsi que les conséquences de la mutation sur son expression dans les zQ175 hétérozygotes (par western-blot, immunohistochimie et quantification cellule-spécifique dans les progéniteurs) et (ii) d'étudier l'orientation du fuseau mitotique afin de voir si l'orientation du fuseau évolue au cours de la neurogenèse corticale en condition mutée et (iii) de déterminer si la HTT exerce ses fonctions via les mêmes partenaires moléculaires ou non. L'hypothèse de fonctions différentielles de la HTT pendant le déroulement de la neurogenèse est soutenu par mes résultats montrant que la mutation a un effet distinct sur le nombre de progéniteurs apicaux (exprimant Pax6) et leur différenciation en progéniteurs basaux (exprimant Tbr2) en fonction des stades de développement (Figure 2, Article 2). Il serait intéressant de compléter ces résultats en les combinant avec la technique d'électroporation *in utero*, qui serait réalisée à tous les stades de développement (de E12.5 à E17.5) afin de mieux caractériser l'impact de la mutation de la HTT sur le destin cellulaire d'une population ciblée de progéniteurs.

La petite GTPase RAB11 est impliquée dans l'assemblage et l'orientation du fuseau mitotique *in vitro* (Hehnly 2014). Les auteurs montrent que RAB11 et la dynéine coordonnent l'assemblage du fuseau via le transport des endosomes recyclés et l'inactivation de RAB11 induit une augmentation de divisions asymétriques *in vitro* sur des lignées Hela et d'ostéosarcome humaine U20S (Hehnly 2014). Le mécanisme proposé est que RAB11 apporte, via le transport vésiculaire, les éléments favorisant la nucléation des microtubules. De plus, Il est désormais établi que la HTT est nécessaire à l'activité de RAB11 (Li 2008, Elias 2014, Barnat 2017). Cependant, aucun défaut apparent dans la nucléation des centrosomes n'a été observé dans les modèles de perte de fonction et mutant *in vitro* et *in vivo* au stade E14.5 (Godin 2010, Elias 2014, Molina-Calavita 2014). Il est possible que cette fonction de la HTT se révèle à d'autres stades embryonnaire et/ou que la HTT assure le recyclage RAB11-dépendant d'autres cargos comme la N-Cadhérine, comme nous l'avons montré (Barnat 2017) ou ligand de Notch, DLL1 (Emery 2005).

1.3. Cycle cellulaire et migration inter-cinétique

Les progéniteurs neuronaux ont la particularité de subir une migration inter-cinétique de leur noyau en coordination avec les phases du cycle cellulaire (Fousse 2019): les mitoses ont lieu à la surface du ventricule et la phase de synthèse dans la partie basale de la zone ventriculaire (Miyata 2004). Il est connu que la durée des phases du cycle module le devenir cellulaire des progéniteurs neuronaux. Un cycle cellulaire court favorise ainsi la prolifération en limitant l'exposition de la cellule aux facteurs de différenciation en particulier lors des phases G1/S (Del Bene 2008, 2010, Arai 2011). Au contraire, un cycle long favorise la différenciation

(Calegari 2005). De plus, ces mêmes travaux associent la prolifération à l'allongement de la phase S favorisant la fidélité de réplication de l'ADN et évitant une différenciation trop rapide (Aray 2011). L'injection de BrdU entre E12.5 et E17.5 dans le modèle zQ175 a révélé une élévation du nombre de cellules BrdU-positives notamment entre E12.5 et E14.5. (Le Friec en préparation). Ces données, ajoutées aux anomalies d'index mitotiques observées pendant les phases précoces -E12.5 et E13.5- suggèrent que la mutation de la HTT intervient dans la régulation du cycle cellulaire des progéniteurs apicaux. Au niveau moléculaire, certains mécanismes, auxquels la HTT contribue, pourraient contribuer à la modification de la dynamique du cycle cellulaire observé dans les zQ175, notamment l'assemblage et le désassemblage du cil primaire (Keryer 2011). En effet, l'accumulation de la HTT à la surface apicale correspond à la localisation du cil primaire des progéniteurs apicaux au cours de la neurogenèse corticale (Le Friec en préparation). La HTT est localisée à la base des cils primaires des neurones, des photorécepteurs ciliés et des cellules multi-ciliées (Haremaki 2015, Karam 2015, Keryer 2011). Elle est particulièrement abondante dans l'axonème, la structure centrale du cil primaire (Karam 2015). L'inactivation de la HTT chez la souris conduit à une atrophie du cil dans les neurones murins et une réduction de la cilliogenèse a été observée par des approches utilisant des morpholinos dans le modèle xénope (Haremaki 2015, Keryer 2011). De façon intéressante, l'analyse du cil dans un modèle génétique homozygote $HdH^{Q111/Q111}$ a montré un effet inverse caractérisé par une hypertrophie ciliaire des cellules épendymaires (Keryer 2011). Dans le cil primaire, la HTT interagit avec HAP-1 et PCM1 (pour *pericentriolar material 1*) où elle permet le transport rétrograde de PCM1 (Haremaki 2015, Keryer 2011). Ce transport est assuré par la formation du complexe HAP-1/Dyneine/Dynactine (Keryer 2011).

Au cours de la corticogenèse, le rôle de la HTT et l'effet de sa mutation sur la dynamique du cil primaire restent méconnus. Pourtant, le cil primaire joue un rôle prépondérant dans plusieurs étapes du développement, notamment lors de la prolifération et de la différenciation des progéniteurs neuronaux. Les anomalies de formation et de fonction du cil primaire sont associées à plusieurs pathologies développementales regroupant les ciliopathies (Noris 2012), l'holoproencéphalie (Gorivodsky 2009, Goetz 2012) et hydrocéphalie (Banisz 2005, Carter 2012). L'altération de la formation du cil peut en effet modifier l'exposition des progéniteurs aux morphogènes, et ainsi conduire à une dynamique neurogénique différente, ce qui aura des conséquences sur la future architecture du cortex (Guemez-Gamboa 2014, Lepanto 2016). En effet, les dysfonctionnements du cil induisent différents types d'aberrations du développement cortical incluant la réduction du volume cortical et l'altération de son organisation, similaires à ceux observés dans les modèles de perte de fonction et de knock-in (Godin 2010, Molina-Calavita 2014). Il me parait donc d'intérêt d'étudier plus en détails l'effet

de la mutation au cours de la corticogenèse sur ces aspects. Ceci pourrait être adressé en observant l'état du cil primaire au cours de la neurogenèse corticale. Une approche d'immunohistochimie ciblant Arl13B marqueurs du cil permettrait de mesurer sa longueur et sa position et d'identifier d'éventuelles anomalies.

J'ai observé une neurogenèse précoce des neurones de la couche VI TBR1-positifs corrélée à une augmentation des mitoses apicales à E12.5 (Le Friec en préparation). Dans un premier temps, il faudrait clairement établir le lien entre cette augmentation des mitoses et l'identité cellulaire des cellules générées afin de les lier éventuellement à l'augmentation en neurones TBR1. Ceci pourrait être fait par une approche cumulant éléctroporation in utero et injection de BrdU afin de pouvoir tracer les cellules ayant incorporé le BrdU dans les stades précoces. Cette augmentation de mitose associée à l'augmentation de neurones TBR1-positif suggère que dans les phases précoces de la neurogenèse corticale la mutation à l'état hétérozygote induit la génération précoce de neurones. On pourrait supposer que dans ce processus la HTT est en compétition avec la HTT mutée, contribuant à désorienter le fuseau selon un mode dominant négatif.

De plus, l'augmentation précoce du nombre de mitose et de progéniteurs en phase S suggère un dérèglement du cycle cellulaire et da la migration nucléaire intercinétique (Le Friec en préparation). La HTT par son interaction avec les différents moteurs moléculaires pourrait également altérer la migration nucléaire inter-cinétique et le cycle cellulaire. Kif1a, la kinésine contribuant à la migration basale, interagit avec la HTT et son interaction avec HAP-1 est prédite par homologie de séquence (Shirasaki 2012, Lumsden 2016). La dynéine et la dynactine, qui contribuent à la migration apicale, sont elles aussi en interaction avec la HTT (Caviston 2011). La migration du noyau pourrait donc être altérée par un recrutement altéré des moteurs moléculaires favorisant les défauts de prolifération et de mitoses observés dans notre étude (Le Friec en préparation). Ceci pourrait être adressé par une approche d'électroporation in utero afin d'exprimer une protéine GFP dans les progéniteurs. Cette méthode permettrait de mesurer la durée du cycle et les éventuelles interactions de la HTT au cours de la migration nucléaire inter-cinétique. Enfin, un défaut de la réparation de l'ADN pourrait également être une cause la modulation de la phase S (Arai 2011). En effet, la mutation de la HTT pourrait modifier la fonction du facteur de transcription REST. Ce dernier a récemment été identifié pour son rôle favorisant la réparation de l'ADN au cours de la réplication des progéniteurs neuronaux (Nechipuruk 2016). Son inactivation au cours du développement du cortex embryonnaire conduit à une modulation de la phase S et des dommages à l'ADN (Nechipuruk 2016). La localisation de REST est régulée par la HTT qui coordonne son trafic en direction du noyau via le complexe dynéine/dynactine (Shimojo 2008).

Un défaut d'importation de REST pendant la phase de synthèse pourrait donc être modifier la durée de la phase S, ce qui reste à démontrer dans le contexte de la MH.

1.4. Impact différentiel de la mutation de la HTT au cours du développement cortical

Comme il a été mentionné, les progéniteurs corticaux présentent une signature transcriptionnelle dynamique tout au long du développement (Telley, 2019) et nous avons mis en évidence des phénotypes différents en fonction des stades développement embryonnaire analysés (Le Friec en préparation). Le programme transcriptionnel à un stade donné pourrait moduler l'expression de la HTT et de mHTT, ce qui pourrait accentuer ou atténuer les effets de la mutation. En plus de ces facteurs intrinsèques, l'évolution de la composition du liquide céphalorachidien (Chau 2015) pourrait moduler l'activité de différentes voies de signalisation dans lesquelles la HTT est impliquée. Par exemple, les voies induisant l'activation de CDK5, AKT ou GSK3β pourraient contribuer à des états de phosphorylations différentielles de la HTT et mHTT entre les stades précoces et tardifs de la neurogenèse (Saudou & Humbert 2016). Afin de tester ces hypothèses, il existe des modèles animaux phospho-mimétique et non-phosphorylable permettant de tester l'activité de la HTT et de la mHTT dans différentes fonctions cellulaires au cours du développement (Ben M'Barek 2013; Thion 2015). L'utilisation de ces modèles couplés à une étude systématique – E12.5 à E17.5 – permettrait d'identifier si des phosphorylations de la HTT participent aux processus de la corticogenèse.

Une autre explication est que la mutation de la HTT influence les signatures transcriptionnelles à un stade spécifique. En effet, le complexe PRC2 contribue aux transitions transcriptionnelles opérant dans les progéniteurs et se définit donc comme est un régulateur du programme transcriptionnel des progéniteurs corticaux (Telley 2018). Cette fonction de PRC2 au cours de la neurogenèse corticale est intéressante car son activité est régulée par la HTT. En effet, la HTT interagit avec deux sous-unités de PRC2 (Seong 2010, Shirasaki 2010). La HTT est nécessaire à l'activité de PRC2 pendant le développement et la HTT mutante contribue à une hyper-méthylation des histones 3 (H3K27me) conduisant à une répression de la transcription, tandis que la H3K4me3 favorisant la transcription inhibe l'activité de PRC2 (Seong 2010, Schmitges 2011). Ces méthylations régulant l'expression de gènes au cours de la neurogenèse (Wang 2016), la mutation de la HTT pourrait contribuer à déréguler les états transcriptionnels nécessaire au bon déroulement du devenir cellulaire. En bon accord avec cette hypothèse, dans les modèles iPSC issus de patients MH, la méthylation des histones est altérée pour des gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire, la différenciation (NeuroD1, HES) et la migration (Rap1) (The HD iPSC consortium 2017). La neurogenèse précoce des neurones de la couches VI et le délai de maturation des neurones post-mitotiques observé

dans le modèle zQ175 pourraient donc être dus aux fonctions régulatrices de PRC2 de la HTT (Le Friec en préparation). En parallèle, la HTT facilite le transport du facteur de transcription répresseur REST vers le noyau (Shimojo 2008). La HTT interagit aussi à NeuroD1 via HAP1 et contribue à son activation (Marcora 2003) ainsi qu'à SP1 et TAFII130 qui régulent l'activité transcriptionnelle des gènes (Dunah 2002). Ces interactions sont d'autant de possibilités par lesquelles la mutation de la HTT pourrait contribuer à un délai de maturation et de l'acquisition du sous-type des neurones corticaux (Le Friec en préparation). Ces fonctions n'ont par ailleurs jamais été étudiées dans le contexte du développement cortical embryonnaire *in vivo*.

Des études approfondies sont donc nécessaires pour déterminer si la HTT, via son rôle dans l'expression génique, est impliquée dans le devenir des progéniteurs à chaque stade développemental.

2. Huntingtine dans les neurones post-mitotiques

2.1. Migration radiale

La migration dans un modèle génétique intégré zQ175 à l'état hétérozygote présente aussi des défauts pour les neurones des couches superficielles II/III/IV (Le Friec en préparation) ce qui indique que la mutation à l'état hétérozygote est suffisante à l'induction d'une migration déficiente. De cette observation, nous pouvons spéculer que les fonctions de la HTT normale sont altérées par la présence de mHTT. Ces défauts pourraient être causés ici encore par un effet de compétition entre HTT et mHTT.

En 2011, Tong et coll. ont révélé un rôle de la HTT lors de la migration des neurones corticaux au cours des stades précoce. Dans cette étude, les auteurs utilisent une approche par shRNA pour décrire des défauts de migration neuronale mais sans en élucider les mécanismes (Tong 2011). Nous avons montré que dans les neurones post-mitotiques l'inactivation de la HTT conduit à un défaut de migration des neurones des couches II/III/IV et ce de façon cellule-autonome. La HTT mutée n'est pas en mesure de restaurer le défaut de migration induit par l'inactivation de la HTT (Barnat 2017) montrant que dans ce contexte, la mutation de la HTT agit comme une perte de fonction. Le défaut de migration s'explique par une transition multipolaire-bipolaire altérée et des défauts du maintien de la polarité neuronale lors de sa migration mécanisme sous-jacent est un recyclage de la NCAD dépendant de RAB11 (Barnat 2017). Par sa fonction de protéine d'échafaudage, la HTT pourrait contribuer à la migration via d'autres partenaires moléculaires. En régulant, l'activité des moteurs moléculaire, la HTT pourrait être en capacité de contribuer au couplage de noyau et du centrosome lors de la migration par locomotion (Gauthier 2004, Zala 2008). Il serait également intéressant d'analyser l'appareil de Golgi lors de ces processus. En effet, lors de la transition multipolaire-bipolaire,

la relocalisation basale de l'appareil de Golgi est nécessaire à l'initiation de la migration. La HTT est interagit avec les vésicules golgiennes et l'inactivation et la mutation de la HTT perturbent le réassemblage de l'appareil de golgi (Pardo 2010). Il est donc probable que la fonction de la HTT et la dysfonction de la mHTT dans ce processus contribuent au défaut de transition multipolaire-bipolaire.

Le rôle de la HTT dans le trafic intracellulaire est lui aussi susceptible d'altérer la distribution de plusieurs cargos. Par exemple, la jonction communicante connexine-43 (Cx43), interacteur de la HTT (Vis 1996, Shirasaki 2012) favorise l'expression de p27 (Liu 2012). Cx43 initie aussi l'adhésion du neurone post-mitotique à la glie radiaire (Elias 2007). Son recyclage membranaire est dépendant de RAB11 (Liu 2012). Le transport de Cx43, dont l'adressage membranaire au cours de la transition multipolaire-bipolaire et de la migration est essentielle, pourrait être altéré en condition pathologique.

2.2. dendritogenèse

La HTT a été mise en cause dans le processus de dendritogenèse dans un modèle *in vivo* de perte de fonction *Emx:Cre/HdH*$^{flox/flox}$ et dans le modèle MH zQ175 hétérozygote dans les neurones des couches II/III et V (McKinstry 2014). Dans notre modèle *Nex:Cre/HdH*$^{flox/flox}$, les neurones post-mitotiques dépourvus de HTT présentent une arborisation dendritique hypotrophiée. De plus, l'inactivation par électroporation *in utero* révèle que la HTT est un facteur intrinsèque nécessaire à la migration et la dendritogenèse neuronales. L'inactivation à E15.5 nous indique que le retard de migration conduit de lui-même à une dendritogenèse défectueuse. L'inactivation périnatale de la HTT conduit quant à elle à une hypotrophie de l'arborisation dendritrique amoindrie, ceci suggère que la HTT a un rôle propre au mécanisme de dendritogenèse en dépit du défaut de migration (Barnat 2017).

L'expression de RAB11 est en mesure de restaurer en partie l'arborisation dendritique après inactivation de la HTT (Barnat 2017). RAB11 est impliqué dans la régulation de l'arborisation dendritique. Il permet l'adressage du récepteur du BDNF TrkB à la dendrite et favorise la dendritogenèse dans les neurones hippocampaux (Richards 2011). La signalisation du BDNF est un facteur clé lors de la dendritogenèse des neurones corticaux en agissant sur l'activité de la LIMK (Ravindran 2019). L'interaction RAB11-HTT pourrait donc être impliquée dans la morphogénèse dendritique. Cependant, à ce jour peu de cargos transportés par des vésicules dont la dynamique est dépendante de RAB11 ont été identifiés. Par ailleurs, la HTT régule l'expression du BDNF dans le cortex cérébral (Zuccato 2001, Cattaneo 2005). Dans le cas du cortex, il existe une sécrétion autocrine du BDNF qui favorise la dendritogenèse (Horch 2004, Ravindran 2019). L'association d'une sécrétion réduite de BDNF et d'un trafic anormal de son

récepteur seraient en mesure d'expliquer les défauts d'arborisation dendritique observés en conditions perte de fonction et mutant zQ175.

Par ses interactions avec les kinésines, dynéine, dynactine et HAP-1, la HTT régule le transport des vésicules et des organelles (Saudou & Humbert 2016). Au cours de la dendritogenèse, le transport vésiculaire est un mécanisme important apportant les facteurs nécessaires à la formation debranchements dendritiques. Le transport vésiculaire est largement altéré en perte de fonction et en présence de HTT mutée (Gauthier 2004). L'inactivation de kinésine, dont la HTT régule l'activité, induit l'hypotrophie de l'arborisation dendritique (Shirasaki 2010, Geiger 2014). L'étude des rôles de la HTT dans le développement dendritique demandera beaucoup d'investigation au vu de ses nombreuses interactions.

2.3. Axonogenèse

La mise en place des connexions axonales en condition pathologique n'a jamais été étudiée alors que, dès la phase pré-symptomatique, les patients présentent des anomalies de connectivité cortico-corticales (Gatto 2015). Le processus d'axonogenèse débute pendant la transition multipolaire-bipolaire et dépend de la polarisation du neurone, comme caractérisé dans le modèle knock-out CDK5 (Ohshima 2007). Nous avons vu que l'inactivation de la HTT dans les neurones post-mitotiques conduit à un délai dans cette transition multipolaire-bipolaire (Barnat 2017). Le transport vésiculaire est un mécanisme nécessaire à la croissance axonale. De plus, lors du développement cortical in vivo, le BDNF est transporté dans l'axone jusqu'au cône de croissance où il exerce son action via un mode autocrine et paracrine sur la morphogénèse axonale (Shimojo 2015). En condition pathologique, l'expression réduite de BDNF dans le cortex cérébral (Zuccato 2001, Cattaneo 2005) et son transport altéré (Gauthier 2004) sont donc des facteurs pouvant affecter l'axonogenèse.

3. La maladie de Huntington un trouble du neurodéveloppement?

La MH se manifeste généralement à l'âge adulte. Nous proposons que des anomalies du développement cérébral puissent contribuer à la progression pathologique. En effet, la mHTT altère différentes étapes de la neurogenèse. Dans les cas les plus extrêmes, ce type d'altérations est connu pour aboutir à des microcéphalies (Paridean 2013) et des désorganisations de la lamination corticale (Kawauchi 2015). En bon accord avec notre hypothèse de travail, des travaux récents montrent qu'il suffit d'exprimer la mHTT jusqu'à P21 chez la souris pour induire à l'âge adulte certains phénotypes caractéristiques de la MH (Molero 2016).

Dans le contexte de la MH, des anomalies de taille de différentes structures cérébrales ont été observées chez les porteurs de la mutation, et ce plusieurs décennies avant l'apparition des

symptômes (Paulsen 2010). De plus, les patients en phase pré-symptomatique ont un volume intracranial réduit (Nopoulos 2010). Le volume intracranial étant déterminé par la croissance du cerveau pendant la petite enfance, la baisse de ce volume ne peut s'expliquer par la neurodégénérescence, et serait plutôt en faveur d'une altération du développement cérébral dans la MH. De plus, la mesure de la circonférence du crâne chez des enfants porteurs de la mutation est anormalement plus petite que pour une population contrôle et cette réduction est négativement corrélée avec la longueur de l'expansion CAG (Lee 2012). Les défauts de développement du cerveau observés dans la MH pourraient expliquer ces observations faites chez les patients MH.

Les formes juvéniles de la MH (JMH) sont caractérisées par des expansions excessivement longues chez l'humain et représentent très certainement une forme neurodéveloppementale de la MH. Les individus atteints de JMH développent la maladie de façon très précoce et plusieurs structures cérébrales sont largement atrophiées. En effet, chez des enfants atteints d'une forme juvénile le volume intracranial est réduit et cette réduction est concomitante à la diminution du volume des structures sous-corticale (Tereshchenko 2019). L'analyse transcriptomique de iPSC provenant de patients JMH a montré des dérégulations dans de nombreuses voies moléculaires impliquées dans le développement dont celles qui impliquent REST, les molécules d'adhésion, la voie p53 régulant l'apoptose, TGF et NOTCH (Switonska 2018). Ces dérégulations sont également observées dans des iPSC de patients développant la MH à l'âge adulte et dans des modèles murins de la MH (Ring 2017, Wiatr 2018).

Nous proposons donc que les défauts de prolifération, de migration et de morphologie induits par la mHTT sensibilisent le cerveau en développement. Par exemple, l'axe cortico-striatal est particulièrement atteint dans la MH (Saudou & Humbert 2016). Parmi les observations les plus précoces, les défauts de connectivités de l'axe cortico-striatal dans les modèles murins suggèrent que des neurones anormalement générés s'intègrent mal aux réseaux auxquels ils sont connectés (Molero 2016, McKinstry 2014). Ces défauts qui résultent de l'ensemble des dysfonctions dans la mise en place du cortex dans la MH pourraient rendre l'axe cortico-striatal adulte plus vulnérable à des atteintes tardives. Une autre région spécifiquement atteinte est le cortex visuel, la première région à apparaître affectée par des approches d'imagerie chez les patients (Rosas 2002; Rosas 2008; Rüb 2015). Shen et coll. ont récemment décrit la dynamique de maturation fonctionnelle dans le cortex visuel de souris saines entre P0 et P21 (Shen 2016). Il serait pertinent d'étudier si la mHTT interfère avec cette maturation fonctionelle.

Il est aussi probable qu'une partie des défauts neurodéveloppementaux de la MH soit compensée. Les patients pré-symptomatiques présentent des troubles cognitifs dont la reconnaissance des émotions, l'intégration visuomotrice et les fonctions exécutives (Papoutsi

2014). Ce déclin cognitif est attribué à la réorganisation fonctionnelle des réseaux neuronaux. Le but de cette réorganisation est de préserver les fonctions motrices et cognitives. La réorganisation s'observe des années avant l'apparition des symptômes. En parallèle, la capacité à compenser sur la durée dépend de la « réserve cognitive » qui est très variable en fonction des individus. Les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore connus. L'existence de ces phénomènes de compensation pourrait être une conséquence directe du développement anormal des structures cérébrales qui intervient en plus de la neurodégénérescence.

4. Conclusion

Mes travaux de thèse ont permis d'établir le rôle clé de la HTT dans la migration neuronale et la dendritogenèse (Barnat 2017). L'analyse du développement cérébrale du modèle zQ175 apporte une nouvelle vision quant à l'effet de la mutation au cours de la neurogenèse corticale en montrant un effet différentiel de la mHTT pendant les stades précoces et tardifs (Le Friec en préparation) suggérant que ainsi que les fonctions/dysfonctions de la HTT évoluent en fonction des étapes du développement. Les rôles et les effets de la mutation durant le développement des structures cérébrales sont encore loin d'être complètement élucidés. Néanmoins, nos résultats combinés à ceux d'autres équipes et aux observations faites chez les patients MH contribuent à appuyer l'hypothèse d'un développement anormal du cortex cérébral induit par la mutation de la HTT.

La poursuite des travaux sur les défauts de développement précoces dans la MH, leurs conséquences fonctionnelles et les mécanismes de compensation modifiera peut-être notre vision de la MH

ANNEXE

ARTICLE 3 : Identification de la CarboxyPeptidase de la Tubuline et son implication dans la différenciation neuronale.

Les microtubules sont des polymères d'alpha et beta-tubuline impliqués dans un grand nombre de processus allant de la division jusqu'à la motilité et la morphogénèse cellulaires. La dynamique des microtubules a très largement été étudiée et un aspect clé de régulation de cette dynamique est le processus réversible de tyrosination de l'alpha-tubuline. L'alpha-tubuline subit en effet de façon dynamique des réactions de tyrosination, qui correspond à l'ajout d'un résidu Tyrosine par les Tyrosine Ligases (ou TTLs), et de détyrosination, qui correspond à l'élimination d'un résidu Tyrosine par les Tyrosine CarboxyPeptidases (ou TCPs). Ce cycle d'ajout et de retrait de résidus Tyrosines est spécifique à l'alpha-tubuline et est central dans la régulation de la mitose, la physiologie neuronale et la mécanotransduction musculaire. De ce fait, des défauts dans le cycle tyrosination/detyronisation sont impliqués dans différentes pathologies telles que le cancer, les cardiomyopathies et les défauts de lamination corticale. Si les TTLs sont connues depuis longtemps, l'identité des TCPs est restée un mystère pendant près de 40 ans.

En utilisant une approche protéomique basée sur l'utilisation d'un inhibiteur se liant de façon irréversible à la TCP dans des lysats de cerveaux, Aillaud et coll. ont réussi à purifier et à identifer la protéine Vasohibin-1 (VASH-1) et sa protéine associée VBP (pour *Vash Binding Protein*), comme étant les TCPs. Ils ont démontré *in vitro* que VASH-1 et VBP catalysent la détyrosination de l'alpha-tubuline. En utilisant des shRNA ciblant spécifiquement VASH-1, VASH-2 (un homologue de VASH-1) et VBP, ils ont observé que la déplétion en TCP induit des défauts de maturation neuronale notamment concernant la complexité de l'arborisation dendritique.

Au cours, de ma thèse, j'ai collaboré avec C. Aillaud afin de comprendre le rôle des TCPs lors du développement cérébral et tout particulièrement celui du cortex. Pour ce faire, j'ai déplété par une approche d'électroporation *in utero* au stade E14.5 les progéniteurs neuronaux en VASH-1 et VASH-2 à l'aide des shRNA spécifiques. Au stade E18.5, j'ai étudié l'effet de cette déplétion sur les neurones. J'ai observé qu'en situation contrôle, la plupart des neurones générés à E14.5 avaient atteint les couches superficielles. En revanches, lorsque VASH-1 et VASH-2 étaient déplétées, une vaste

majorité des neurones n'avait pas terminé sa migration radiale. Cette observation suggère qu'un défaut de détyronisation de l'alpha-tubuline contribue à un développement anormal du cortex cérébral. Ces désorganisations corticales peuvent être imputables à deux rôles connus des TCPs : d'une part, les TCPs régulent l'organisation du fuseau des progéniteurs neuronaux au cours de la mitose. En condition de déplétion, ces fuseaux ne seraient pas correctement organisés, ce qui pourrait affecter le déroulement de la mitose (Barisic 2015) et indirectement influencer la migration (Erck 2005). D'autre part, la dynamique de détyrosination de l'alpha-tubuline est aussi un facteur clé de la motilité cellulaire (Whipple 2010) dont dépend la migration radiale. Celle-ci pourrait donc être altérée dans les neurones déplétés en TCPs.

Ces travaux ont été publiés en 2017 dans la revue Science :

Vasohibins/SVBP are tubulin carboxypeptidase (TCPs) that regulate neuron differentiation.

Aillaud C., Bosc C., Peris L., Bosson A., Heemeryck P., Van Dijk J., Le Friec J., Boulan B., Vossier F., Sanman L.E., Syed S., Amara N., Couté Y., Lafanechère L., Denarier E., Delphin C., Pelletier L., Humbert S., Bogyo M., Andrieux A., Rogowski K., Moutin MJ.

Science. 15 Décembre 2017.

CYTOSKELETON

Vasohibins/SVBP are tubulin carboxypeptidases (TCPs) that regulate neuron differentiation

Chrystelle Aillaud,[1,2] Christophe Bosc,[1,2] Leticia Peris,[1,2] Anouk Bosson,[1,2] Pierre Heemeryck,[1,2] Juliette Van Dijk,[3,4] Julien Le Friec,[1,2] Benoit Boulan,[1,2] Frédérique Vossier,[1,2] Laura E. Sanman,[5] Salahuddin Syed,[5] Neri Amara,[5] Yohann Couté,[6] Laurence Lafanechère,[7] Eric Denarier,[1,2,8] Christian Delphin,[1,2] Laurent Pelletier,[1,2] Sandrine Humbert,[1,2] Matthew Bogyo,[5] Annie Andrieux,[1,2,8]*† Krzysztof Rogowski,[3]*† Marie-Jo Moutin[1,2]*

Reversible detyrosination of α-tubulin is crucial to microtubule dynamics and functions, and defects have been implicated in cancer, brain disorganization, and cardiomyopathies. The identity of the tubulin tyrosine carboxypeptidase (TCP) responsible for detyrosination has remained unclear. We used chemical proteomics with a potent irreversible inhibitor to show that the major brain TCP is a complex of vasohibin-1 (VASH1) with the small vasohibin binding protein (SVBP). VASH1 and its homolog VASH2, when complexed with SVBP, exhibited robust and specific Tyr/Phe carboxypeptidase activity on microtubules. Knockdown of vasohibins or SVBP and/or inhibitor addition in cultured neurons reduced detyrosinated α-tubulin levels and caused severe differentiation defects. Furthermore, knockdown of vasohibins disrupted neuronal migration in developing mouse neocortex. Thus, vasohibin/SVBP complexes represent long-sought TCP enzymes.

Microtubules are cytoskeletal polymers of α/β tubulin dimers centrally involved in cell division, motility, and morphogenesis. In the detyrosination/tyrosination cycle of tubulin, the C-terminal tyrosine of α-tubulin is removed by an elusive peptidase [tyrosine carboxypeptidase (TCP)] and re-added by the tubulin tyrosine ligase (TTL) (*1*). This cycle, which is specific to α-tubulin and mostly conserved from chordates to mammals, has a vital role in vivo (*2*). Tubulin detyrosination and tyrosination of α-tubulin is an important regulatory signal for mitosis (*3*–*5*), neuronal physiology (*6*–*8*), and muscle mechanotransduction (*9*, *10*). Consequently, abnormal tyrosination levels are associated with cell transformation and tumor aggressiveness (*11*, *12*), neuronal disorganization (*2*), and heart failure and cardiomyopathies (*10*, *13*). Although the detyrosination reaction was first described 40 years ago (*14*), the identity of TCP has remained unknown.

To enrich for TCP, we designed a three-step purification procedure using taxol-stabilized radiolabeled tyrosinated microtubules as a substrate to follow activity. A typical procedure gave a final purification factor of nearly 400-fold (Fig. 1A and fig. S1A). The last fraction (IV) was able to cleave the C-terminal tyrosine from tubulin incorporated in microtubules but not from EB1 (fig. S1B). EB1 is a protein that shares a similar C-terminal sequence with α-tubulin (-QEEY instead of -GEEY) and is generally not a substrate for TCP in physiological contexts (*15*).

To isolate the protein(s) responsible for TCP activity from fraction IV, we reasoned that an irreversible inhibitor could be used as in other chemical proteomic studies (*16*). We tested the sensitivity of brain TCP to various commercial protease inhibitors. The activity was inhibited by several serine/cysteine protease inhibitors [4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF), Tosyl-L-lysyl-chloromethyl ketone (TLCK), Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone (TPCK), E-64, and parthenolide] and by the thiol-reactive compound *N*-ethylmaleimide (Fig. 1B and fig. S2A). These results, in agreement with prior studies (*17*), strongly suggested that the catalytic activity of the putative TCP depends on a catalytic cysteine.

Although E-64 only showed modest inhibitory activity [median inhibitory concentration (IC_{50}) around 300 μM] (Fig. 1B), it is an ideal starting point for inhibitor design because its reactive epoxide electrophile can display a peptide- or amino acid–mimicking native protein C terminus. Furthermore, parthenolide, which is widely used to down-regulate detyrosination levels in cells (*4*, *6*, *9*, *10*), contains an epoxide function that is essential to its cellular effect (*17*). We thus synthesized three inhibitors—epoY, epoEY, and epoEEY—which contain the epoxide coupled to one, two, or three amino acids from the α-tubulin C terminus, respectively (fig. S2B). EpoY was the most potent inhibitor of the TCP activity (IC_{50} around 500 nM) (Fig. 1B). Alkyne-epoY, which retained a strong inhibitory potency (Fig. 1, B and C) and irreversibly inhibited the activity (fig. S2, C and D), was used to perform tetramethylrhodamine (TAMRA) labeling of fraction IV by means of click chemistry (Fig. 1D). This labeling showed specific modification of a small number of proteins (Fig. 1E). We then purified the inhibitor targets using agarose beads and, after on-beads trypsin digestion and quantitative mass spectrometry analyses of the resulting peptides from three independent experiments, we identified the protein vasohibin-1 (VASH1) as the most likely TCP candidate (Fig. 1D and tables S1 and S2). Peptides covering the almost full VASH1 sequence were detected (fig. S2E). Furthermore, recent bioinformatics data show that Vasohibin-1 and its homolog vasohibin-2 (VASH2) possess a noncanonical Cys-His-Ser catalytic triad and are members of the transglutaminase-like cysteine proteases family (Fig. 1F) (*18*).

Vasohibin proteins (41 to 42 kDa) have been extensively characterized as angiogenesis regulators but are poorly understood on a molecular level (*19*). Small vasohibin binding protein (SVBP) (Ccdc23) is a high-affinity binding partner of vasohibins that has a chaperone-like function (*20*). We examined the ability of VASH proteins to detyrosinate α-tubulin in cells in the absence or presence of SVBP. Expression of vasohibins alone in human embryonic kidney (HEK) 293T cells resulted in a slight increase of detyrosinated tubulin, whereas expression of either protein with SVBP resulted in a substantial increase in detyrosinated tubulin corresponding to a nearly complete loss of endogenous tyrosinated tubulin (Fig. 2A). Mutation of the putative catalytic cysteine on vasohibins [C179A for VASH1 and C158A for VASH2 (*18*)] abolished their capacity to produce detyrosinated tubulin. (Single-letter abbreviations for the amino acid residues are as follows: A, Ala; C, Cys; D, Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; W, Trp; and Y, Tyr. In the mutants, amino acids were substituted at certain locations; for example, C179A indicates that cysteine at position 179 was replaced by alanine.) Similarly, in mouse embryonic fibroblasts (MEFs), expression of the vasohibins with SVBP resulted in complete detyrosination of endogenous α-tubulin (Fig. 2B and fig. S3A).

α-Tubulins are generally encoded with a C-terminal tyrosine preceded by two glutamates.

[1]Grenoble Institut des Neurosciences (GIN), Université Grenoble Alpes, F-38000 Grenoble, France. [2]Inserm, U1216, F-38000 Grenoble, France. [3]Institut de Génétique Humaine (IGH), Université Montpellier, CNRS UMR9002, 34000 Montpellier, France. [4]Centre de Recherche en Biochimie Macromoléculaire (CRBM), Université Montpellier, CNRS UMR5237, 34000 Montpellier, France. [5]Department of Pathology, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA 94305, USA. [6]Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble (BIG)–Laboratoire Biologie à Grande Échelle, Université Grenoble Alpes, CEA, INSERM, F-38000 Grenoble, France. [7]Team Regulation and Pharmacology of the Cytoskeleton, Institute for Advanced Biosciences, INSERM U 1209, CNRS UMR 5309, Université Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France. [8]BIG–Physiopathologie du Cytosquelette, CEA, F-38000 Grenoble, France.
*Corresponding author. Email: moutinm@univ-grenoble-alpes.fr (M.-J.M.); annie.andrieux@univ-grenoble-alpes.fr (A.A.); krzysztof.rogowski@igh.cnrs.fr (K.R.) †These authors contributed equally to this work.

Downloaded from http://science.sciencemag.org/ on April 14, 2019

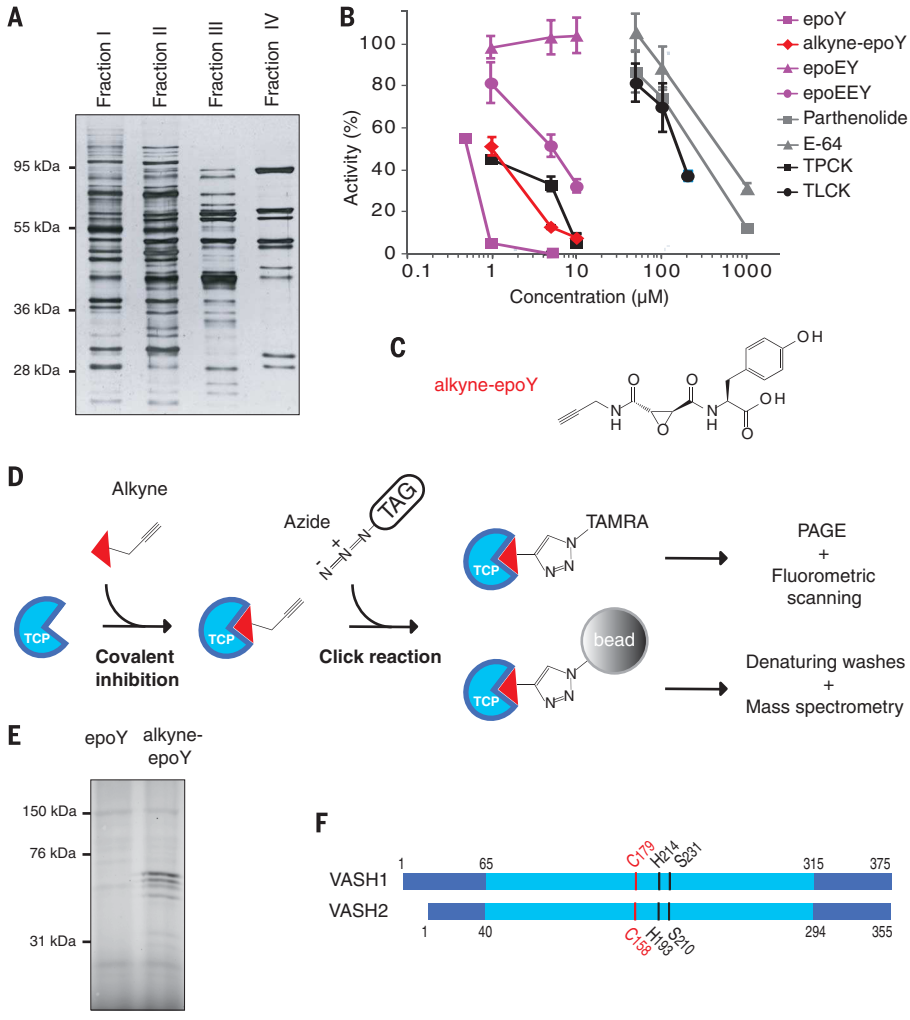


Fig. 1. Purification and identification of mouse brain TCP. (**A**) SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (silver staining) of the indicated fractions of TCP enrichment from mouse brain (1 μg of proteins): ammonium sulfate precipitation step followed by two ion exchange columns stages (fig. S1A). (**B**) Fraction IV sensitivity to inhibitors. TPCK and TLCK are commercial serine/cysteine inhibitors containing either a Phe or a Lys residue. Fraction IV activity showed a 100-fold higher sensitivity to TPCK than to TLCK. E-64 is a natural product inhibitor of clan CA cysteine protease. EpoY, epoEY, and epoEEY are designed inhibitors containing an epoxide group coupled with Y, EY, or EEY amino acids, respectively. Alkyne-epoY is a clickable version of epoY. Results are expressed as percentage of enzyme activity (radioactivity assay) in the control with dimethyl sulfoxide (mean ± SD, n = 3 to 6 assays). (**C**) Structure of alkyne-epoY. (**D**) Schematic representation of the last steps of TCP identification by using Cu-catalyze azide-alkyne cycloaddition (click reaction). (**E**) Labeling of putative TCP from fraction IV with TAMRA red-fluorescent dye by using alkyne-epoY (nonclickable epoY is used as control). (**F**) Schematic representation of mouse vasohibin-1 and vasohibin-2 [69% overall sequence homology; 77% for core domains (clear blue boxes)]. These putative transglutaminase-like cysteine peptidases contain an unconventional triad of catalytic residues (Cys, His, and Ser).

α4-Tubulin lacks the C-terminal tyrosine, and α8-tubulin contains a C-terminal phenylalanine residue. Phenylalanine can be incorporated in place of tyrosine in tubulin and be a possible cause of neuronal dysfunction (*21*). We tested the substrate specificity of the vasohibins by overexpressing α1B- and α8-tubulin together with VASH1 or VASH2 and SVBP in HEK293T cells. Both tubulin isotypes were cleaved by active vasohibins when expressed with SVBP (Fig. 2C and fig. S3B). Vasohibins were unable to cleave the C-terminal residue when tyrosine was mutated to alanine (Fig. 2C and fig. S3B), confirming the specificity of VASH proteins for C-terminal tyrosine and phenylalanine residues.

We overexpressed vasohibins in HEK293T cells in the absence or presence of SVBP and purified the resulting complexes using a cobalt resin. SVBP copurified with both vasohibins as expected from previous affinity measurements [dissociation constant (K_d) 30 to 90 nM] (*20*), and complex formation was not dependent on catalytic activity (fig. S4A). The two protein complexes efficiently catalyzed tubulin detyrosination, whereas complexes containing the catalytic dead versions of the vasohibins were unable to detyrosinate tubulin (Fig. 2D). Both complexes cleaved microtubules more rapidly as compared with tubulin dimers (Fig. 2E and fig. S4B), which is consistent with the reported preference of brain TCP in in vitro experiments (*1*, *22*, *23*). Purified VASH1/SVBP complex was not able to cleave the C-terminal tyrosine from EB1, indicating its clear tubulin preference. Intriguingly, VASH2/SVBP complex was able to partially detyrosinate EB1 in the same conditions (Fig. 2F). In most cell types, including neuronal-derived cells, C-terminal tyrosine cleavage is restricted to tubulin (*1*, *15*). EB1 can, however, be detyrosinated in specific endothelial and tumor cells (*24*), and this may be related to their VASH2 contents or defect in a regulatory mechanism.

To confirm the functional importance of vasohibins and their role in α-tubulin detyrosination, we assessed the phenotypic effects of knocking down expression of these proteins in differentiating neurons, where the detyrosination/tyrosination cycle is highly important for growth cone pathfinding and axon differentiation—that is, for neuron polarization (*2*, *7*, *8*). Although we were unable to detect vasohibins and SVBP by means of immunoblot in mouse neurons using commercial antibodies, we amplified their transcripts from RNA preparations of cultured hippocampal neurons as well as of adult and embryonic mouse brain tissues (Fig. 3A and figs. S5A and S6A). We transfected hippocampal neurons with plasmids expressing short hairpin RNAs (shRNAs) targeting either the vasohibins or SVBP (validated in figs. S5B and S6B) as well as control shRNAs. The levels of detyrosinated α-tubulin were decreased by almost 50% when the two vasohibins, or the SVPB, were down-regulated. Addition of inhibitor (alkyne-epoY) also largely reduced detyrosinated α-tubulin (Fig. 3, B and C). When added together with the shRNAs, levels of detyrosinated tubulin were decreased up to 75% (Fig. 3, B and C). The remaining pool of detyrosinated α-tubulin could be due to incomplete depletion of vasohibins activities or to the presence of α4-tubulin, which genetically lacks the C-terminal tyrosine and remains in detyrosinated form in the brain (*25*). The occurrence of other detyrosinases can however not be excluded. Confocal images of neurons cultured 2 days in vitro (2DIV) confirmed a decrease in the levels of the native detyrosinated α-tubulin upon reduction of vasohibins expression or addition of inhibitor (Fig. 3D and fig. S5C). The remaining detyrosinated pools were specifically concentrated in the axon, whereas α-tubulin in the other neurites appeared

Downloaded from http://science.sciencemag.org/ on April 14, 2019

highly tyrosinated. Vasohibins down-regulation led to a clear delay in axonal differentiation (Fig. 3E). Tau and ankyrin G staining of neurons bearing an axon confirmed normal distribution, with Tau highly expressed in axon shaft at 3DIV and ankyrin G in the axon initial segment at 10DIV (fig. S7). Neurons 2DIV knocked down for vasohibins developed an increased number of neurites and branches with overall reduced axon length (Fig. 3F). A delay of axon differentiation and similar morphological anomalies were observed when down-regulating SVBP (fig. S6, D to F). Transfection of a plasmid allowing coexpression of shRNAs that target SVBP and a shRNA-resistant form of SVBP rescued α-tubulin detyrosination levels (fig. S6, A and C). Thus, contrary to the premature axonal differentiation observed in the absence of the reverse enzyme TTL (*2*), we observed a clear delay of axon differentiation when down-regulating vasohibins or SVBP.

We next tested the functional importance of vasohibins in vivo in mouse brain and focused on the cerebral cortex, where the detyrosination/tyrosination cycle is critical for the neocortex

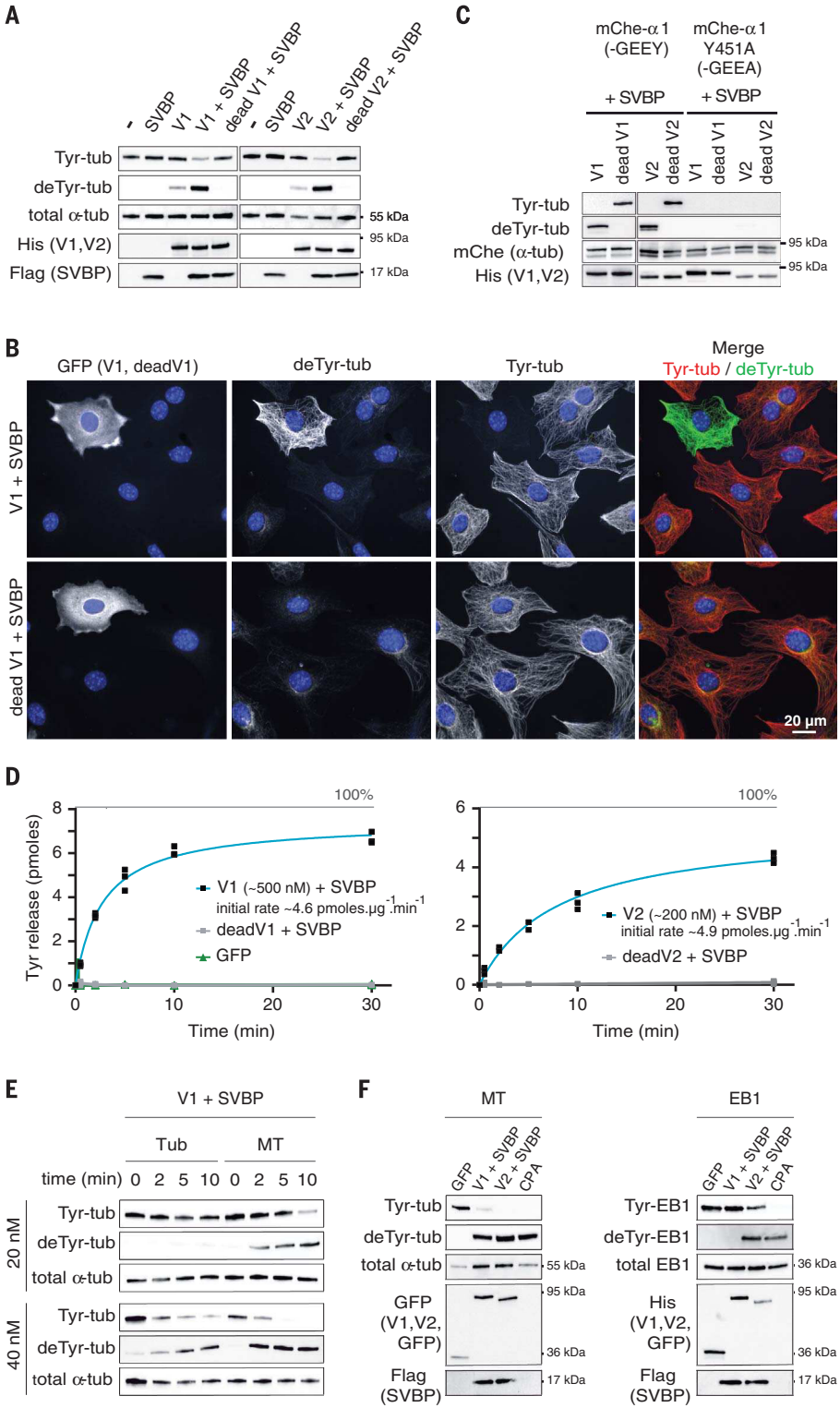


Fig. 2. Vasohibins associated to SVBP are potent tubulin tyrosine carboxypeptidases. (**A**) Immunoblot of endogenous tubulin from HEK293T cells expressing each VASH (V1 and V2) or their dead versions in the absence or presence of exogenous SVBP coexpression. Antibodies specific to tyrosinated and detyrosinated tubulin were used to assess detyrosination. Antibodies to α-tubulin, His, and Flag respectively reveal amounts of tubulin, vasohibin, and SVBP. Nontransfected cells (−) show endogenous levels of tubulin modifications. (**B**) Immunofluorescence images of detyrosinated/tyrosinated α-tubulin pools from MEF cells expressing active or inactive VASH1, and SVBP. Vasohibins were probed with antibody to green fluorescent protein (GFP). (**C**) Immunoblot of protein extracts from HEK293T cells expressing mCherry-α1B-tubulin, each VASH, and SVBP. Native or mutated versions of α1B-tubulin, respectively ending with EEY or EEA, were used. Levels of detyrosinated/tyrosinated tubulin were measured as in (A). Antibody to mCherry demonstrates same amounts of exogenous α-tubulin. (**D**) Detyrosination activity of purified VASH/SVBP complexes assessed by using [^{14}C]-tyrosinated taxol-stabilized microtubules (6 to 8 µM) (triplicate assay). Active and catalytic dead versions of the vasohibins were coexpressed with SVBP in HEK293T cells and purified on cobalt resin (fig. S4A). A purified GFP-His construct was used as a control. Data points were fitted with a single exponential (blue line). The theoretical maximal tyrosine release is indicated by a 100% line. (**E**) Detyrosination activity of purified VASH1/SVBP complexes (20 or 40 nM) on brain microtubules or tubulin dimers (5 µM) assessed by means of immunoblot. We controlled that tubulin was in dimeric or in assembled form (fig. S4C) and that the same amounts of enzymatic complexes were present (fig. S4D). (**F**) Detyrosination activity of purified VASH/SVBP complexes (600 nM) on brain microtubules or recombinant GFP-EB1 (5 µM). Enzyme quantities are much higher than in Fig. 2E. Carboxypeptidase A (CPA) was used as positive control. Antibodies against tyrosinated and detyrosinated EB1 were characterized in (*15*).

Downloaded from http://science.sciencemag.org/ on April 14, 2019

layer organization (2). During corticogenesis, neuronal migration relies in part on neuron polarization, which was highly dependent on vasohibins (Fig. 3, D and E) and SVBP (fig. S6, D and E). We electroporated embryonic day 14.5 (E14.5) embryos with the plasmids expressing shRNAs that target the vasohibins as well as control shRNA, and analyzed radial neuronal migration 4 days later. At E18.5, most neurons from control brains had reached the upper layer (bin 1), whereas when vasohibins were down-regulated, a significant fraction of neurons failed to do so (Fig. 4, A and B). Thus, these enzymes have a crucial role in neuronal migration during brain cortex development.

TCP remained the crucial missing element of the α-tubulin detyrosination/tyrosination cycle for 40 years. We identified vasohibins as enzymatic

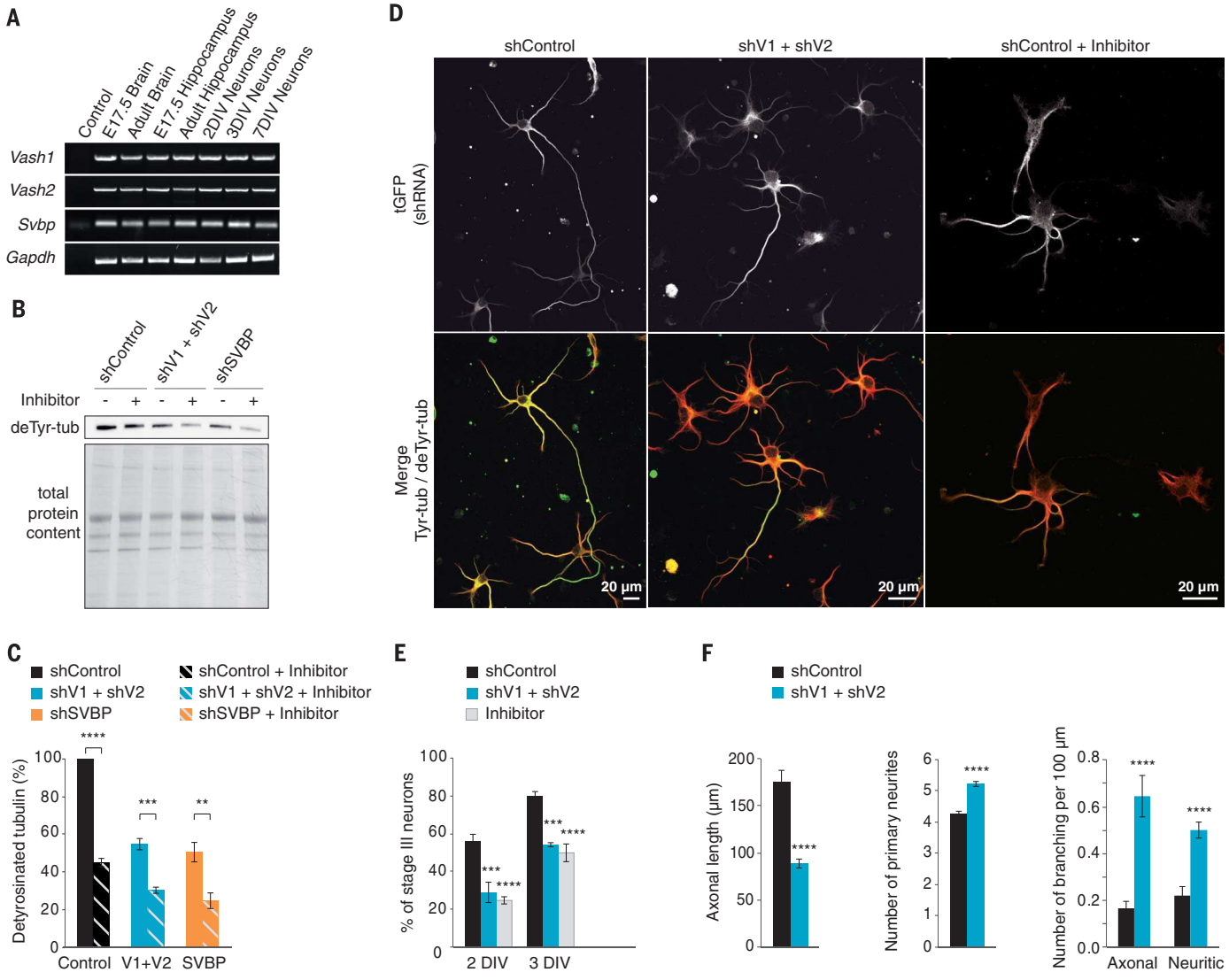


Fig. 3. Down-regulation of VASH1 and VASH2 affects neuronal differentiation. (**A**) *Vash1*, *Vash2*, and *Svbp* transcripts are found in brain tissues and hippocampal neurons. Reverse transcription polymerase chain reaction reactions of 45 cycles were performed, except for *Gapdh*, for which only 25 cycles were performed. (**B**) Immunoblot analysis of the effect of VASH1 and VASH2 (shV1+shV2) or SVBP (shSVBP) down-regulation with or without alkyne-epoY (inhibitor) on detyrosinated α-tubulin levels in neurons. Neurons were transfected by means of electroporation, with shRNAs associated to turboGFP (tGFP) cDNA just before plating and analyzed at 2DIV. Inhibitor (5 µM) was added at 0DIV and at 1DIV. Results are from duplicate immunoblots of three independent neuronal cultures. (**C**) Quantification of immunoblots as in (B) (duplicate of four to eight independent neuronal cultures). Results are expressed as percentage of detyrosinated tubulin related to shControl (mean ± SEM). Detyrosinated tubulin was significantly reduced in all conditions compared with shControl [one-way analysis of variance (ANOVA) with Sidak's multiple comparisons test]. Detyrosinated tubulin was additionally reduced when shV1+shV2 and shSVBP transfected neurons were incubated with the inhibitor (Student's *t* test). (**D** to **F**) Effect of vasohibins down-regulation on neurite outgrowth and axonal differentiation. Neurons were transfected as in (B) and analyzed by means of immunostaining at 2DIV and 3DIV. (D) Tyrosinated and detyrosinated α-tubulin levels were imaged at 2DIV using the same antibodies as in Fig. 2A. Levels of shRNA were imaged by using an antibody to tGFP. The size of scale bars are different. (E) Stage III neurons (bearing an axon) were counted manually on immunofluorescence images [generated as in (C)] from 4 to 10 independent cultures, at 2DIV and 3DIV. Proportion of stage III neurons (an index of neuronal differentiation) is represented as mean ± SEM (one-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test). (F) Morphometric analyses of at least 85 neurons (2DIV) by using AutoNeuriteJ macro (details are available in the supplementary materials, materials and methods) on immunofluorescence images generated as in (D) (mean ± SEM, Mann-Whitney tests). In (C), (E), and (F): $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$.

Downloaded from http://science.sciencemag.org/ on April 14, 2019

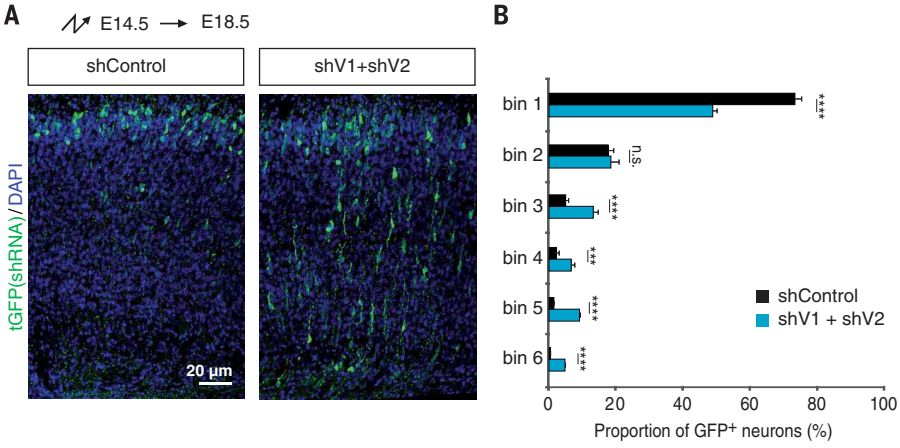


Fig. 4. Down-regulation of vasohibins affects radial migration of newborn cortical neurons. (**A**) Cortical coronal sections of E18.5 mice embryos electropored at E14.5 with indicated shRNAs. (**B**) Quantitative analysis showing the distribution of tGFP-positive neurons across the cortex divided into six bins of equal surface. Data are from five brains per condition, three slides per embryo (at least 260 GFP^+-neurons per embryo), mean ± SEM. n.s., not significant; ***$P < 0.001$, ****<0.0001 (Mann-Whitney test).

proteins that perform the TCP function (fig. S8). The failure of prior attempts to identify TCPs most probably resulted from their association with SVBP for stability and activity, which could likely be lost during standard purification assays. In agreement with TCP functions, vasohibins are widely distributed in eukaryotes and have broad tissue expression, and vasohibin-1 (which is generally more expressed than vasohibin-2) is abundant in the brain, heart, and kidney [(*18*, *26*, *27*) and GTEx Portal, on www.gtexportal.org/home]. Additionally, we demonstrated their critical role in neuron and brain physiology.

REFERENCES AND NOTES

1. H. S. Barra, C. A. Arce, C. E. Argaraña, *Mol. Neurobiol.* **2**, 133–153 (1988).
2. C. Erck *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 7853–7858 (2005).
3. A. C. Badin-Larçon *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 5577–5582 (2004).
4. M. Barisic *et al.*, *Science* **348**, 799–803 (2015).
5. L. Peris *et al.*, *J. Cell Biol.* **174**, 839–849 (2006).
6. P. Gobrecht *et al.*, *J. Neurosci.* **36**, 3890–3902 (2016).
7. Y. Konishi, M. Setou, *Nat. Neurosci.* **12**, 559–567 (2009).
8. S. Marcos *et al.*, *PLOS ONE* **4**, e5405 (2009).
9. J. P. Kerr *et al.*, *Nat. Commun.* **6**, 8526 (2015).
10. P. Robison *et al.*, *Science* **352**, aaf0659 (2016).
11. L. Lafanechère *et al.*, *J. Cell Sci.* **111**, 171–181 (1998).
12. R. A. Whipple *et al.*, *Cancer Res.* **70**, 8127–8137 (2010).
13. S. Belmadani, C. Poüs, R. Ventura-Clapier, R. Fischmeister, P. F. Méry, *Mol. Cell. Biochem.* **237**, 39–46 (2002).
14. M. E. Hallak, J. A. Rodriguez, H. S. Barra, R. Caputto, *FEBS Lett.* **73**, 147–150 (1977).
15. A. Bosson *et al.*, *PLOS ONE* **7**, e33490 (2012).
16. M. A. Child *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* **9**, 651–656 (2013).
17. X. Fonrose *et al.*, *Cancer Res.* **67**, 3371–3378 (2007).
18. L. Sanchez-Pulido, C. P. Ponting, *Bioinformatics* **32**, 1441–1445 (2016).
19. Y. Sato, *J. Biochem.* **153**, 5–11 (2013).
20. Y. Suzuki *et al.*, *J. Cell Sci.* **123**, 3094–3101 (2010).
21. Y. Ditamo, Y. M. Dentesano, S. A. Purro, C. A. Arce, C. G. Bisig, *Sci. Rep.* **6**, 38140 (2016).
22. G. G. Deanin, S. F. Preston, R. K. Hanson, M. W. Gordon, *Eur. J. Biochem.* **109**, 207–216 (1980).
23. N. Kumar, M. Flavin, *J. Biol. Chem.* **256**, 7678–7686 (1981).
24. A. Rovini *et al.*, *PLOS ONE* **8**, e65694 (2013).
25. V. Redeker, *Methods Cell Biol.* **95**, 77–103 (2010).
26. S. Nimmagadda *et al.*, *Dev. Dyn.* **236**, 1358–1362 (2007).
27. T. Shibuya *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 1051–1057 (2006).

ACKNOWLEDGMENTS

We dedicate this manuscript to Dr. Hector Barra, father of the detyrosination/tyrosination cycle who passed away on 2 December 2016. We are grateful to D. Job who strongly supported initiation of the project and for his constant encouragement. We thank M. Comte, E. Martin, C. Corrao, and C. Paoli for technical assistance. We thank members of the Plateforme d'Imagerie Cellulaire du Grenoble Institut des Neurosciences for their help in cell imaging and zootechnicians of the Grenoble Institut des Neurosciences for animal care. We thank M. Steinmetz for providing purified TTL and A. Beghin for initial development of AutoNeuriteJ macro. We thank the support of the discovery platform and informatics group at EDyP. This work was supported by INSERM, CEA, Université Grenoble Alpes, CNRS, and by La Ligue Contre le Cancer comités de l'Isère et de Savoie (to M.-J.M.), Association pour la Recherche sur le Cancer (grants SFI20111204053 to M.-J.M., DOC20120605000 to A.B., and 20151203348 to L.L.), Fondation pour la Recherche Médicale grant FDT20160435356 (to C.A.), Agence National de la Recherche grant ANR-13-JSV2-0002/TYRTUB (to K.R.), Institut National du Cancer grant 2016-165 (to LL) and the National Institutes of Health grant R01 EB005011 (to M.B.). Proteomic experiments were partly supported by the ProFi grant (ANR-10-INBS-08-01). An EU patent titled "Methods and pharmaceutical compositions for treating tubulin carboxypeptidases associated diseases" has been filed by Inserm and UGA (patent application no. EP17306476.7). Data described can be found in the main figures, supplementary materials, and table S2.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

www.sciencemag.org/content/358/6369/1448/suppl/DC1
Materials and Methods
Supplemenatry Text
Figs. S1 to S7
Tables S1 and S2
References (*28*–*37*)

27 July 2017; accepted 3 November 2017
Published online 16 November 2017
10.1126/science.aao4165

Downloaded from http://science.sciencemag.org/ on April 14, 2019

Science

Vasohibins/SVBP are tubulin carboxypeptidases (TCPs) that regulate neuron differentiation

Chrystelle Aillaud, Christophe Bosc, Leticia Peris, Anouk Bosson, Pierre Heemeryck, Juliette Van Dijk, Julien Le Friec, Benoit Boulan, Frédérique Vossier, Laura E. Sanman, Salahuddin Syed, Neri Amara, Yohann Couté, Laurence Lafanechère, Eric Denarier, Christian Delphin, Laurent Pelletier, Sandrine Humbert, Matthew Bogyo, Annie Andrieux, Krzysztof Rogowski and Marie-Jo Moutin

Science **358** (6369), 1448-1453.
DOI: 10.1126/science.aao4165originally published online November 16, 2017

Tubulin carboxypeptidase identity revealed

Enzymes of the α-tubulin detyrosination/tyrosination cycle create landmarks on microtubules that are essential for their multiple cellular functions and are altered in disease. Tubulin carboxypeptidases (TCPs) responsible for detyrosination have remained elusive for 40 years (see the Perspective by Akhmanova and Maiato). Aillaud *et al.* identified vasohibins as enzymes that perform the TCP function and found that their small interacting partner SBVP was essential for their activity. Vasohibin/SVBP complexes were involved in neuron polarization and brain cortex development. The authors also developed an inhibitor targeting this family of enzymes. Using a completely different strategy, Nieuwenhuis *et al.* also showed that vasohibins can remove the C-terminal tyrosine of α-tubulin.

Science, this issue p. 1448, p. 1453; see also p. 1381

ARTICLE TOOLS http://science.sciencemag.org/content/358/6369/1448

SUPPLEMENTARY MATERIALS http://science.sciencemag.org/content/suppl/2017/11/15/science.aao4165.DC1

RELATED CONTENT http://science.sciencemag.org/content/sci/358/6369/1453.full
http://science.sciencemag.org/content/sci/358/6369/1381.full

REFERENCES This article cites 37 articles, 16 of which you can access for free
http://science.sciencemag.org/content/358/6369/1448#BIBL

PERMISSIONS http://www.sciencemag.org/help/reprints-and-permissions

Use of this article is subject to the Terms of Service

Science (print ISSN 0036-8075; online ISSN 1095-9203) is published by the American Association for the Advancement of Science, 1200 New York Avenue NW, Washington, DC 20005. 2017 © The Authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. No claim to original U.S. Government Works. The title *Science* is a registered trademark of AAAS.

Downloaded from http://science.sciencemag.org/ on April 14, 2019

www.sciencemag.org/cgi/content/full/science.aao4165/DC1

Supplementary Material for

Vasohibins/SVBP are tubulin carboxypeptidases (TCP) that regulate neuron differentiation

Chrystelle Aillaud, Christophe Bosc, Leticia Peris, Anouk Bosson, Pierre Heemeryck, Juliette Van Dijk, Julien Le Friec, Benoit Boulan, Frédérique Vossier, Laura E. Sanman, Salahuddin Syed, Neri Amara, Yohann Couté, Laurence Lafanechère, Eric Denarier, Christian Delphin, Laurent Pelletier, Sandrine Humbert, Matthew Bogyo, Annie Andrieux,* Krzysztof Rogowski,* Marie-Jo Moutin*

*Corresponding author. Email: moutinm@univ-grenoble-alpes.fr (M.-J.M.); annie.andrieux@univ-grenoble-alpes.fr (A.A.); krzysztof.rogowski@igh.cnrs.fr (K.R.)

Published 16 November 2017 as *Science* First Release
DOI: 10.1126/science.aao4165

This PDF file includes:

Materials and Methods
Supplemenatry Text
Figs. S1 to S8
Table S1
References

Other Supplementary Material for this manuscript includes the following:
(available at www.sciencemag.org/content/science.aao4165/DC1)

Table S2 as a separate Excel file

Materials and Methods

Animals. Male or females mice were used between 2-4 months old. In accordance with the policy of the Institut des Neurosciences of Grenoble (GIN) and the French legislation, experiments were done in compliance with the European Community Council Directive of 24th November, 1986 (86/609/EEC). The research involving animals was authorized by the Direction Départementale de la protection des populations—Préfecture de l'Isère-France and by the ethics committee of GIN number 004 accredited by the French Ministry for of Research.

Preparation of tyrosinated tubulin and microtubule, and EB1. Bovine brain tubulin (12 mg/mL, prepared as in (*28*)) was tyrosinated by incubation for 45 min at 30°C with purified chicken TTL (1 mg/mL, gift from Steinmetz group) and 0.1 mM L-tyrosine or [^{14}C]-L-tyrosine (0.125 µCi/nmole) in 40 mM Pipes at pH 6.7, 60 mM KCl, 2.5 mM ATP, 1 mM DTT, 12.5 mM $MgCl_2$. Microtubules polymerization was allowed by one-third dilution in 100 mM PIPES at pH 6.7, 1 mM EGTA, 1 mM $MgCl_2$, 30% glycerol, 1 mM GTP and incubation at 32°C for 45 min, followed by another 45 min incubation with 50 µM Paclitaxel (Calbiochem). Microtubules were sedimented by 25 min centrifugation at 100,000 *g* and 30°C on 60% glycerol cushions. TTL-containing supernatant was discarded and tyrosinated-microtubules were resuspended in 100 mM PIPES at pH 6.7, 1 mM EGTA, 1 mM $MgCl_2$, 10% glycerol, 80 µM paclitaxel and stored at -20°C. To obtain unpolymerized tyrosinated-tubulin, paclitaxel was omitted during the whole procedure. EB1 was prepared as in (*28*).

TCP activity assays. In radioactivity tests using [^{14}C]-tyrosinated taxol-stabilized microtubule, enzyme activity was measured in 100 mM MES at pH 6.7, 1 mM EGTA and 1 mM $MgCl_2$ using 2 µM radiolabeled tubulin, except in Figs. 2D and S2D (quantity indicated in legend). Reactions were

performed for 45 min at 37°C (without or with previous incubation with inhibitors, see legends) and were stopped on ice by addition of 20 µg/ml bovine serum albumin and 10% perchloric acid and centrifugation. Tyrosine cleaved from microtubules was estimated by measuring radioactivity in the supernatant (a zero time control was subtracted). To compose the table of Fig. S1A, detyrosination activity from equal volumes of the various fractions was measured. In tests with inhibitors, detyrosination activity was tested after a 20 min preincubation with inhibitor (except in Figs. S2C and S2D where varying time of incubation were used as indicated in legend), and results with inhibitors were expressed as percentage of the activity in the control with corresponding solvent. In tests using immunoblots, enzyme activity was assayed with 5 µM substrates (taxol-stabilized microtubule, tubulin or EB1) in 100 mM MES at pH 6.7, 1 mM EGTA and 1 mM $MgCl_2$ for times indicated in figures. Positive controls were done with carboxypeptidase A (2 ng/mL). Reactions were stopped by addition of Laemmli buffer. A reaction with carboxypeptidase A (CPA), which efficiently cleaves aromatic and aliphatic C-terminal residues, was used as positive control. In tests using VASH/SVBP complexes purified on cobalt resin from HEK293T cells, enzymes concentration were approximated from in-gel Coomassie-blue staining of purified VASH1 and VASH2 together with standards of bovine serum albumin.

Enzyme enrichment. We designed a three-step purification procedure from brain lysate inspired from previous efforts (*23, 29*). All steps were carried out at 4°C. Adult mice brains were homogenized in 50 mM phosphate buffer at pH 6.7, 1 mM EGTA, 1 mM $MgCl_2$, 1 µg/ml DNAse with a protease inhibitor cocktail (cOmplete EDTA-free, Roche) and centrifuged 1 h at 100,000 *g*. The supernatant was collected (Fraction I). In step 1 (ammonium sulfate fractionation), Fraction I was slowly brought to 45% ammonium sulfate, incubated for 15 min and centrifuged 20 min at 15,000 *g*. Resulting supernatant underwent the same procedure at 65% ammonium sulfate. The pellet was re-suspended in one-eighth of initial volume with 50 mM MES pH 6.7, 1 mM EGTA, 1

mM $MgCl_2$ and desalted using Bio-Gel P30 (Bio-Rad) equilibrated with the same buffer (Fraction II). In step 2 (strong anion column), Fraction II was loaded onto a 5 mL Hitrap Q XL column (GE Healthcare) connected on a BioLogic DuoFlow chromatography systems (Biorad) and unbound proteins were collected (Fraction III). In step 3 (strong cation column): Fraction III adjusted to pH 6.2 and 0.12 M NaCl, was loaded on a 5mL Hitrap SP XL column (GE Heathcare). Proteins were eluted with a 0.12 M to 1 M NaCl gradient. Protein fractions were equilibrated in 50 mM MES at pH 6.7, 1 mM EGTA, 1 mM $MgCl_2$ (by desalting with BioGel P-30). TCP activity assay was performed on these fractions and activity containing fractions were pooled (Fraction IV). Purification data of a typical experiment are shown in Figs. 1A and S1A. For the quick enzyme enrichment (used in Fig. S1A, C, D), brain homogenate was directly proceeded to step 3, and then desalted.

Click chemistry (Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, CuCAAC reaction). Fraction IV was equilibrated in phosphate buffered solution at pH 7.4 and concentrated to 2 mg/ml. Following 1 h incubation at 37°C with 10 µM of alkyne-epoY or 10 µM of epoY (respectively clickable and control irreversible inhibitors, see structures in Fig. 1C, S2B), two equivalent volumes of azide-agarose beads (Jena Biosciences) were then added and click reaction was started by addition of 1 mM $CuSO_4$, 100 µM TBTA and 1 mM TCEP. Reaction was completed in 3 h at room temperature. For fluorescence labeling, 100 µM 5/6-TAMRA-PEG3-azide (Jena Bioscience) was used instead of azide-agarose beads.

Mass Spectrometry sample preparation. Removal of non-specifically bound proteins, and peptides preparation to be analyzed were achieved according to the Click Chemistry Capture Kit protocol (Jena Bioscience). Quickly, agarose-bound proteins were reduced and alkylated. Beads were washed with 1% SDS and 8 M urea. On-beads tryptic proteolysis (using Sequencing Grade

Modified Trypsin, Promega) was performed and released peptides were purified on C18 cartridges (Ultra-Micro spin columns, Harvard Apparatus).

Mass spectrometry-based proteomic analyses. Peptides were analyzed by nanoliquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (Ultimate 3000 coupled to LTQ-Orbitrap Velos Pro, Thermo Scientific) using a 120-min gradient as described in (*30*). Peptides and proteins were identified through concomitant searches against Uniprot (March 2017 version, *Mus musculus* taxonomy), classical contaminants (homemade) and the corresponding reversed databases using Mascot (version 2.5.1). The Proline software (http://proline.profiproteomics.fr) was used to filter the results (conservation of rank 1 peptides, peptide identification FDR < 1% as calculated on peptide scores by employing the reverse database strategy, and minimum of 1 specific peptide per identified protein group) before performing a compilation, grouping and comparison of the protein groups from the control and positive samples. Proteins from the contaminants database and additional keratins were discarded from the final list of identified proteins. Only proteins identified with a minimum of 3 specific spectral counts in the 3 replicates of positive samples and absent from the control samples were further considered.

Expression constructs. Mouse vasohibin-1 (VASH1) and vasohibin-2 (VASH2) cDNAs (accession numbers NM_177354 and NM_144879, respectively) were PCR-amplified and inserted into a home-made CAG promoter-containing vector, that generates proteins with a Flag tag at the N-terminus and with superfolder-GFP (sfGFP(*31*)) and a 6 His tag at the C-terminus (Flag-vasohibin-sfGFP-His). The corresponding control plasmid encodes Flag-sfGFP-His protein. Bicistronic plasmids allowing coupled expression of both vasohibins and SVBP were obtained by introducing, downstream of the Flag-vasohibin-sfGFP-His cDNA, a cassette containing the encephalomyocarditis virus IRES sequence followed by the cDNA encoding mouse SVBP

(accession number NM_024462) with a C-terminal Myc-tag (Flag-vasohibin-sfGFP-His/SVBP-Myc). Point mutations were introduced by PCR to generate enzymatically dead versions of vasohibins: C179A for VASH1 and C158A for VASH2, according to the numbering of accession numbers NP_796328 and NP_659128, respectively. The plasmid encoding mouse SVBP with C-terminal Myc and Flag tags (SVBP-Myc-Flag) was obtained from OriGene. Mouse *Eb1* cDNA (accession number NM_007896) was inserted into an EGFP-tagged vector in order to generate EB1-EGFP. Plasmid encoding His-EB1 for protein production in *E. coli* was described in (*15*). cDNAs coding for human tubulin α1B and mouse tubulin α8 (accession numbers NM_006082 and NM_017379, respectively) were PCR-amplified and inserted into a vector with N-terminal mCherry tag. Point mutations in α-tubulin cDNAs were introduced by PCR to replace the last aromatic residue by an alanine: Y451A for α1B-tubulin and F449A for α8-tubulin, according to the numbering of accession numbers NP_006073 and NP_059075, respectively. Plasmid expressing mouse-specific shRNAs were from OriGene: TL511800B for *Vash1*, TL506751C for *Vash2*, TL517601B for *Svbp* and TR30021 for control. For rescue experiment with SVBP, tGFP of the plasmid TL51701B containing the Svbp shRNA was extracted by digestion with Mlu I and Pme I and replaced by a cDNA encoding mouse *Svbp* with myc and FLAG epitopes at the C-terminus. The mutations G60A, G63A, T66C, G69A and G72A in the SVBP cDNA generate shRNA-resistance. All constructs were verified by DNA sequencing.

Purification of His-tagged vasohibins from HEK293T cells. HEK293T cells cotransfected with plasmids allowing expression of GFP or active/inactive forms of vasohibins and SVBP (Flag-sfGFP-His or Flag-(dead)VASH1/2-sfGFP-His and SVBP-Myc-Flag) were lysed in Tris buffer at pH 8.0, 0.5% TritonX100, 1 mM $MgCl_2$, 200 mM NaCl, 5 mM imidazole in the presence of protease inhibitor cocktail (cOmplete EDTA-free, Roche). After centrifugation (10 min at 16,000 *g* and 4°C), supernatants were collected and added onto 20 µL of cobalt resin (Sigma) and incubated

for 3 h at 4°C. After 3 washes with lysis buffer, proteins were eluted using 200 mM imidazole, Tris buffer at pH 8.0, 1 mM $MgCl_2$, 200 mM NaCl. Purified proteins were equilibrated by dialysis at 4°C in 100 mM Pipes, 1 mM EGTA and 1 mM $MgCl_2$ and directly used in radioactivity assays.

Cell culture and transfection. Hippocampal neurons and MEFs were prepared as previously described (*2*). HEK293T cells were maintained under standard conditions. HEK293T cells were transfected with JetPRIME transfection reagent (Polyplus-Transfection). MEFs and neurons were transfected using Amaxa Nucleofector kits (Lonza). A ratio of 1:1 was generally used for cDNA co-transfections (for VASH1/2 with SVBP, or for mCherry-tubulin with bicistronic plasmids allowing coupled expression of VASH1/2 and SVBP).

Antibodies, immuno-blotting and immune-fluorescence. Detyrosination activity was detected using antibodies specific for tyrosinated tubulin ($YL_{1/2}$, Tyr-tub) or native EB1 (Tyr-EB1), and C-terminally detyrosinated tubulin (deTyr-tub) or EB1 (deTyr-EB1). Control of total tubulin or EB1 was estimated with antibodies that recognizes both species (total α-tub or α3A1, total EB1 from BD Transduction lab.). All these antibodies were described and characterized in (*15*), except an anti-deTyr-tub that we recently developed (using the same peptide) in guinea pig which was used in immunofluorescence (1:1000, Fig. 3). The other primary antibodies were used as follow: mouse anti-His from Qiagen in immunofluorescence (1:5000), rabbit anti-Flag from Molecular Probes in immunofluorescence (1:10000), rabbit anti-GFP from Chromotek in immunoblot (1:5000), chicken anti-GFP from Millipore in immunofluorescence (1:500), rabbit anti-turboGFP from Invitrogen in immunofluorescence (1:1000) and in immunoblot (1:10000), mouse RFP antibody (for mCherry) from Sigma in immunoblot (1:2500), mouse anti-Tau from Millipore in immunofluorescence (1:500) and mouse anti-ankyrin G from SantaCruz in immunofluorescence (1:300).

For immunoblotting, cells were collected after 24 h of transfection. After washing with phosphate-buffered saline (PBS) medium at 37°C, cells were directly lysed in Laemmli buffer. Protein extracts were loaded on 10% acrylamide gels (Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™, Biorad) and transferred with Trans-Blot® Turbo (BioRad). Membranes were incubated with primary antibodies, with secondary antibodies conjugated with HRP (1:10 000, from Jackson ImmunoResearch), and finally revealed with Chemidoc camera (Biorad). For analysis and graphical representations of immunoblots (Fig. 3B,C and S6C), protein bands were quantified from triplicate blots of 3 different experiments using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Detyrosinated α-tubulin signal was normalized to the total protein content of the sample estimated from a stain-free gel image (the trihalo compounds in the Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ gel react with tryptophan residues in proteins in a UV-induced 1-minute reaction to produce fluorescence).

For immunofluorescence, cells were generally fixed at 37°C in 4% paraformaldehyde, 4.2% sucrose, phosphate buffered saline medium (PBS) (except for ankyrin G staining for which methanol fixation at -20°C was used) and permeabilized using 0.1% Triton X-100, PBS. Cells were then incubated with primary antibodies, followed by incubation with secondary antibodies (see below) conjugated with either alexa-488, cyanine-3 or cyanine-5 fluorophores (1:1000). Nuclei were stained using Hoescht 33258 (1 μg/ml).

SDS-PAGE, immuno-blot or immunofluorescence data presented all over the manuscript are representative results from experiments performed at least 3-times.

RT-PCR and RT-qPCR amplifications. For RT-PCR, messenger RNAs from cells and tissues were prepared with the Dynabeads purification kit (Invitrogen). RT-PCR were performed with the Superscript One step RT-PCR System (Invitrogen) in 12.5 μL with 50 ng RNA. Products of respectively 697, 748 and 154 bp from mouse *Vash1*, *Vash2* and *Svbp* were amplified at 58°C by 45

cycles using the following primers: 5'-TACAAACCGCCCGCCTTCC and 5'-ACAGACCCTGACAGCTACCAACA for *Vash1*, 5'-GCAGCCTTCCATTGAGCGGT and 5'-CAGTCAACCCAGGGCTTTGCC for *Vash2*, 5'-CCAGCAGGAGCTGAAGCAAAGA and 5'-GCACCAGTTCCTCTGCCGGG for *Svbp*. *Gapdh* was amplified at 64°C by 25 cycles with 5'-TCAACGGGAAGCCCATCACCA and 5'-GTTTCTCCAGGCGGCACGTC primers. For RT-qPCR, cells were lysed using the SingleShot Cell Lysis kit (Bio-Rad) and analyzed using the iScript Reverse Transcription mix (Bio-Rad) and SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Products of 105 bp from mouse *Vash1*, *Vash2, Svbp* and *Gapdh* were amplified at 60°C by 40 cycles using the following primers: 5'-TGGCCAAGATCCACCCAGATG and 5'-TCGTCGGCTGGAAAGTAGGCAC for *Vash1,* 5'-AGGGGGAGAGATGGTAGGCGC and 5'-AGCCAGTCTGGGATCGTCATGG for *Vash2,* 5'-AACCAGCCTTCAGAGTGGAGAAGG and 5'-GCTCCGTCATGACTCTGTTGAGAGC for *Svbp,* and 5'-CGTGCCGCCTGGAGAAAC and 5'-TGGGAGTTGCTGTTGAAGTCG for *Gapdh*.

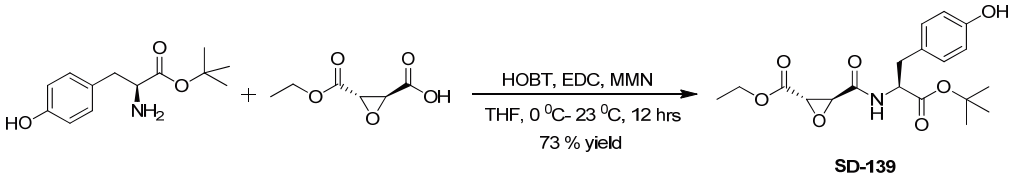
Morphometric neuron analysis. Mosaic images of 2DIV neuron fixed and stained with anti-tubulin antibody were acquired with a 20X N.A 0.5 objective on a DMI6000 Leica microscope with a motorized stand. Images were segmented after enhancement with a DoG filter. The cell bodies of single neurons were manually selected and used to process neurons individually with an homemade AutoNeuriteJ macro. Briefly the neuron images were skeletonized and neuritic loops were resolved using the "Analyze Skeleton 2D/3D ImageJ plugin"(*32*). The ends of neurites were marked using the "BinaryConnectivity" imageJ plugin (developed by G. Landini, http://www.mecourse.com/landinig/software/software.html). Images of each neurite from their ends to the cell body were produced. Among the neurites with a path overlap, the longest was defined as primary neurite. The images of primary neurites were substracted to images of overlapping neurites, thus defining secondary neurites and number of branching. Neurite lengths were measured. Neurites

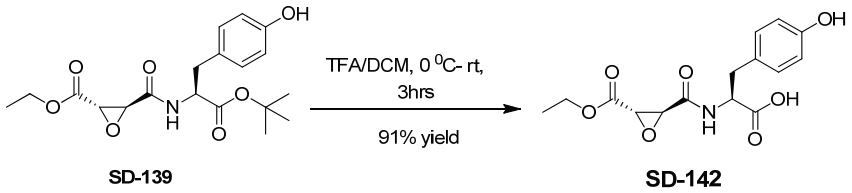
with a length inferior to 12 µm were not considered in order to avoid skeletonization artifacts. An axon was defined among primary neurites of a single neuron if its length was at least 48 µm and 1.3-times longer than any other primary neurite. Using this macro we selected a minimum of 27 neurons for each condition and compared the mean axonal length, mean primary neurite number (excluding axon) and branching frequency.

In utero electroporation, tissue processing, immunohistochemistry and analyses. A full description is available in (*33*). Briefly, embryos from anesthetized timed-pregnant mice were electropored at E14.5 with plasmids allowing expression of shRNAs (see above). Four days later (E18.5), embryonic brains were dissected, fixed, cryosectioned and placed onto slides for analyses. Anti-tGFP primary antibodies (1:300) was incubated overnight at 4°C. Nuclei were counterstained with DAPI (Roche). Images were acquired with a 20X N.A 0.5 objective on a DMI6000 Leica microscope with a motorized stand and analyzed with Image J. The cortical region where transfected cells were detected was divided into 6 bins of equal surface in which GFP positive (GFP^+) neurons were counted (5 embryos per condition, 3 slides per embryo). At least 260 GFP^+ neurons were counted per embryo.

Syntheses and analytical characterization of designed TCP inhibitors. Synthesis steps, structure, molecular weight, ^1H and ^{13}C NMR and LC/MS analyses of epoY (**A**), alkyne-epoY (**B**), epoEY (**C**) and epoEEY (**D**).

A. epoY

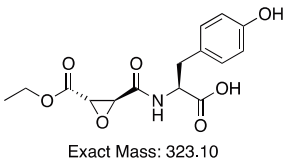


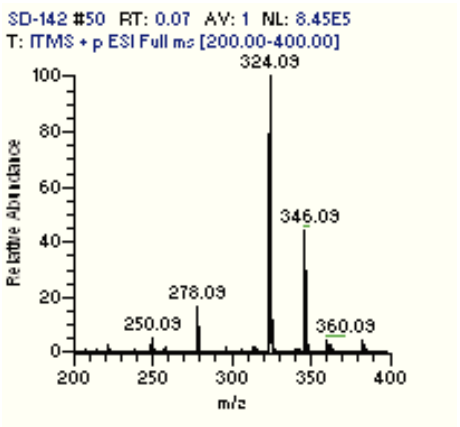


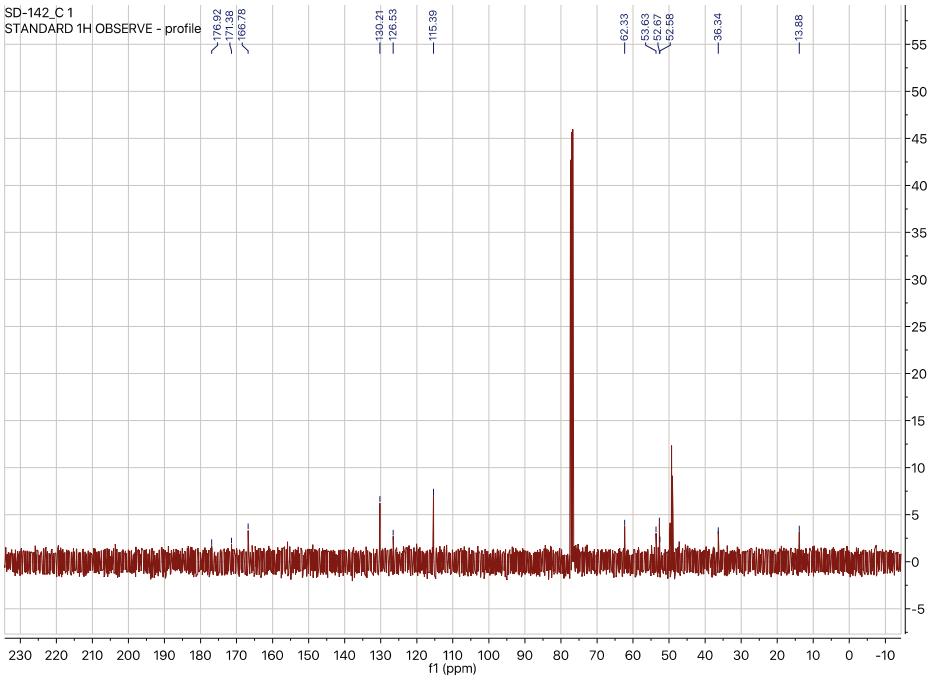
Synthesis of SD-139, (2S,3S)-ethyl 3-(S)-1-(tert-butoxy)-3- (4-hydroxyphenyl)-1-oxopropan-2-yl) carbamoyl)oxirane-2-carboxylate: To the solution of L-Tyrosine tert-butyl ester (118.6mg, 0.5 mmol), the 3-(ethoxycarbonyl) oxirane-2-carboxylic acid (80 mg, 0.5 mmole) and and *N*-methylmorpholine (87 mg, 0.75 mmol) in dry THF (10 mL) was added EDC (115 mg, 0.6 mmol) and HOBt (81 mg, 0.6 mmol) in portions at 0 ^{0}C. The reaction mixture was stirred at room temperature (rt) for 12 hours (hrs). After monitoring disappearance of starting material by LC-MS, the mixture was concentrated under reduced pressure. The concentrated residue was purified by flash column chromatography over silica gel with (eluent: 2-10 % of MeOH in DCM) to afford **SD-139** as a colorless solid (138 mg, 73 %).

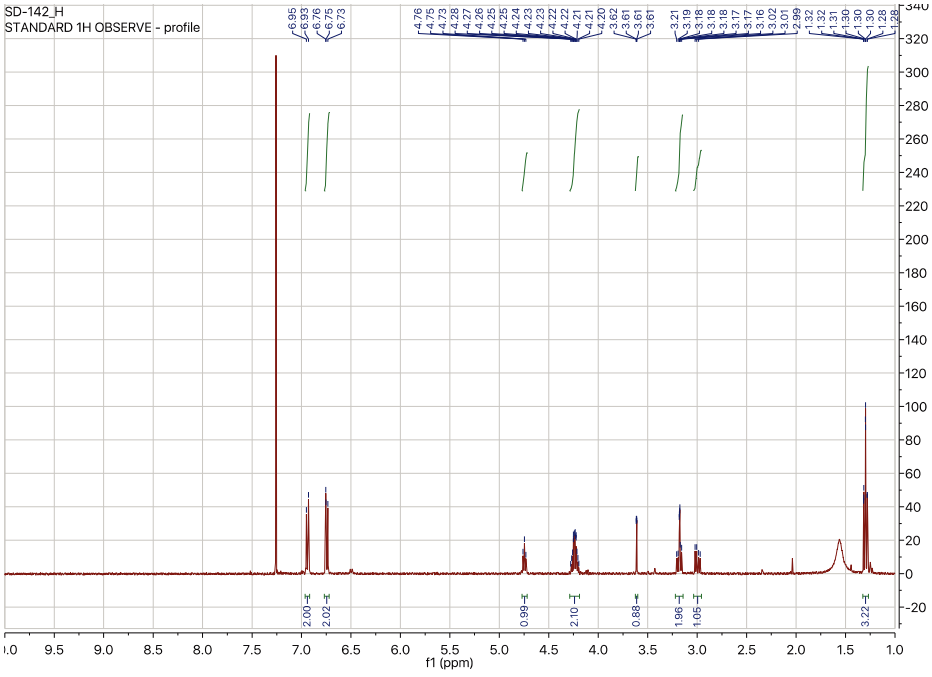
Synthesis of epoY (SD-142), (S)-2-((2S,3S)-3-(ethoxycarbonyl) oxirane -2-carboxamido)-3-(4-hydroxyphenyl) propanoic acid: The t-Butyl group was removed by incubation with 30% TFA/DCM(v/v) for 2 hrs. The progress of reaction was monitored by LC-MS. After completion of reaction, the solvent was evaporated under vacuum and the product was then co-evaporated with toluene to afford **epoY (SD-142)** as a colorless solid (90 mg, 91 %).

^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 6.94 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.77 – 6.72 (m, 2H), 4.75 (q, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.28 – 4.19 (m, 2H), 3.61 (dd, *J* = 1.9, 0.6 Hz, 1H), 3.22 – 3.15 (m, 2H), 3.00 (dd, *J* = 14.1, 6.3 Hz, 1H), 1.30 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, cdcl$_3$) δ 176.92, 171.38, 166.78, 130.21, 126.53, 115.39, 62.33, 53.63, 52.67, 52.58, 36.34, 13.88. MS (ESI) m/z: calcd: $[M+H]^+$ 324.1, measured: $[M+H]^+$ 324.09

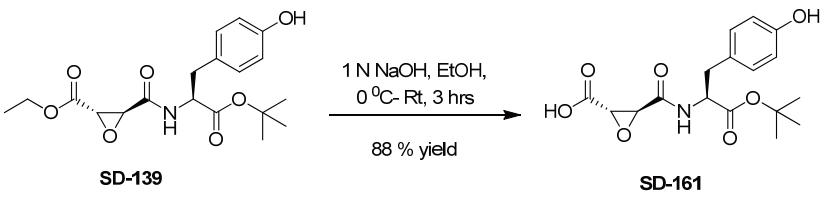




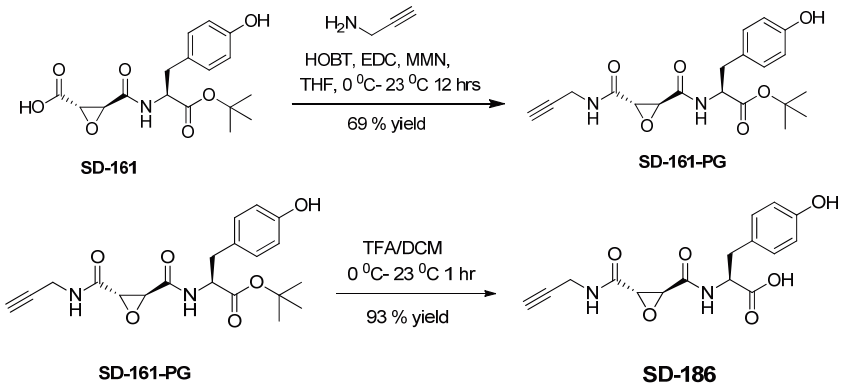




B. alkyne-epoY



SD-139 **SD-161**

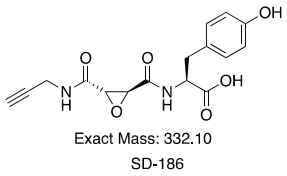


Synthesis of SD-161 **(2S,3S)-3-(S)-1-(tert-butoxy)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-oxopropan-2-yl)carbamoyl)oxirane-2-carboxylic acid**: to an ice cooled solution of SD-139 (75 mg, 0.2 mmol) in ethanol (2 mL) was added drop wise a solution of potassium hydroxide (13 mg, 0.24 mmol) in ethanol (1 mL) over 15 min. After this addition the reaction mixture was allowed to stir in ice for 1 hour. The cooling bath was then removed and the reaction mixture was stirred for further 2 hrs at room temperature. Afterwards the ethanol was removed under reduced pressure leaving an off white solid. This salt was then taken up with 5 mL of water and washed three times with dichloride methane. The aqueous phase was acidified by addition of concentrated hydrochloric acid to pH 3.0 and extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phase was dried over magnesium sulphate and concentrated under reduced pressure. After freeze drying the pure product was obtained as a colorless solid (62 mg, 88% yield).

Synthesis of SD-161-PG **(S)-tert-butyl 3-(4-hydroxyphenyl)-2-((2S,3S)-3-(prop-2-yn-1-ylcarbamoyl)oxirane-2-carboxamido) propanoate:** To the solution acid SD-161 (60 mg, 0.17 mmol), the propargylamine (10 mg, 0.17 mmole) and and *N*-methylmorpholine (20 mg, 0.25 mmol) in dry THF (5 mL) was added EDC (191.7 mg, 0.20 mmol) and HOBt (27 mg, 0.20 mmol) in portions at 0 ^{0}C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h. After monitoring disappearance of starting material by LC-MS, the mixture was concentrated under reduced pressure. The concentrated residue was purified by flash column chromatography over silica gel with (eluent : 2-10 % of MeOH in DCM) to afford **SD-161-PG** as a colorless gum like solid (46 mg, 69 %).

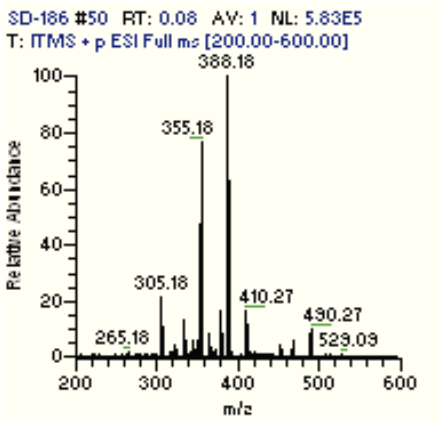
<u>Synthesis of Alkyne-epoY (SD-186)</u> (S)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-((2S,3S)-3-(prop-2-yn-1-ylcarbamoyl) oxirane-2-carboxamido) propanoic acid: The t-Butyl group was removed by incubation with 30% TFA/DCM (v/v) for 2 hrs at room temperature. The progress of reaction was monitored by LC-MS. After completion of reaction, the solvent was evaporated under vacuum and the product was then co-evaporated with toluene to afford **Alkyne-epoY** (**SD-186)** as a colorless solid (31 mg, 93 %).

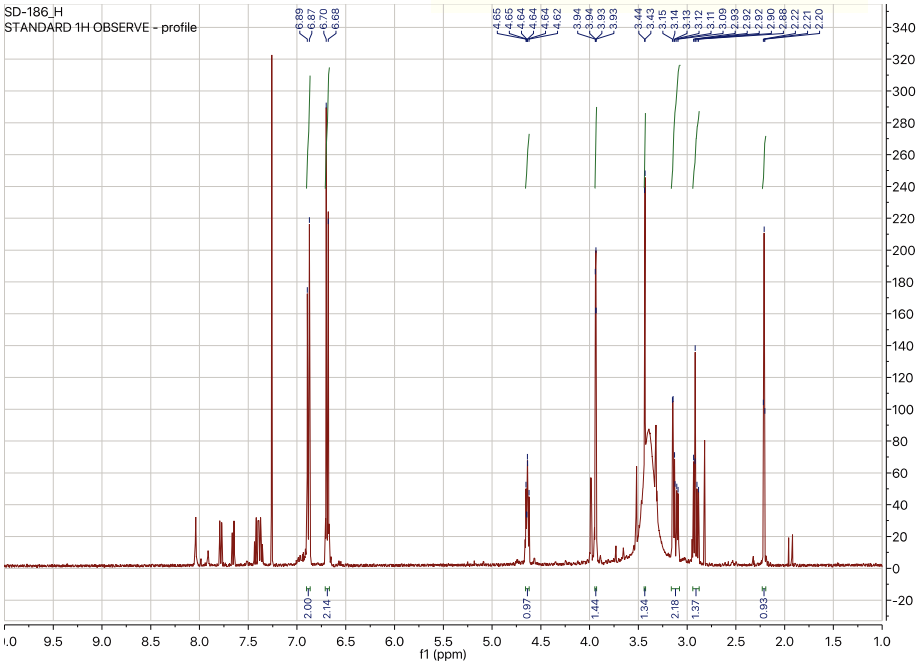
^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 6.91 – 6.86 (m, 2H), 6.72 – 6.66 (m, 2H), 4.64 (ddd, *J* = 6.7, 5.5, 3.1 Hz, 1H), 3.94 (dd, *J* = 2.6, 0.8 Hz, 1H), 3.43 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 3.17 – 3.08 (m, 2H), 2.94 – 2.88 (m, 1H), 2.21 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, cdcl$_3$) δ 172.80, 166.86, 166.05, 155.80, 130.20, 126.60, 115.43, 78.37, 71.73, 54.06, 53.98, 52.72, 36.20, 28.65. MS (ESI) m/z: calcd: $[M+H]^+$ 333.1, measured: $[M+Na]^+$ 355.18

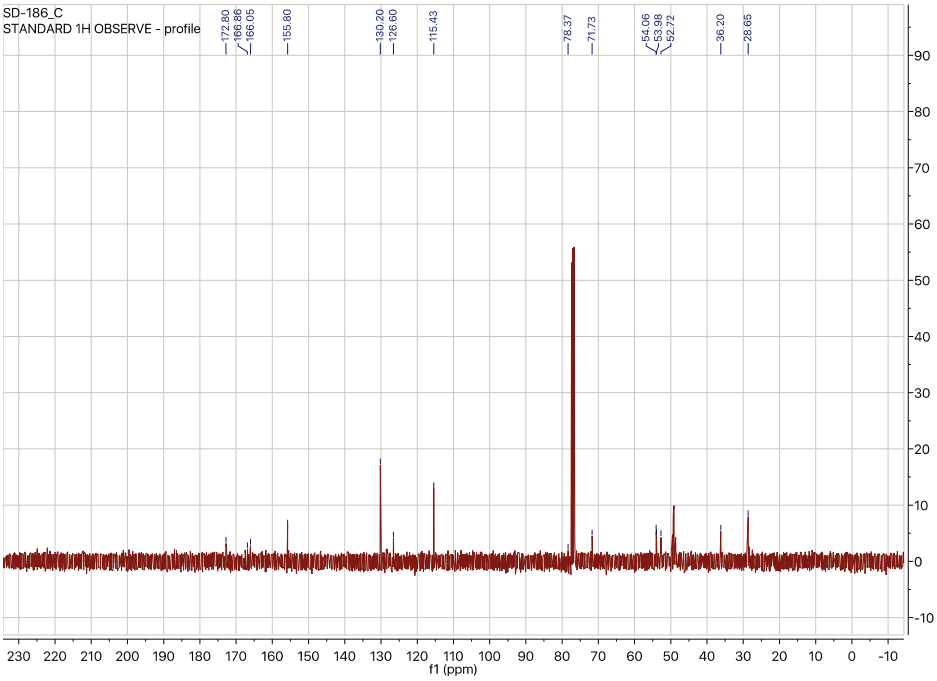


Exact Mass: 332.10

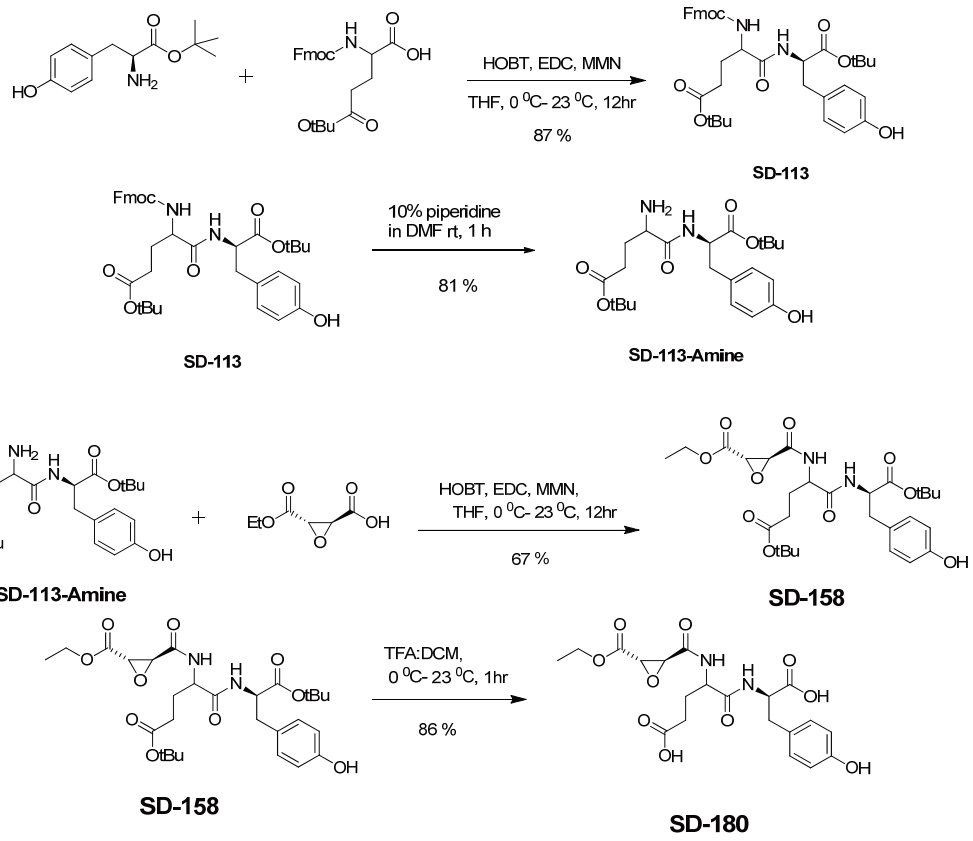
SD-186







C. epoEY



<u>Synthesis of SD-139</u> (2S,3S)-ethyl 3-(S)-1-(tert-butoxy)-3- (4-hydroxyphenyl)-1-oxopropan-2-yl) carbamoyl)oxirane-2-carboxylate: To the solution of L-Tyrosine tert-butyl ester (237.2 mg, 1

mmol), the Fmoc-Glu(OtBu)-OH (425 mg, 1 mmole) and and *N*-methylmorpholine (175 mg , 1.5 mmol) in dry THF (15 mL) was added EDC (229 mg, 1.2 mmol) and HOBt (162 mg, 1.2 mmol) in portions at 0 ^{0}C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h. After monitoring disappearance of starting material by LC-MS, the mixture was concentrated under reduced pressure. The concentrated residue was purified by flash column chromatography over silica gel with (eluent: 1-10 % of MeOH in DCM) to afford **SD-157** as a colorless solid (560 mg, 87 %).

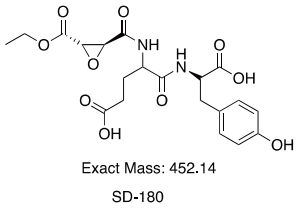
Synthesis of SD-113-Amine **tert-butyl 4-amino-5-(R)-1-(tert-butoxy)-3-(4-hydroxyphenyl) -1-oxopropan-2-yl)amino)-5-oxopentanoate**: The Fmoc of **SD-113** was removed with 20% piperidine/DMF (v/v) for 30 min. The progress of reaction was monitored by LC-MS. After completion of reaction, the solvent was evaporated under vacuum and the crude mixture was purified by flash column chromatography over silica gel with (eluent: 1-10 % of MeOH in DCM with drop of TEA) to afford **SD-113_Amine** as a colorless solid (171 mg, 81 %).

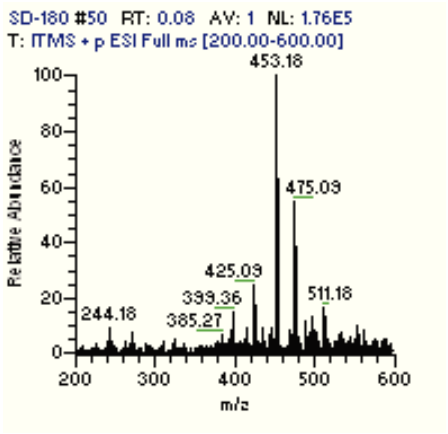
Synthesis of SD-158: **(2S,3S)-ethyl 3-((5-(tert-butoxy)-1-(((R)-1-(tert-butoxy)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-oxopropan-2-yl)amino)-1,5-dioxopentan-2-yl)carbamoyl) oxirane-2-carboxylate.** Compound **SD-158** was synthesized from **SD-113-Amine** (150 mg, 0.35 mmol) by following the same procedure described for the synthesis of **SD-139** to afford **SD-158** as white solid (132 mg, 67%).

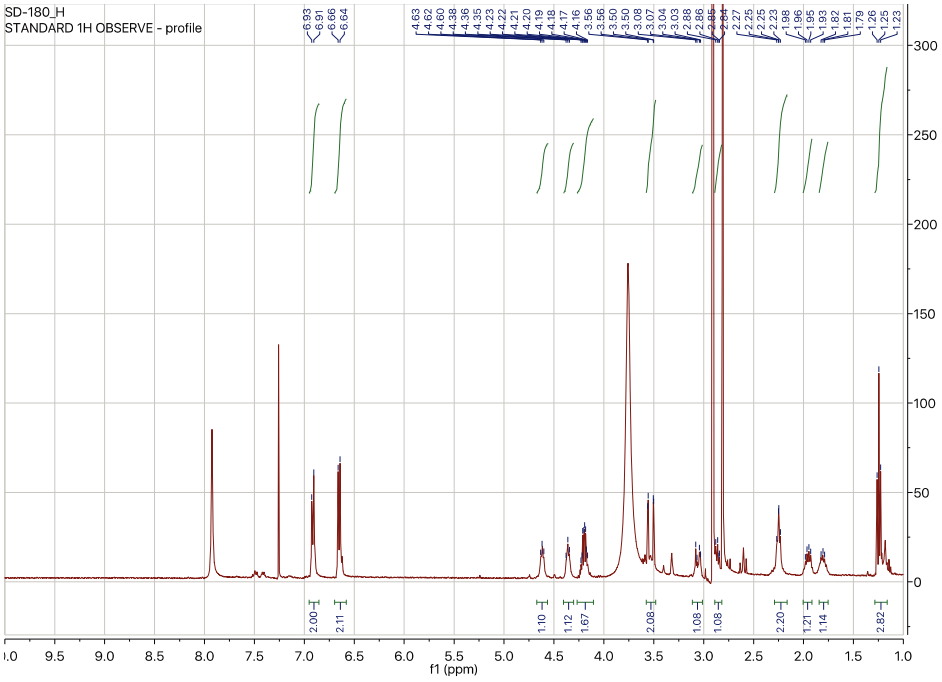
Synthesis of epoEY (SD-180): Compound SD-180 was synthesized from SD-158 (50 mg, 0.08 mmol) by following the same standard procedure described for the *t*-Butyl deprotection in the synthesis of SD-142 to afford **epoEY** (**SD-180)** as white solid (31 mg, 86%).

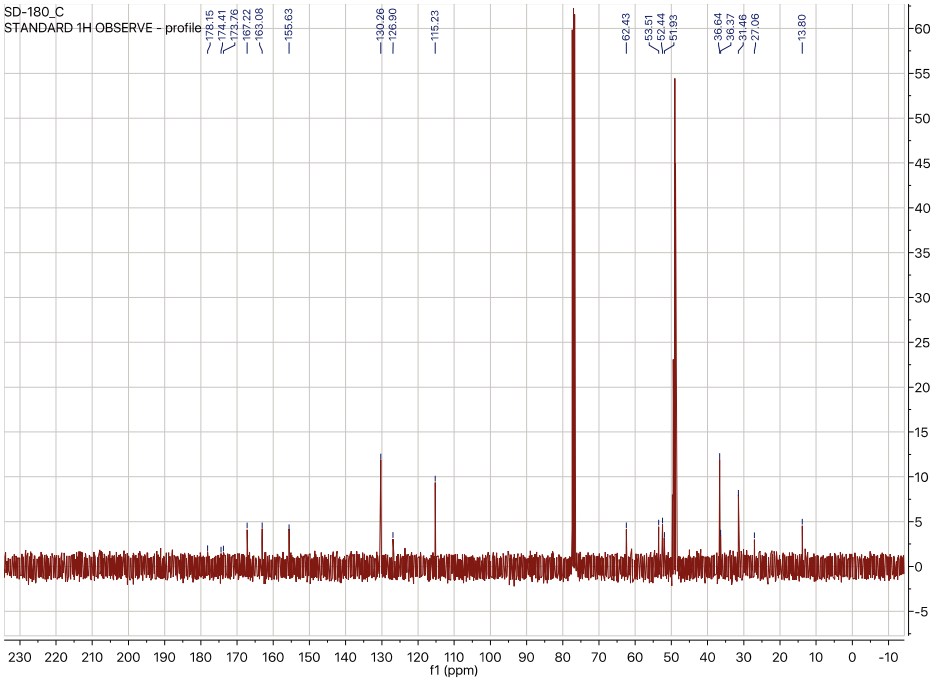
^{1}H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 6.94 – 6.87 (m, 2H), 6.65 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 4.62 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.35 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.19 (qt, *J* = 7.8, 4.0 Hz, 2H), 3.53 (dd, *J* = 22.0, 1.7 Hz, 2H), 3.06 (dd, *J* = 14.2, 5.2 Hz, 1H), 2.89 – 2.82 (m, 0H), 2.32 – 2.21 (m, 2H), 2.01 – 1.90 (m, 1H), 1.80 (dd, *J* = 14.5, 7.7 Hz, 1H), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). 13C NMR (101 MHz, cdcl3) δ 178.15, 174.41,

173.76, 167.22, 163.08, 155.63, 130.26, 126.90, 115.23, 62.43, 53.51, 52.44, 51.93, 36.64, 36.37, 31.46, 27.06, 13.80. MS (ESI) m/z: calcd: $[M+H]^+$ 453.14, measured: $[M+H]^+$ 453.18

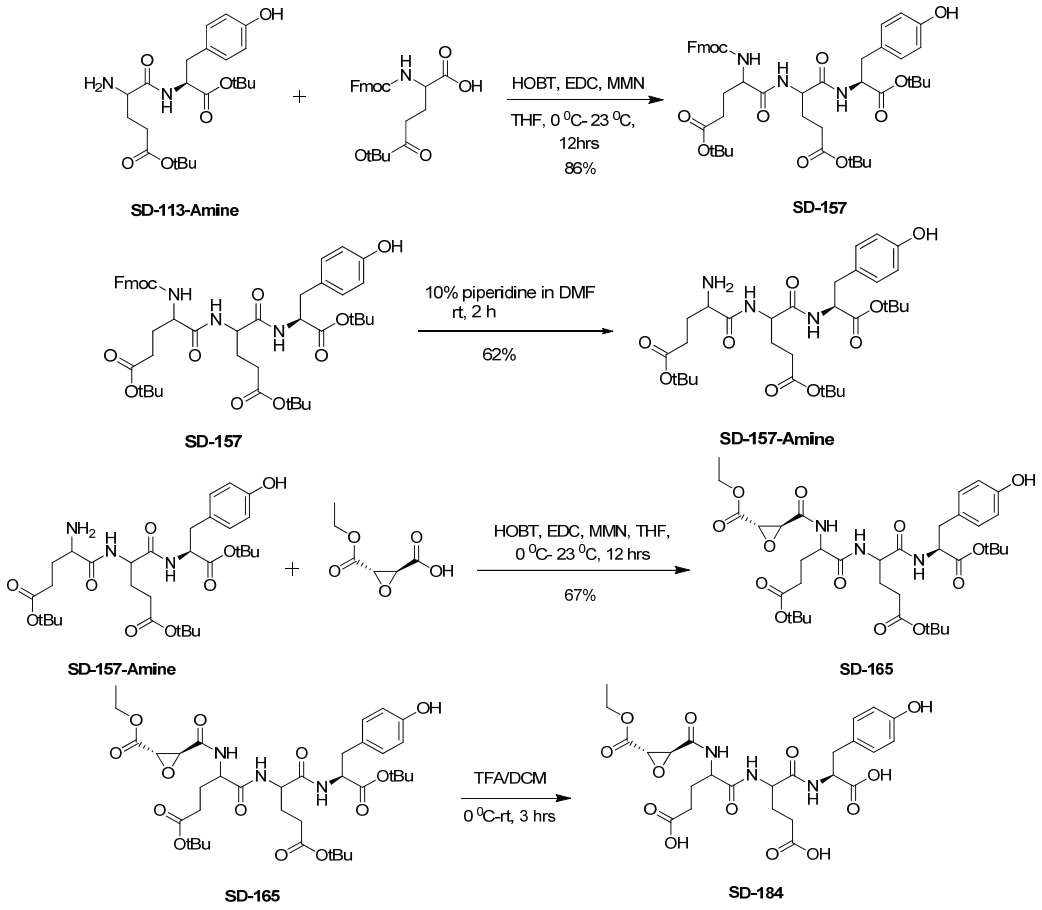








D. epoEEY



Synthesis of SD-157 **tert-butyl 5,8-bis(3-(tert-butoxy)-3-oxopropyl)-1-(9H-fluoren-9-yl)-11-(4-hydroxybenzyl)-3,6,9-trioxo-2-oxa-4,7,10-triazadodecan-12-oate**: To the solution of SD-113-Amine (211 mg, 0.5 mmol), the Fmoc-Glu(OtBu)-OH (212 mg, 0.5 mmole) and *N*-methylmorpholine (87 mg, 0.75 mmol) in dry THF (10 mL) was added EDC (115 mg, 0.6 mmol) and HOBt (81 mg, 0.6 mmol) in portions at 0 ^{0}C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h. After monitoring disappearance of starting material by LC-MS, the mixture was concentrated under reduced pressure. The concentrated residue was purified by flash column chromatography over silica gel with (eluent: 1-10 % of MeOH in DCM) to afford **SD-157** as a colorless solid (289 mg, 69 %).

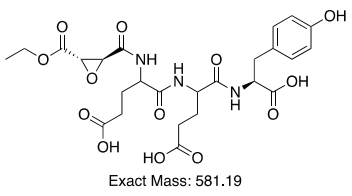
Synthesis of SD-157-Amine **tert-butyl 4-amino-5-((5-(tert-butoxy)-1-(S)-1-(tert-butoxy)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-oxopropan-2-yl)amino)-1,5-dioxopentan-2-yl)amino)-5-oxopentanoate:** The Fmoc of **SD-157** was removed with 20% piperidine/DMF (v/v) for 30 min. The progress of reaction

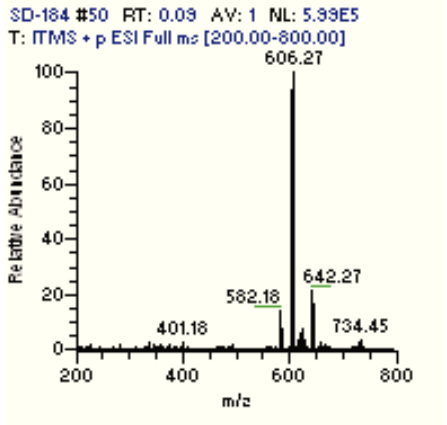
was monitored by LC-MS. After completion of reaction, the solvent was evaporated under vacuum and the crude mixture was purified by flash column chromatography over silica gel with (eluent: 1-10 % of MeOH in DCM with drop of TEA) to afford **SD-157-Amine** as a colorless solid (90 mg, 62 %).

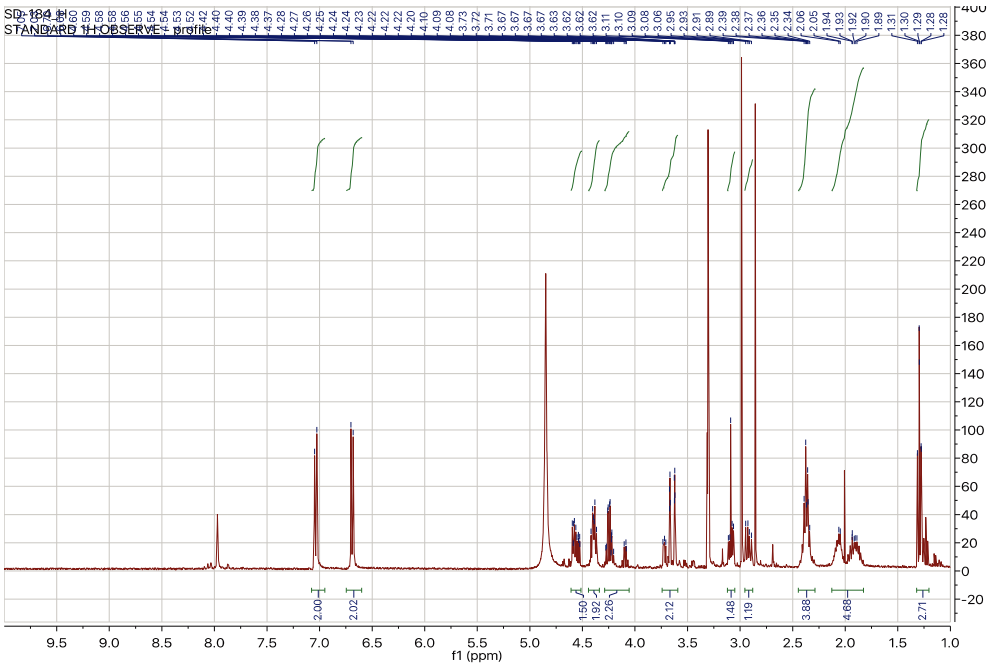
Synthesis of SD-165 **(2S,3S)-ethyl 3-(((5S)-8-(3-(tert-butoxy)-3-oxopropyl)-5-(4-hydroxybenzyl)-2,2,16,16-tetramethyl-4,7,10,14-tetraoxo-3,15-dioxa-6,9-diazaheptadecan-11-yl)carbamoyl)oxirane-2-carboxylate:** Compound SD-**165** was synthesized from **SD-157**-Amine (90 mg, 0.14 mmol) by following the same procedure described for the synthesis of **SD-139** to afford **SD-165** as white solid (70 mg, 67%).

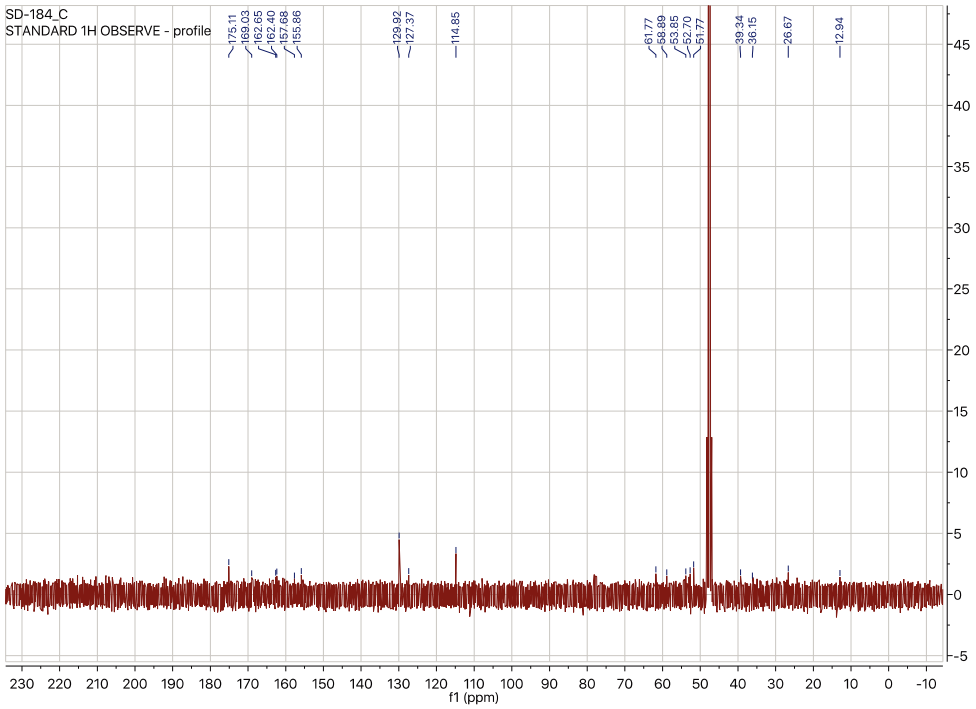
Synthesis of epoEEY (SD-184) **5-((4-carboxy-1-(((S)-1-carboxy-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl)amino)-1-oxobutan-2-yl)amino)-4-((2S,3S)-3-(ethoxycarbonyl)oxirane-2-carboxamido)-5-oxopentanoic acid:** The t-Butyl groups of SD-165 was removed by incubation with 30% TFA/DCM(v/v) for 2hrs. The progress of reaction was monitored by LC-MS. After completion of reaction, the solvent was evaporated under vacuum and the product was then co-evaporated with toluene to afford epoEEY (**SD-184)** as a colorless solid (35 mg, 91 %).

^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-d4) δ 7.04 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.73 – 6.64 (m, 2H), 4.61 – 4.52 (m, 1H), 4.39 (dt, *J* = 8.8, 5.7 Hz, 2H), 4.25 (qd, *J* = 7.1, 1.9 Hz, 1H), 4.31 – 4.06 (m, 1H), 3.65 (ddd, *J* = 18.3, 1.8, 0.6 Hz, 2H), 3.09 (dd, *J* = 14.1, 5.3 Hz, 1H), 2.92 (dd, *J* = 14.1, 8.0 Hz, 1H), 2.45 – 2.29 (m, 4H), 2.13 – 1.99 (m, 1H), 1.98 – 1.83 (m, 2H), 1.32 – 1.20 (m, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, cd_3od) δ 175.11, 169.03, 162.65, 162.40, 157.68, 155.86, 129.92, 127.37, 114.85, 61.77, 58.89, 53.85, 52.70, 51.77, 39.34, 36.15, 26.67, 12.94. MS (ESI) m/z: calcd: $[M+H]^+$ 582.19, measured: $[M+H]^+$ 582.18






SD-184_H
STANDARD 1H OBSERVE - profile
f1 (ppm)


SD-184_C
STANDARD 1H OBSERVE - profile
175.11
169.03
162.65
162.40
155.88
155.66
129.92
127.37
114.85
61.77
59.69
53.85
52.70
51.77
39.34
36.15
26.67
12.94
f1 (ppm)

Authors Contributions

CA performed all biochemistry experiments (Figs 1, 2, S1-S4) and succeeded to identify brain TCP. AB initially developed TCP enzyme enrichment steps and TCP activity assays. KR and JVD originally designed and developed the method for using the C-terminal amino acid sequence of α-tubulin for inhibition of TCPase activity. KR and JVD initially considered TCP enzymes as having reactive cysteine(s) and performed functional characterization of peptide based inhibitors. MB designed the covalent inhibitors used to purify brain TCP. SS and NA synthesized and performed analytical characterization of the TCP inhibitors. LS together with CA worked out labeling and purification methods using the covalent inhibitors. YC performed the mass spectrometry-based proteomic analyses. CB engineered all DNA constructs and prepared all the figures. LaP performed RT-qPCR experiments. LeP, PH and MJM performed the experiments with neurons, LeP analyzed them assisted by PH, and LeP performed the statistical analyses. ED and BB developed AutoNeuriteJ macro used for neuron morphometric analysis. JLF electropored mouse embryos and CA quantified cortical neurons migration. FV assisted everybody for plasmids amplifications and basic biochemistry. MJM oversaw the entire project and assisted with data interpretation. AA, CB, CD, LL and SH provide intellectual inputs to the project. CA, MJM and MB wrote the manuscript with the contribution of all co-authors.

A

Fraction	Purification step	Volume (ml)	Protein amount (mg)	Total activity (µmole)	Specific activity (µmole/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
I	Brain homogenate	70	338.56	1.41	0.004	-	100
II	Ammonium Sulfate	7	39.35	3.77	0.096	23	267
III	Q sepharose	20	15.03	3.17	0.211	51	225
IV	SP sepharose	6	0.09	0.14	1.533	368	10

B

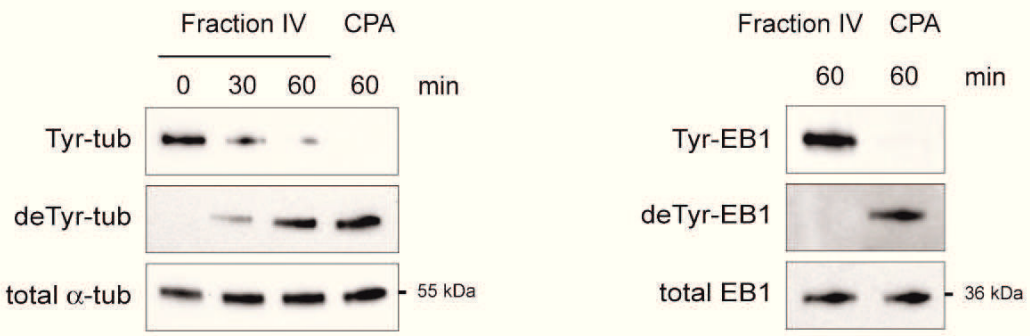


Fig. S1. TCP enriched fraction prefers tubulin as substrate. (A) Table of enzyme enrichment steps from mouse brain tissue. Detyrosination activity from equal volumes of the various fractions was estimated by measuring tyrosine released from [^{14}C]-tyrosine labeled microtubules (2 µM) after 45 min incubation. **(B)** Detyrosination of tubulin and EB1 (5 µM) by fraction IV revealed by immunoblot. A reaction with carboxypeptidase A (CPA) was used as positive control.

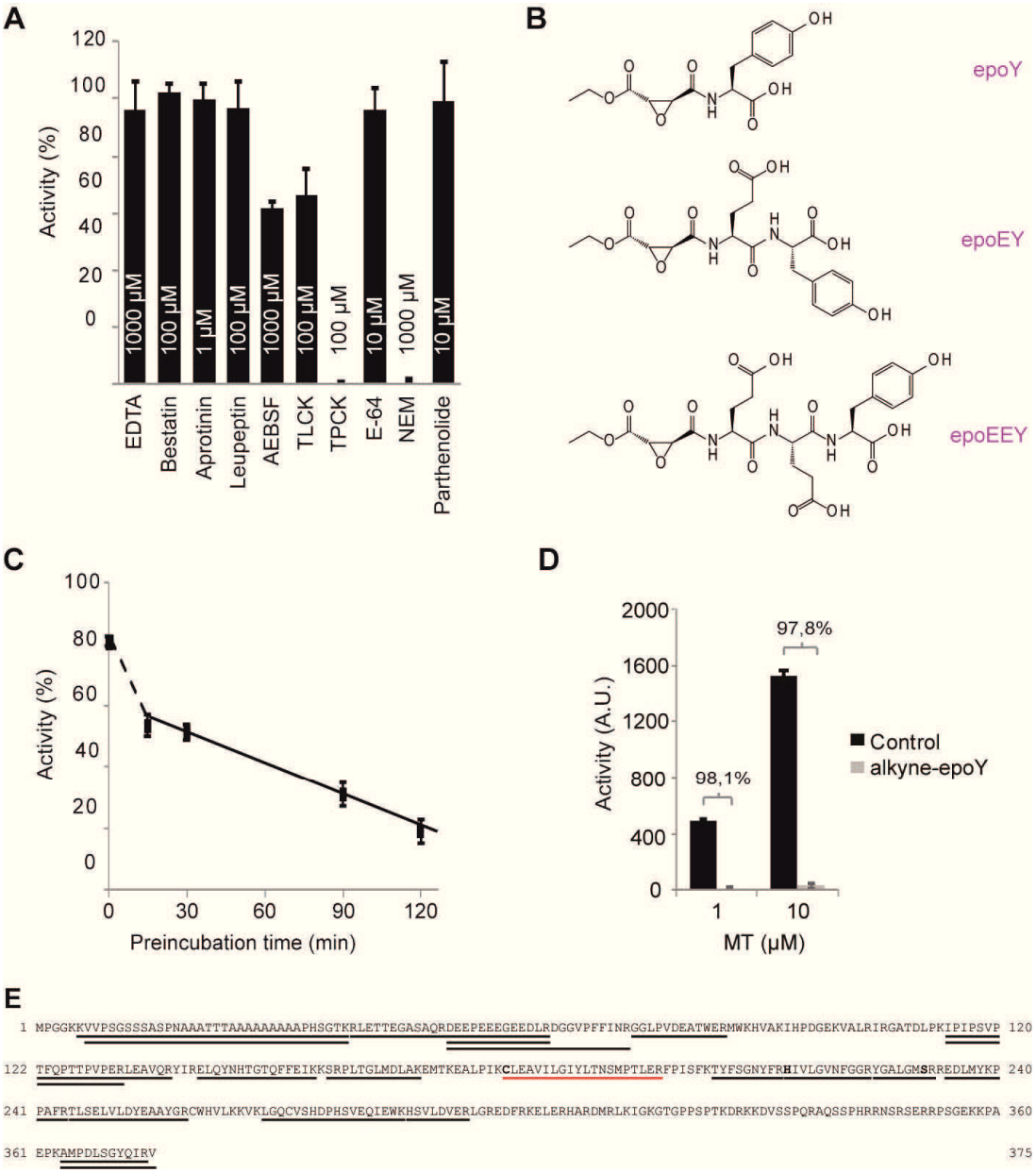


Fig. S2. Inhibition and identification of mouse brain TCP. (A) Screening of proteases inhibitor potencies on the activity of the enzyme-enriched fraction prepared by the quick enrichment protocol. Inhibitors were used at the supplier's highest advised concentration. Results with inhibitors are expressed as percentage of the activity in the control (mean ± SD, n = 3-5). (**B**) Structure of designed inhibitors, EpoY, epoEY and epoEEY. **(C)** Time-dependent inhibition of putative TCP by alkyne-epoY. Fraction IV was preincubated with 1 µM alkyne-epoY and detyrosination activity was tested as in A. Results are expressed as the percentage of activity in the control (mean ± SD, n = 3). Increasing the time of pre-incubation with alkyne-epoY enhanced its inhibitory effect, indicative of a covalent reaction between inhibitor and putative TCP. **(D)** Effect of substrate concentration on alkyne-epoY inhibition. Fraction IV was preincubated 3h with 1 µM inhibitor or DMSO (control) before activity measurement on radiolabeled microtubules. Results are expressed as the mean ± SD (n = 3). Increasing levels of microtubules by 10-fold did not restore the tyrosine cleavage activity of inhibited Fraction IV. **(E)** Sequence of mouse vasohibin-1 (VASH1) with all the peptides (underlined in black) identified by mass spectrometry of three independent purifications. The putative catalytic triad

residues are in bold. No vasohibin-1 peptide was found in the three control experiments done with epoY which is not clickable. No peptide carrying the catalytic Cys179 (underlined in red) was identified due to its covalent binding to inhibitor and agarose beads.

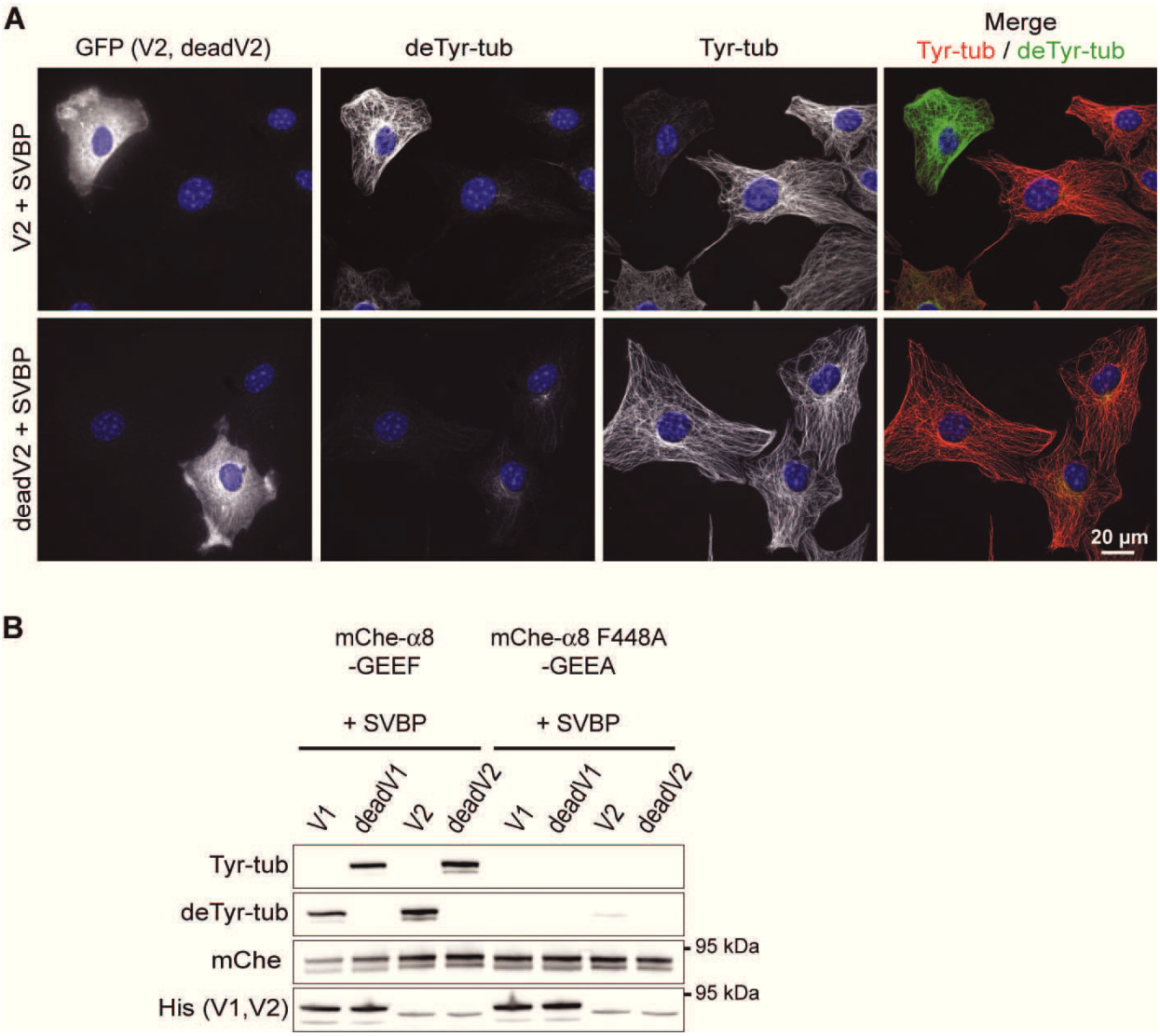


Fig. S3. VASH1 and VASH2 associated to SVBP are potent tubulin Tyr/Phe carboxypeptidases. (**A**) Immunofluorescence analysis of de/tyrosinated α-tubulin pools from MEF cells cotransfected with plasmids encoding active or inactive VASH2 and SVBP (V2 or deadV2, respectively). Carboxypeptidase activity was revealed by immunofluorescence with the same antibodies as in Fig. 2B. Vasohibins were probed with anti-GFP antibody. (**B**) Immunoblot of protein extracts from HEK293T cells expressing mCherry-α8-tubulin, each VASH and SVBP. Native or mutated versions of α8-tubulin, respectively ending with GEEF or GEEA, were used. Levels of de/tyrosinated tubulin were measured as in Fig. 2A. Antibody to mCherry demonstrates same amounts of exogenous α-tubulin.

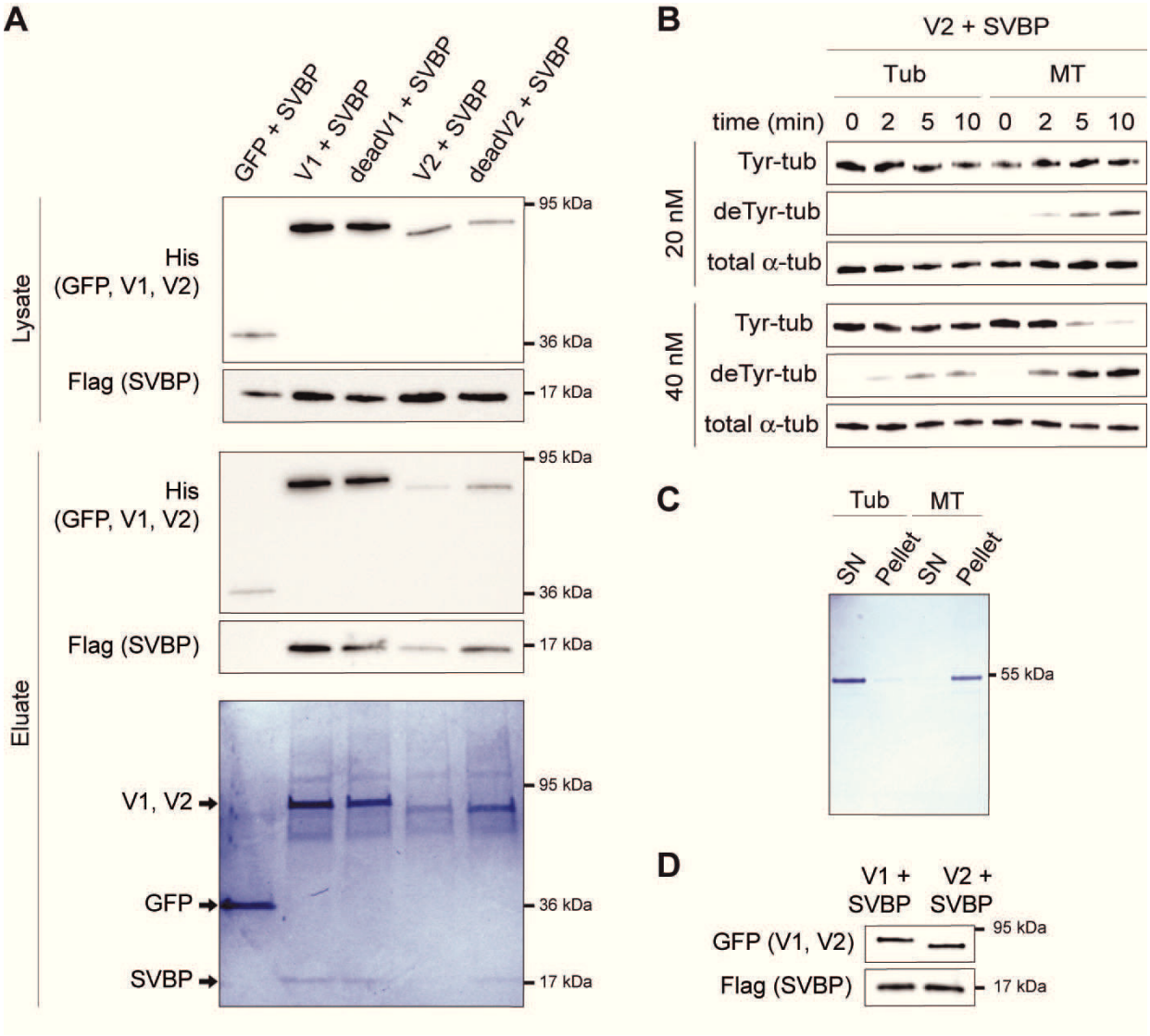


Fig. S4. Purification and properties of VASH/SVBP complexes. (A) Immunoblot analysis (upper panels) and SDS-PAGE (lower panel) of the purification of vasohibin/SVBP complexes. Vasohibins and their catalytic dead versions were co-expressed with SVBP in HEK293T cells as in Fig. 2A and then purified on cobalt resin. A GFP construct (bearing an His-tag) was used as control. GFP and vasohibins were probed with anti-His antibody, and SVBP with anti-Flag antibody. Immunoblot analyses of unpurified (lysate) and purified (eluate) protein extracts and SDS-PAGE of purified protein extract are presented. Note that SVBP (devoid of His-tag) was co-purified with all vasohibins but not with GFP. (**B**) Detyrosination activity of purified VASH2/SVBP complexes on purified brain microtubules or tubulin dimers assessed as in Fig. 2E. (**C**) Control by SDS-PAGE of non-assembled microtubule (tubulin dimers, Tub) or assembled microtubules (MT) used in Figs. 2E and S4B. MT and Tub extract (500 ng) were centrifuged 15 min at 25°C and 200,000 *g*. SN, supernatant. (**D**) Control by immunoblot of VASH1, VASH2 and SVBP amounts used in Figs. 2E and S4B.

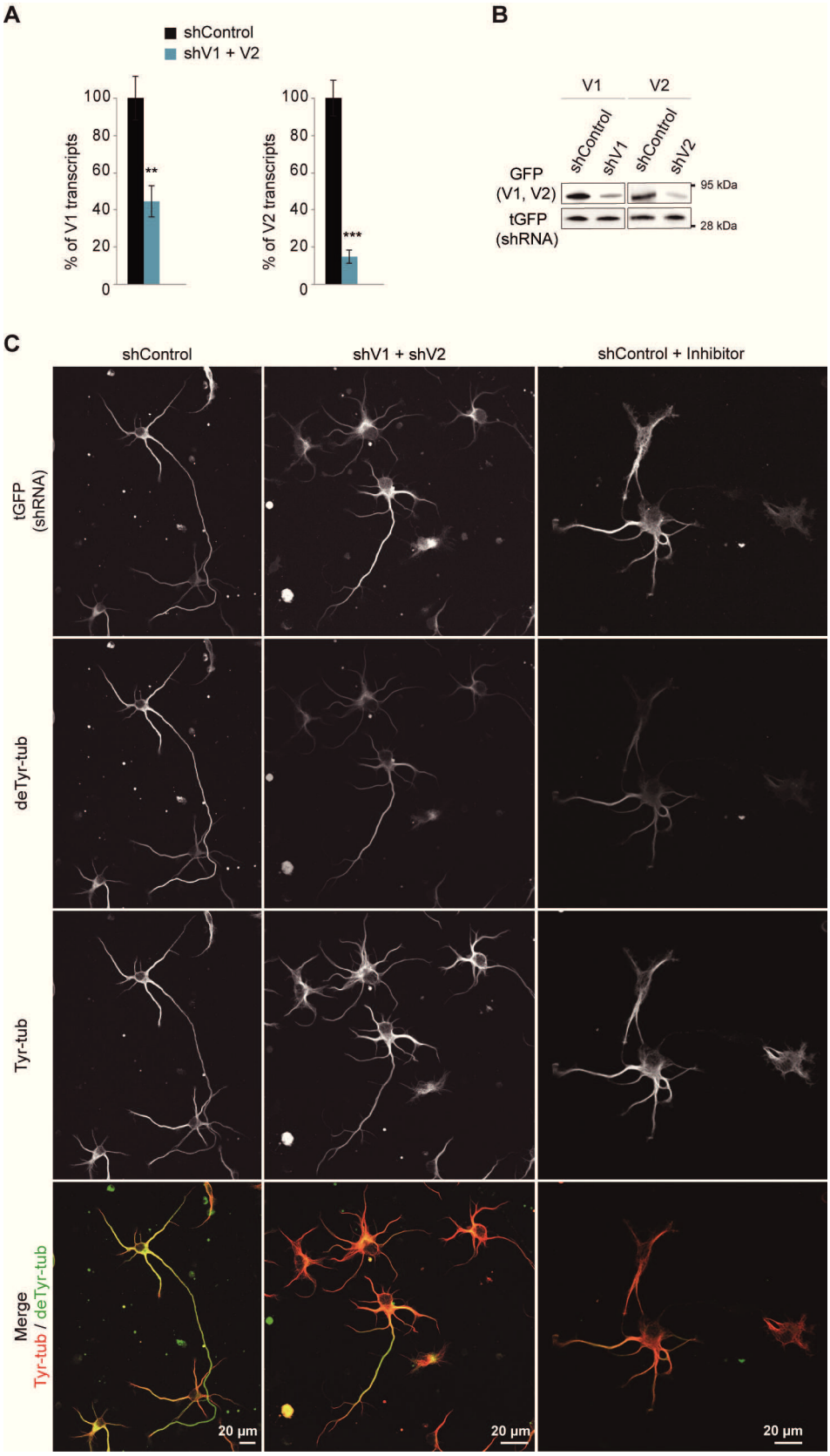


Fig. S5. Down-regulation of VASH1 and VASH2 affects neuronal differentiation. (**A, B**) validation of shRNAs targeting the vasohibins. (**A**) RT-qPCR quantifications of neuronal vasohibins transcripts in the presence of control or VASH1 and VASH2 shRNAs. Mean ± SEM.

Student t test: ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$, n = 4. (**B**) HEK293T cells were co-transfected with plasmids allowing expression of each VASH and of the corresponding shRNA, or of a control shRNA. Crude protein extracts were analyzed by immunoblot with anti-GFP and anti-Flag to test the presence of VASH1/2 and with anti-turboGFP to assay the presence of shRNAs. (**C**) Merge and non-merged immunofluorescence images of Fig. 3D. Tyrosinated and detyrosinated α-tubulin levels were imaged at 2DIV using the same antibodies as in Fig. 2B. Levels of shRNA were imaged using an anti-tGFP antibody. Note that scale bars are different.

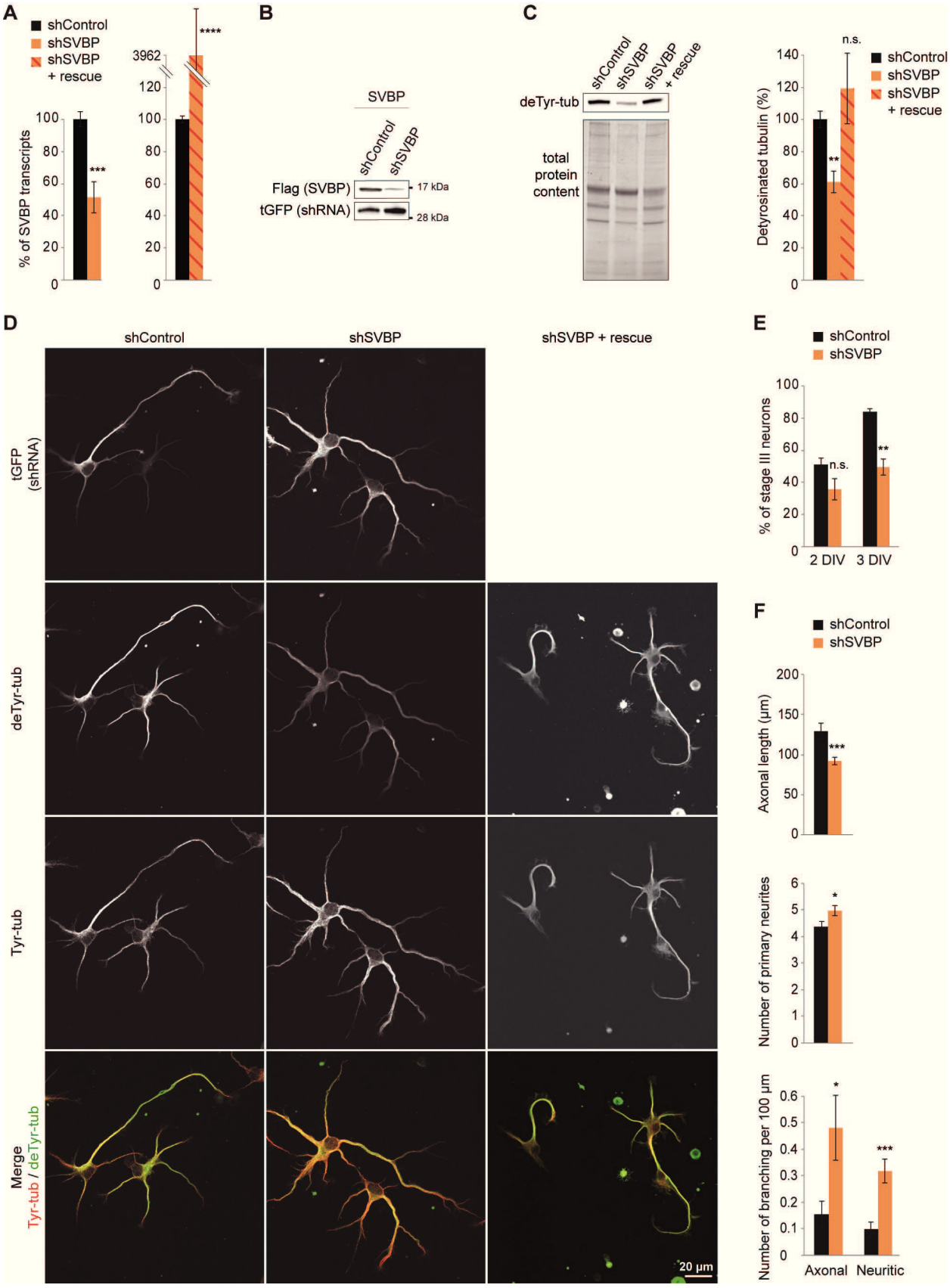


Fig. S6. Down-regulation of SVBP alters neuronal differentiation. (A, B) Validation of SVBP shRNAs. (**A**) RT-qPCR quantifications of neuronal *Svbp* transcripts in the presence of control or

SVBP shRNAs. Mean ± SEM. Student t test: *** $p<0.001$ and **** $p<0.0001$, n = 3-10. (**B**) HEK293T cells were co-transfected with plasmids allowing expression of the protein and of the corresponding shRNA, or of a control shRNA. Crude protein extracts were analyzed by immunoblot with anti-GFP and anti-Flag to test the presence of SVBP, and with anti-turboGFP to assay the presence of shRNAs. (**C**) Immuno-blot analysis of the effect of SVBP down-regulation with or without rescue on detyrosinated α-tubulin levels in neurons. Neurons were transfected by electroporation just before plating with plasmids allowing expression of shRNAs alone or shRNAs and a resistant form of SVBP, and analyzed at 2DIV. (right) Quantification of immunoblots. Results are expressed as percentage of detyrosinated tubulin related to shControl (duplicate immunoblots of independent neuronal cultures, mean ± SEM). Detyrosinated tubulin was significantly reduced in neurons transfected with shSVBP compared to neurons transfected with shControl, and rescued with shRNA-resistant SVBP (One way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test, n = 6 for all, except for shSVBP ± rescue, n = 2). (**D**) Effect of SVBP down-regulation with or without rescue on neurite outgrowth and axonal differentiation of hippocampal neurons transfected as in C. Tyrosinated and detyrosinated α-tubulin levels were imaged at 2DIV using the same antibodies as in Fig. 2B. (**E**) Stage III neurons (bearing an axon) were counted manually on immunofluorescence images (generated as in B) from 3 to 4 different cultures at 2DIV and 3DIV (mean ± SEM, Student *t* test). (**F**) Morphometric analyses of at least 27 neurons (at 2DIV) using AutoNeuriteJ macro (see Material and Methods for details) on immunofluorescence images generated as in B (Student *t* or Mann and Whitney tests). n.s., not significant, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

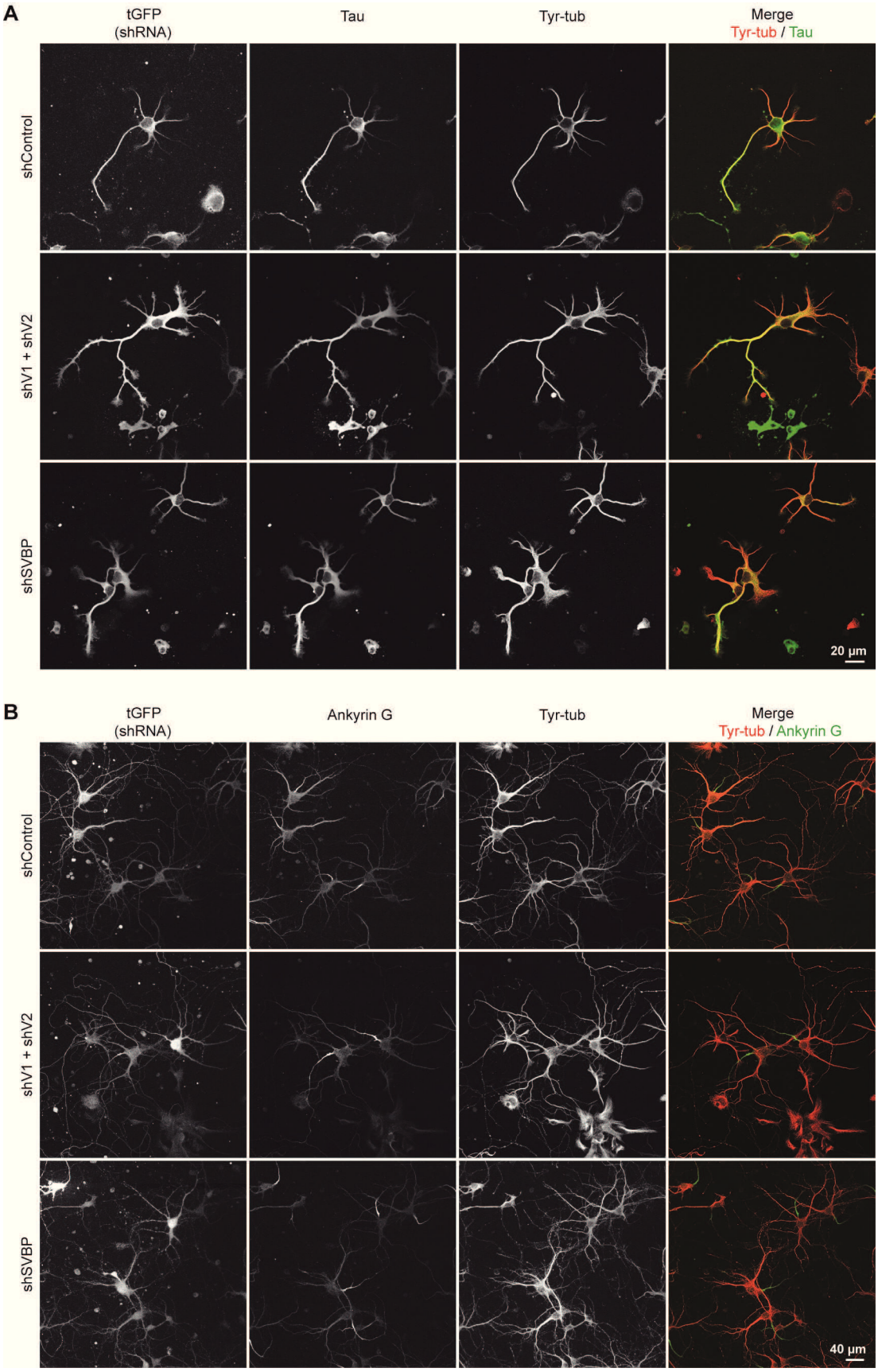


Fig. S7. Effect of vasohibins or SVBP down-regulation on Tau and ankyrin G staining of axons. Neurons were transfected by electroporation with shRNAs associated to turboGFP

(tGFP) cDNA just before plating and analyzed by immunofluorescence for tyrosinated tubulin and Tau contents at 3DIV (**A**) or for tyrosinated tubulin and ankyrin G levels at 10DIV (**B**). Levels of shRNA were imaged using an anti-tGFP antibody.

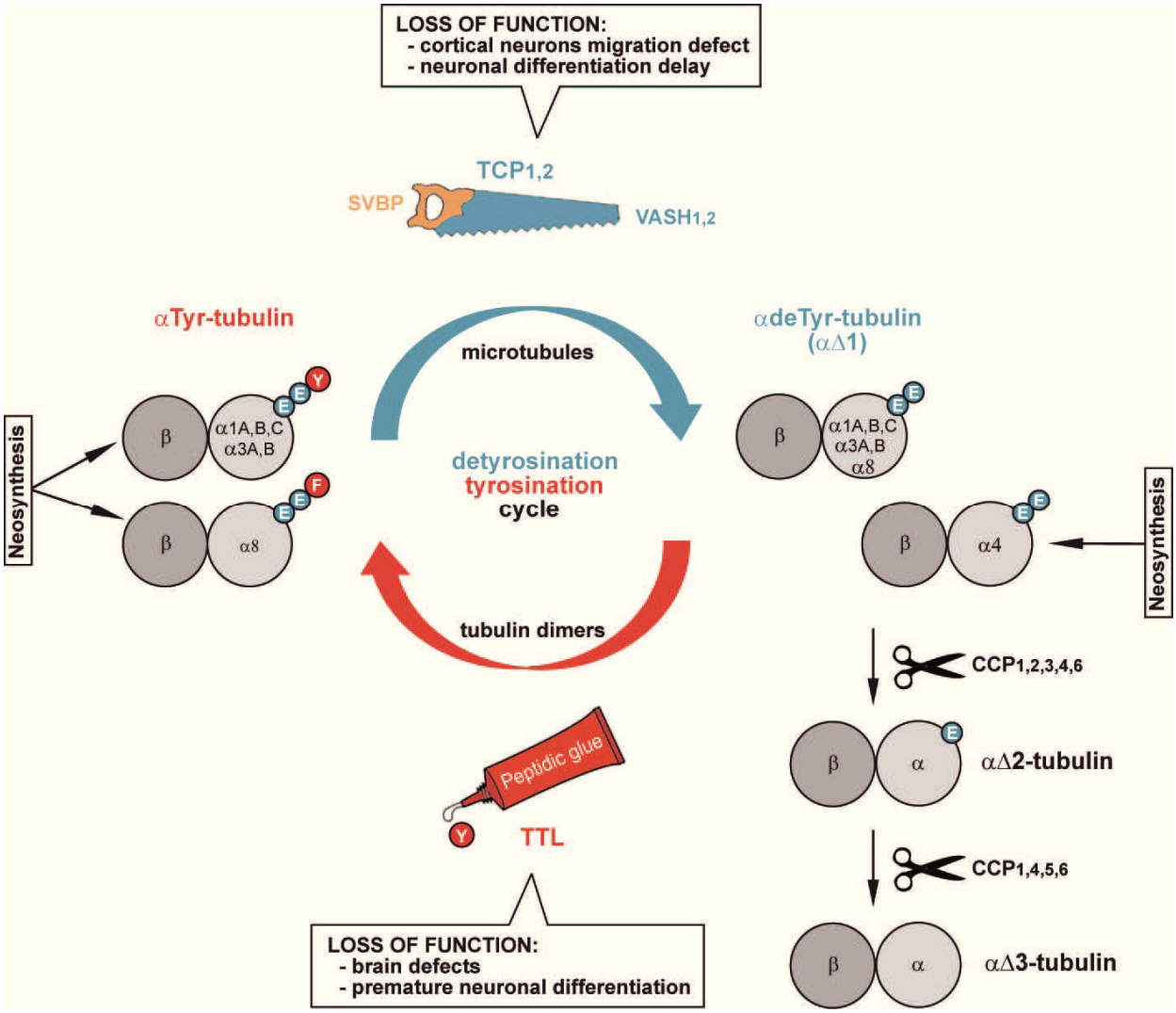


Fig. S8. Detyrosination/tyrosination cycle and implicated enzymes: a central position of tubulin carboxypeptidase (TCP). α-tubulin is usually neosynthesized with a C-terminal aromatic residue, tyrosine for most genes or phenylalanine for α8 gene (*34*). α-tubulin can enter into the de/tyrosination cycle when the αβ-tubulin dimer incorporates a microtubule and becomes a TCP substrate. TCP removes the last aromatic residue generating microtubule bearing detyrosinated α-tubulin (or αΔ1-tubulin). Detyrosinated α-tubulin pool can also be fed by the direct neosynthesis from α4 gene coding for an α-tubulin without last aromatic residue. To complete the cycle, the microtubule depolymerizes and liberates detyrosinated dimers which can be re-tyrosinated by tubuline tyrosine ligase (TTL). Whereas TTL enzyme consists of a single protein, TCP enzymes discovered in the present study comprise a catalytic unit (vasohibin) and an accessory protein (SVBP, small vasohibin-binding protein). Due to a duplication event of an ancestral vasohibin gene, vertebrates possess two TCP catalytic subunits, vasohibin-1 (VASH1) and vasohibin-2 (VASH2). Detyrosinated α-tubulin is the source of other modifications. Penultimate and ante-penultimate glutamate residues can be sequentially processed by the CCP family enzymes to generate αΔ2- and αΔ3-tubulin, respectively (*35-37*)

Peptide	Start	Stop	Best Mascot Score	TCP-R1	TCP-R2	TCP-R3
KVVPSGSSSASPNAAATTTAAAAAAAAAPHSGTK	6	39	27.48	1	-	-
VVPSGSSSASPNAAATTTAAAAAAAAAPHSGTK	7	39	58.66	2	-	1
RLETTEGASAQRDEEPEEEGEEDLR	40	64	44.40	2	-	-
DEEPEEEGEEDLR	52	64	92.22	2	-	1
DEEPEEEGEEDLRDGGVPFFINR	52	74	60.40	2	-	-
GGLPVDEATWER	75	86	59.10	3	-	1
IPIPSVPTFQPTTPVPER	114	131	69.72	3	2	1
IPIPSVPTFQPTTPVPERLEAVQR	114	137	42.11	3	-	-
ELQYNHTGTQFFEIK	141	155	53.71	1	-	-
SRPLTGLMDLAK	157	168	37.63	1	-	-
TYFSGNYFR	205	213	33.69	1	-	-
HIVLGVNFGGR	214	224	36.52	2	-	-
YGALGMSR	225	232	39.87	1	1	1
EDLMYKPPAFR	234	244	28.16	1	-	-
TLSELVLDYEAAYGR	245	259	83.16	3	-	1
LGQCVSHDPHSVEQIEWK	269	286	27.42	-	1	-
HSVLDVER	287	294	42.80	-	-	1
AMPDLSGYQIR	364	374	51.10	1	-	-
AMPDLSGYQIRV	364	375	48.64	1	-	-

Table S1. Vasohibin-1 peptides identified by mass spectrometry-based analysis (see Table S2 for detailed proteomic analyses). Numbering of start and stop amino acids is according accession number NP_796328. Numbers of spectral counts (SC) are indicated for each of the 3 independent fractions prepared using the clickable inhibitor (TCP-R1 to TCP-R3). Lower amounts of purified brain extract were used in R2 and R3 than in R1 (3- and 2-fold, respectively).

Table S2. Proteomic analyses of mouse brain clicked proteins (Auxiliary Table). The protein contents of 3 independently prepared replicates using either the clickable inhibitor (TCP-R1 to TCP-R3) or the unclickable inhibitor (Ctrl-R1 to Ctrl-R3) were analyzed by mass spectrometry-based proteomics. Lower amounts of purified brain extract were used in R2 and R3 than in R1 (3- and 2-fold, respectively). For each identified protein are given the entry, accession, protein and gene names extracted from the Uniprot knowledgebase, and the validated number of peptides (Pep), spectral counts (SC) and specific spectral counts (SSC) observed in each sample. Replicates with SSC = 0 despite SC > 0 were not considered (grey). To evidence proteins enriched in the replicates prepared with the clickable inhibitor, ratios of SSC (SSC TCP-R / SSC Ctrl-R) were calculated. Proteins exhibiting a SSC $\geqslant$ 3 and identified only in TCP samples or enriched at least 5 fold in TCP samples compared to corresponding Ctrl samples were considered as enriched in TCP samples (green). Among the 124 proteins enriched in TCP sample in at least one replicate, Vasohibin-1 (yellow) is the only protein enriched in all three replicates.

References and Notes

1. H. S. Barra, C. A. Arce, C. E. Argaraña, Posttranslational tyrosination/detyrosination of tubulin. *Mol. Neurobiol.* **2**, 133–153 (1988). doi:10.1007/BF02935343 Medline

2. C. Erck, L. Peris, A. Andrieux, C. Meissirel, A. D. Gruber, M. Vernet, A. Schweitzer, Y. Saoudi, H. Pointu, C. Bosc, P. A. Salin, D. Job, J. Wehland, A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 7853–7858 (2005). doi:10.1073/pnas.0409626102 Medline

3. A. C. Badin-Larçon, C. Boscheron, J. M. Soleilhac, M. Piel, C. Mann, E. Denarier, A. Fourest-Lieuvin, L. Lafanechère, M. Bornens, D. Job, Suppression of nuclear oscillations in Saccharomyces cerevisiae expressing Glu tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 5577–5582 (2004). doi:10.1073/pnas.0307917101 Medline

4. M. Barisic, R. Silva e Sousa, S. K. Tripathy, M. M. Magiera, A. V. Zaytsev, A. L. Pereira, C. Janke, E. L. Grishchuk, H. Maiato, Mitosis. Microtubule detyrosination guides chromosomes during mitosis. *Science* **348**, 799–803 (2015). doi:10.1126/science.aaa5175 Medline

5. L. Peris, M. Thery, J. Fauré, Y. Saoudi, L. Lafanechère, J. K. Chilton, P. Gordon-Weeks, N. Galjart, M. Bornens, L. Wordeman, J. Wehland, A. Andrieux, D. Job, Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J. Cell Biol.* **174**, 839–849 (2006). doi:10.1083/jcb.200512058 Medline

6. P. Gobrecht, A. Andreadaki, H. Diekmann, A. Heskamp, M. Leibinger, D. Fischer, Promotion of Functional Nerve Regeneration by Inhibition of Microtubule Detyrosination. *J. Neurosci.* **36**, 3890–3902 (2016). doi:10.1523/JNEUROSCI.4486-15.2016 Medline

7. Y. Konishi, M. Setou, Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. *Nat. Neurosci.* **12**, 559–567 (2009). doi:10.1038/nn.2314 Medline

8. S. Marcos, J. Moreau, S. Backer, D. Job, A. Andrieux, E. Bloch-Gallego, Tubulin tyrosination is required for the proper organization and pathfinding of the growth cone. *PLOS ONE* **4**, e5405 (2009). doi:10.1371/journal.pone.0005405 Medline

9. J. P. Kerr, P. Robison, G. Shi, A. I. Bogush, A. M. Kempema, J. K. Hexum, N. Becerra, D. A. Harki, S. S. Martin, R. Raiteri, B. L. Prosser, C. W. Ward, Detyrosinated microtubules modulate mechanotransduction in heart and skeletal muscle. *Nat. Commun.* **6**, 8526 (2015). doi:10.1038/ncomms9526 Medline

10. P. Robison, M. A. Caporizzo, H. Ahmadzadeh, A. I. Bogush, C. Y. Chen, K. B. Margulies, V. B. Shenoy, B. L. Prosser, Detyrosinated microtubules buckle and bear load in contracting cardiomyocytes. *Science* **352**, aaf0659 (2016). doi:10.1126/science.aaf0659 Medline

11. L. Lafanechère, C. Courtay-Cahen, T. Kawakami, M. Jacrot, M. Rüdiger, J. Wehland, D. Job, R. L. Margolis, Suppression of tubulin tyrosine ligase during tumor growth. *J. Cell Sci.* **111**, 171–181 (1998). Medline

12. R. A. Whipple, M. A. Matrone, E. H. Cho, E. M. Balzer, M. I. Vitolo, J. R. Yoon, O. B. Ioffe, K. C. Tuttle, J. Yang, S. S. Martin, Epithelial-to-mesenchymal transition promotes tubulin detyrosination and microtentacles that enhance endothelial engagement. *Cancer Res.* **70**, 8127–8137 (2010). doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4613 Medline

13. S. Belmadani, C. Poüs, R. Ventura-Clapier, R. Fischmeister, P. F. Méry, Post-translational modifications of cardiac tubulin during chronic heart failure in the rat. *Mol. Cell. Biochem.* **237**, 39–46 (2002). doi:10.1023/A:1016554104209 Medline

14. M. E. Hallak, J. A. Rodriguez, H. S. Barra, R. Caputto, Release of tyrosine from tyrosinated tubulin. Some common factors that affect this process and the assembly of tubulin. *FEBS Lett.* **73**, 147–150 (1977). doi:10.1016/0014-5793(77)80968-X Medline

15. A. Bosson, J. M. Soleilhac, O. Valiron, D. Job, A. Andrieux, M. J. Moutin, Cap-Gly proteins at microtubule plus ends: Is EB1 detyrosination involved? *PLOS ONE* **7**, e33490 (2012). doi:10.1371/journal.pone.0033490 Medline

16. M. A. Child, C. I. Hall, J. R. Beck, L. O. Ofori, V. E. Albrow, M. Garland, P. W. Bowyer, P. J. Bradley, J. C. Powers, J. C. Boothroyd, E. Weerapana, M. Bogyo, Small-molecule inhibition of a depalmitoylase enhances Toxoplasma host-cell invasion. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 651–656 (2013). doi:10.1038/nchembio.1315 Medline

17. X. Fonrose, F. Ausseil, E. Soleilhac, V. Masson, B. David, I. Pouny, J. C. Cintrat, B. Rousseau, C. Barette, G. Massiot, L. Lafanechère, Parthenolide inhibits tubulin carboxypeptidase activity. *Cancer Res.* **67**, 3371–3378 (2007). doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3732 Medline

18. L. Sanchez-Pulido, C. P. Ponting, Vasohibins: New transglutaminase-like cysteine proteases possessing a non-canonical Cys-His-Ser catalytic triad. *Bioinformatics* **32**, 1441–1445 (2016). doi:10.1093/bioinformatics/btv761 Medline

19. Y. Sato, The vasohibin family: A novel family for angiogenesis regulation. *J. Biochem.* **153**, 5–11 (2013). doi:10.1093/jb/mvs128 Medline

20. Y. Suzuki, M. Kobayashi, H. Miyashita, H. Ohta, H. Sonoda, Y. Sato, Isolation of a small vasohibin-binding protein (SVBP) and its role in vasohibin secretion. *J. Cell Sci.* **123**, 3094–3101 (2010). doi:10.1242/jcs.067538 Medline

21. Y. Ditamo, Y. M. Dentesano, S. A. Purro, C. A. Arce, C. G. Bisig, Post-Translational Incorporation of L-Phenylalanine into the C-Terminus of α-Tubulin as a Possible Cause of Neuronal Dysfunction. *Sci. Rep.* **6**, 38140 (2016). doi:10.1038/srep38140 Medline

22. G. G. Deanin, S. F. Preston, R. K. Hanson, M. W. Gordon, On the mechanism of turnover of the carboxy-terminal tyrosine of the alpha chain of tubulin. *Eur. J. Biochem.* **109**, 207–216 (1980). doi:10.1111/j.1432-1033.1980.tb04786.x Medline

23. N. Kumar, M. Flavin, Preferential action of a brain detyrosinolating carboxypeptidase on polymerized tubulin. *J. Biol. Chem.* **256**, 7678–7686 (1981). Medline

24. A. Rovini, G. Gauthier, R. Bergès, A. Kruczynski, D. Braguer, S. Honoré, Anti-migratory effect of vinflunine in endothelial and glioblastoma cells is associated with changes in EB1 C-terminal detyrosinated/tyrosinated status. *PLOS ONE* **8**, e65694 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0065694 Medline

25. V. Redeker, Mass spectrometry analysis of C-terminal posttranslational modifications of tubulins. *Methods Cell Biol.* **95**, 77–103 (2010). doi:10.1016/S0091-679X(10)95006-1 Medline

26. S. Nimmagadda, P. Geetha-Loganathan, F. Pröls, M. Scaal, B. Christ, R. Huang, Expression pattern of Vasohibin during chick development. *Dev. Dyn.* **236**, 1358–1362 (2007). doi:10.1002/dvdy.21134 Medline

27. T. Shibuya, K. Watanabe, H. Yamashita, K. Shimizu, H. Miyashita, M. Abe, T. Moriya, H. Ohta, H. Sonoda, T. Shimosegawa, K. Tabayashi, Y. Sato, Isolation and characterization of vasohibin-2 as a homologue of VEGF-inducible endothelium-derived angiogenesis inhibitor vasohibin. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 1051–1057 (2006). doi:10.1161/01.ATV.0000216747.66660.26 Medline

28. S. Ramirez-Rios, E. Denarier, E. Prezel, A. Vinit, V. Stoppin-Mellet, F. Devred, P. Barbier, V. Peyrot, C. L. Sayas, J. Avila, L. Peris, A. Andrieux, L. Serre, A. Fourest-Lieuvin, I. Arnal, Tau antagonizes end-binding protein tracking at microtubule ends through a phosphorylation-dependent mechanism. *Mol. Biol. Cell* **27**, 2924–2934 (2016). doi:10.1091/mbc.E16-01-0029 Medline

29. C. E. Argarana, H. S. Barra, R. Caputto, Tubulinyl-tyrosine carboxypeptidase from chicken brain: Properties and partial purification. *J. Neurochem.* **34**, 114–118 (1980). doi:10.1111/j.1471-4159.1980.tb04628.x Medline

30. J. Milbradt, A. Kraut, C. Hutterer, E. Sonntag, C. Schmeiser, M. Ferro, S. Wagner, T. Lenac, C. Claus, S. Pinkert, S. T. Hamilton, W. D. Rawlinson, H. Sticht, Y. Couté, M. Marschall, Proteomic analysis of the multimeric nuclear egress complex of human cytomegalovirus. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 2132–2146 (2014). doi:10.1074/mcp.M113.035782 Medline

31. J. D. Pédelacq, S. Cabantous, T. Tran, T. C. Terwilliger, G. S. Waldo, Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **24**, 79–88 (2006). doi:10.1038/nbt1172 Medline

32. I. Arganda-Carreras, R. Fernández-González, A. Muñoz-Barrutia, C. Ortiz-De-Solorzano, 3D reconstruction of histological sections: Application to mammary gland tissue. *Microsc. Res. Tech.* **73**, 1019–1029 (2010). doi:10.1002/jemt.20829 Medline

33. M. Barnat, J. Le Friec, C. Benstaali, S. Humbert, Huntingtin-Mediated Multipolar-Bipolar Transition of Newborn Cortical Neurons Is Critical for Their Postnatal Neuronal Morphology. *Neuron* **93**, 99–114 (2017). doi:10.1016/j.neuron.2016.11.035 Medline

34. V. K. Khodiyar, L. J. Maltais, B. J. Ruef, K. M. Sneddon, J. R. Smith, M. Shimoyama, F. Cabral, C. Dumontet, S. K. Dutcher, R. J. Harvey, L. Lafanechère, J. M. Murray, E. Nogales, D. Piquemal, F. Stanchi, S. Povey, R. C. Lovering, A revised nomenclature for the human and rodent alpha-tubulin gene family. *Genomics* **90**, 285–289 (2007). doi:10.1016/j.ygeno.2007.04.008 Medline

35. C. Aillaud, C. Bosc, Y. Saoudi, E. Denarier, L. Peris, L. Sago, N. Taulet, A. Cieren, O. Tort, M. M. Magiera, C. Janke, V. Redeker, A. Andrieux, M. J. Moutin, Evidence for new C-terminally truncated variants of α- and β-tubulins. *Mol. Biol. Cell* **27**, 640–653 (2016). doi:10.1091/mbc.E15-03-0137 Medline

36. L. Paturle-Lafanechère, M. Manier, N. Trigault, F. Pirollet, H. Mazarguil, D. Job, Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. *J. Cell Sci.* **107**, 1529–1543 (1994). Medline

37. K. Rogowski, J. van Dijk, M. M. Magiera, C. Bosc, J. C. Deloulme, A. Bosson, L. Peris, N. D. Gold, B. Lacroix, M. Bosch Grau, N. Bec, C. Larroque, S. Desagher, M. Holzer, A. Andrieux, M. J. Moutin, C. Janke, A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration. *Cell* **143**, 564–578 (2010). doi:10.1016/j.cell.2010.10.014 Medline

BIBLIOGRAPHIE

Albin, R. L., Reiner, A., Anderson, K. D., Dure, L. S. 4th, Handelin, B., Balfour, R., … Young, A. B. (1992). Preferential loss of striato-external pallidal projection neurons in presymptomatic Huntington's disease. *Annals of Neurology*, *31*(4), 425–430. https://doi.org/10.1002/ana.410310412

Alexandre, P., Reugels, A. M., Barker, D., Blanc, E., & Clarke, J. D. W. (2010). Neurons derive from the more apical daughter in asymmetric divisions in the zebrafish neural tube. *Nature Neuroscience*, *13*(6), 673–679. https://doi.org/10.1038/nn.2547

Alexi, T., Borlongan, C. V, Faull, R. L., Williams, C. E., Clark, R. G., Gluckman, P. D., & Hughes, P. E. (2000). Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Progress in Neurobiology*, *60*(5), 409–470.

Andrew, S. E., Goldberg, Y. P., Kremer, B., Telenius, H., Theilmann, J., Adam, S., … Kalchman, M. A. (1993). The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nature Genetics*, *4*(4), 398–403. https://doi.org/10.1038/ng0893-398

Anne, S. L., Saudou, F., & Humbert, S. (2007). Phosphorylation of huntingtin by cyclin-dependent kinase 5 is induced by DNA damage and regulates wild-type and mutant huntingtin toxicity in neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *27*(27), 7318–7328. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1831-07.2007

Antony, J. M., Paquin, A., Nutt, S. L., Kaplan, D. R., & Miller, F. D. (2011). Endogenous microglia regulate development of embryonic cortical precursor cells. *Journal of Neuroscience Research*, *89*(3), 286–298. https://doi.org/10.1002/jnr.22533

Apostol, B. L., Simmons, D. A., Zuccato, C., Illes, K., Pallos, J., Casale, M., … Thompson, L. M. (2008). CEP-1347 reduces mutant huntingtin-associated neurotoxicity and restores BDNF levels in R6/2 mice. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *39*(1), 8–20. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.04.007

Arai, Y., Pulvers, J. N., Haffner, C., Schilling, B., Nusslein, I., Calegari, F., & Huttner, W. B. (2011). Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nature Communications*, *2*, 154. https://doi.org/10.1038/ncomms1155

Araujo, G. L. L., Araujo, J. A. M., Schroeder, T., Tort, A. B. L., & Costa, M. R. (2014). Sonic hedgehog signaling regulates mode of cell division of early cerebral cortex progenitors and increases astrogliogenesis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*, 77. https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00077

Arlotta, P., Molyneaux, B. J., Chen, J., Inoue, J., Kominami, R., & Macklis, J. D. (2005). Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron*, *45*(2), 207–221. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.036

Aronin, N., Kim, M., Laforet, G., & DiFiglia, M. (1999). Are there multiple pathways in the pathogenesis of Huntington's disease? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *354*(1386), 995–1003. https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0451

Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E. S., Segal, M. R., & Finkbeiner, S. (2004). Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death.

Nature, *431*(7010), 805–810. https://doi.org/10.1038/nature02998

Arteaga-Bracho, E. E., Gulinello, M., Winchester, M. L., Pichamoorthy, N., Petronglo, J. R., Zambrano, A. D., … Molero, A. E. (2016). Postnatal and adult consequences of loss of huntingtin during development: Implications for Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*, *96*, 144–155. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.09.006

Asami, M., Pilz, G. A., Ninkovic, J., Godinho, L., Schroeder, T., Huttner, W. B., & Gotz, M. (2011). The role of Pax6 in regulating the orientation and mode of cell division of progenitors in the mouse cerebral cortex. *Development (Cambridge, England)*, *138*(23), 5067–5078. https://doi.org/10.1242/dev.074591

Atwal, R. S., Xia, J., Pinchev, D., Taylor, J., Epand, R. M., & Truant, R. (2007). Huntingtin has a membrane association signal that can modulate huntingtin aggregation, nuclear entry and toxicity. *Human Molecular Genetics*, *16*(21), 2600–2615. https://doi.org/10.1093/hmg/ddm217

Aylward, E. H. (2007). Change in MRI striatal volumes as a biomarker in preclinical Huntington's disease. *Brain Research Bulletin*, *72*(2–3), 152–158. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.10.028

Baffet, A. D., Hu, D. J., & Vallee, R. B. (2015). Cdk1 Activates Pre-mitotic Nuclear Envelope Dynein Recruitment and Apical Nuclear Migration in Neural Stem Cells. *Developmental Cell*, *33*(6), 703–716. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.04.022

Bai, J., Ramos, R. L., Ackman, J. B., Thomas, A. M., Lee, R. V, & LoTurco, J. J. (2003). RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nature Neuroscience*, *6*(12), 1277–1283. https://doi.org/10.1038/nn1153

Ballas, N., Grunseich, C., Lu, D. D., Speh, J. C., & Mandel, G. (2005). REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cell*, *121*(4), 645–657. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.03.013

Baquet, Z. C., Gorski, J. A., & Jones, K. R. (2004). Early striatal dendrite deficits followed by neuron loss with advanced age in the absence of anterograde cortical brain-derived neurotrophic factor. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *24*(17), 4250–4258. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3920-03.2004

Barber, M., Arai, Y., Morishita, Y., Vigier, L., Causeret, F., Borello, U., … Pierani, A. (2015). Migration Speed of Cajal-Retzius Cells Modulated by Vesicular Trafficking Controls the Size of Higher-Order Cortical Areas. *Current Biology : CB*, *25*(19), 2466–2478. https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.08.028

Barisic, M., Silva e Sousa, R., Tripathy, S. K., Magiera, M. M., Zaytsev, A. V, Pereira, A. L., … Maiato, H. (2015). Mitosis. Microtubule detyrosination guides chromosomes during mitosis. *Science (New York, N.Y.)*, *348*(6236), 799–803. https://doi.org/10.1126/science.aaa5175

Bates, G. (2003). Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease. *Lancet (London, England)*, *361*(9369), 1642–1644. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13304-1

Bates, G. P., Dorsey, R., Gusella, J. F., Hayden, M. R., Kay, C., Leavitt, B. R., … Tabrizi, S. J. (2015). Huntington disease. *Nat Rev Dis Primers*, *1*, 15005. https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.5

Bauerlein, F. J. B., Saha, I., Mishra, A., Kalemanov, M., Martinez-Sanchez, A., Klein, R., … Fernandez-Busnadiego, R. (2017). In Situ Architecture and Cellular Interactions of PolyQ Inclusions. *Cell*, *171*(1), 179–187.e10. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.009

Baye, L. M., & Link, B. A. (2008). Nuclear migration during retinal development. *Brain Research*, *1192*, 29–36. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.05.021

Beal, M. F., Brouillet, E., Jenkins, B. G., Ferrante, R. J., Kowall, N. W., Miller, J. M., … Hyman, B. T. (1993). Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *13*(10), 4181–4192.

Beal, M. F., Brouillet, E., Jenkins, B., Henshaw, R., Rosen, B., & Hyman, B. T. (1993). Age-dependent striatal excitotoxic lesions produced by the endogenous mitochondrial inhibitor malonate. *Journal of Neurochemistry*, *61*(3), 1147–1150.

Beal, M. F., Kowall, N. W., Ellison, D. W., Mazurek, M. F., Swartz, K. J., & Martin, J. B. (1986). Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature*, *321*(6066), 168–171. https://doi.org/10.1038/321168a0

Ben M'Barek, K., Pla, P., Orvoen, S., Benstaali, C., Godin, J. D., Gardier, A. M., … Humbert, S. (2013). Huntingtin mediates anxiety/depression-related behaviors and hippocampal neurogenesis. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *33*(20), 8608–8620. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5110-12.2013

Benn, C. L., Sun, T., Sadri-Vakili, G., McFarland, K. N., DiRocco, D. P., Yohrling, G. J., … Cha, J.-H. J. (2008). Huntingtin modulates transcription, occupies gene promoters in vivo, and binds directly to DNA in a polyglutamine-dependent manner. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *28*(42), 10720–10733. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2126-08.2008

Berardelli, A., Noth, J., Thompson, P. D., Bollen, E. L., Currà, A., Deuschl, G., … Roos, R. A. (1999). Pathophysiology of chorea and bradykinesia in Huntington's disease. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, *14*(3), 398–403. https://doi.org/10.1177/0193945907302981

Bhide, P. G., Day, M., Sapp, E., Schwarz, C., Sheth, A., Kim, J., … DiFiglia, M. (1996). Expression of normal and mutant huntingtin in the developing brain. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *16*(17), 5523–5535.

Bielle, F., Marcos-Mondejar, P., Keita, M., Mailhes, C., Verney, C., Nguyen Ba-Charvet, K., … Garel, S. (2011). Slit2 activity in the migration of guidepost neurons shapes thalamic projections during development and evolution. *Neuron*, *69*(6), 1085–1098. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.026

Bjorkblom, B., Ostman, N., Hongisto, V., Komarovski, V., Filen, J.-J., Nyman, T. A., … Coffey, E. T. (2005). Constitutively active cytoplasmic c-Jun N-terminal kinase 1 is a dominant regulator of dendritic architecture: role of microtubule-associated protein 2 as an effector. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *25*(27), 6350–6361. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1517-05.2005

Bodner, R. A., Housman, D. E., & Kazantsev, A. G. (2006). New directions for neurodegenerative disease therapy: using chemical compounds to boost the formation of mutant protein inclusions. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *5*(14), 1477–1480. https://doi.org/10.4161/cc.5.14.2929

Borrell-Pages, M., Zala, D., Humbert, S., & Saudou, F. (2006). Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *63*(22), 2642–2660. https://doi.org/10.1007/s00018-006-6242-0

Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)*,

118(2), 401–415.

Brennan, W. A. J., Bird, E. D., & Aprille, J. R. (1985). Regional mitochondrial respiratory activity in Huntington's disease brain. *Journal of Neurochemistry*, *44*(6), 1948–1950.

Brouillet, E., Conde, F., Beal, M. F., & Hantraye, P. (1999). Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Progress in Neurobiology*, *59*(5), 427–468.

Brouillet, E., Hantraye, P., Ferrante, R. J., Dolan, R., Leroy-Willig, A., Kowall, N. W., & Beal, M. F. (1995). Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(15), 7105–7109.

Browne, S. E., Bowling, A. C., MacGarvey, U., Baik, M. J., Berger, S. C., Muqit, M. M., … Beal, M. F. (1997). Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Annals of Neurology*, *41*(5), 646–653. https://doi.org/10.1002/ana.410410514

Bultje, R. S., Castaneda-Castellanos, D. R., Jan, L. Y., Jan, Y.-N., Kriegstein, A. R., & Shi, S.-H. (2009). Mammalian Par3 regulates progenitor cell asymmetric division via notch signaling in the developing neocortex. *Neuron*, *63*(2), 189–202. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.07.004

Cadigan, K. M., & Waterman, M. L. (2012). TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(11). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007906

Cappello, S., Attardo, A., Wu, X., Iwasato, T., Itohara, S., Wilsch-Brauninger, M., … Gotz, M. (2006). The Rho-GTPase cdc42 regulates neural progenitor fate at the apical surface. *Nature Neuroscience*, *9*(9), 1099–1107. https://doi.org/10.1038/nn1744

Carabalona, A., Hu, D. J.-K., & Vallee, R. B. (2016). KIF1A inhibition immortalizes brain stem cells but blocks BDNF-mediated neuronal migration. *Nature Neuroscience*, *19*(2), 253–262. https://doi.org/10.1038/nn.4213

Castiglioni, V., Onorati, M., Rochon, C., & Cattaneo, E. (2012). Induced pluripotent stem cell lines from Huntington's disease mice undergo neuronal differentiation while showing alterations in the lysosomal pathway. *Neurobiology of Disease*, *46*(1), 30–40. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.12.032

Caviston, J. P., & Holzbaur, E. L. F. (2009). Huntingtin as an essential integrator of intracellular vesicular trafficking. *Trends in Cell Biology*, *19*(4), 147–155.

Caviston, J. P., Ross, J. L., Antony, S. M., Tokito, M., & Holzbaur, E. L. F. (2007). Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(24), 10045–10050. https://doi.org/10.1073/pnas.0610628104

Caviston, J. P., Zajac, A. L., Tokito, M., & Holzbaur, E. L. F. (2011). Huntingtin coordinates the dynein-mediated dynamic positioning of endosomes and lysosomes. *Molecular Biology of the Cell*, *22*(4), 478–492. https://doi.org/10.1091/mbc.E10-03-0233

Cepeda, C., Wu, N., André, V. M., Cummings, D. M., & Levine, M. S. (2007). The corticostriatal pathway in Huntington's disease. *Progress in Neurobiology*, *81*(5–6), 253–271. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.11.001

Chai, X., Forster, E., Zhao, S., Bock, H. H., & Frotscher, M. (2009). Reelin stabilizes the actin cytoskeleton of neuronal processes by inducing n-cofilin phosphorylation at serine3. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *29*(1), 288–299. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2934-08.2009

Chai, X., Zhao, S., Fan, L., Zhang, W., Lu, X., Shao, H., … Frotscher, M. (2016). Reelin and cofilin cooperate during the migration of cortical neurons: a quantitative morphological analysis. *Development (Cambridge, England)*, *143*(6), 1029–1040. https://doi.org/10.1242/dev.134163

Chao, M. J., Kim, K.-H., Shin, J. W., Lucente, D., Wheeler, V. C., Li, H., … Lee, J.-M. (2018). Population-specific genetic modification of Huntington's disease in Venezuela. *PLOS Genetics*, *14*(5), e1007274. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007274

Chenn, A., & McConnell, S. K. (1995). Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell*, *82*(4), 631–641.

Chenn, A., & Walsh, C. A. (2003). Increased neuronal production, enlarged forebrains and cytoarchitectural distortions in beta-catenin overexpressing transgenic mice. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, *13*(6), 599–606.

Choo, Y. S., Johnson, G. V. W., MacDonald, M., Detloff, P. J., & Lesort, M. (2004). Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. *Human Molecular Genetics*, *13*(14), 1407–1420. https://doi.org/10.1093/hmg/ddh162

Chou, F.-S., Li, R., & Wang, P.-S. (2018). Molecular components and polarity of radial glial cells during cerebral cortex development. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *75*(6), 1027–1041. https://doi.org/10.1007/s00018-017-2680-0

Colin, E., Zala, D., Liot, G., Rangone, H., Borrell-Pages, M., Li, X.-J., … Humbert, S. (2008). Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/retrograde transport in neurons. *The EMBO Journal*, *27*(15), 2124–2134. https://doi.org/10.1038/emboj.2008.133

Conforti, P., Besusso, D., Bocchi, V. D., Faedo, A., Cesana, E., Rossetti, G., … Cattaneo, E. (2018). Faulty neuronal determination and cell polarization are reverted by modulating HD early phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(4), E762–E771. https://doi.org/10.1073/pnas.1715865115

Conforti, P., Camnasio, S., Mutti, C., Valenza, M., Thompson, M., Fossale, E., … Cattaneo, E. (2013). Lack of huntingtin promotes neural stem cells differentiation into glial cells while neurons expressing huntingtin with expanded polyglutamine tracts undergo cell death. *Neurobiology of Disease*, *50*, 160–170. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.10.015

Cong, S.-Y., Pepers, B. A., Evert, B. O., Rubinsztein, D. C., Roos, R. A. C., van Ommen, G.-J. B., & Dorsman, J. C. (2005). Mutant huntingtin represses CBP, but not p300, by binding and protein degradation. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *30*(4), 560–571.

Costa, V., Giacomello, M., Hudec, R., Lopreiato, R., Ermak, G., Lim, D., … Scorrano, L. (2010). Mitochondrial fission and cristae disruption increase the response of cell models of Huntington's disease to apoptotic stimuli. *EMBO Molecular Medicine*, *2*(12), 490–503. https://doi.org/10.1002/emmm.201000102

COYLE, J. T., & SCHWARCZ, R. (1976). Lesion of striatal neurons with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature*, *263*(5574), 244–246. https://doi.org/10.1038/263244a0

Creppe, C., Malinouskaya, L., Volvert, M.-L., Gillard, M., Close, P., Malaise, O., … Nguyen, L. (2009). Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of alpha-tubulin. *Cell*, *136*(3), 551–564. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.043

Cubelos, B., Sebastian-Serrano, A., Beccari, L., Calcagnotto, M. E., Cisneros, E., Kim, S., …

Nieto, M. (2010). Cux1 and Cux2 regulate dendritic branching, spine morphology, and synapses of the upper layer neurons of the cortex. *Neuron*, *66*(4), 523–535. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.04.038

Cudkowicz, M., & Kowall, N. W. (1990). Degeneration of pyramidal projection neurons in Huntington's disease cortex. *Annals of Neurology*, *27*(2), 200–204. https://doi.org/10.1002/ana.410270217

Cunningham, C. L., Martinez-Cerdeno, V., & Noctor, S. C. (2013). Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *33*(10), 4216–4233. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3441-12.2013

D'Arcangelo, G. (2005). The reeler mouse: anatomy of a mutant. *International Review of Neurobiology*, *71*, 383–417.

Damiano, M., Diguet, E., Malgorn, C., D'Aurelio, M., Galvan, L., Petit, F., … Brouillet, E. (2013). A role of mitochondrial complex II defects in genetic models of Huntington's disease expressing N-terminal fragments of mutant huntingtin. *Human Molecular Genetics*, *22*(19), 3869–3882. https://doi.org/10.1093/hmg/ddt242

Dave, R. K., Ellis, T., Toumpas, M. C., Robson, J. P., Julian, E., Adolphe, C., … Wainwright, B. J. (2011). Sonic hedgehog and notch signaling can cooperate to regulate neurogenic divisions of neocortical progenitors. *PloS One*, *6*(2), e14680. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014680

Davies, S. W., Turmaine, M., Cozens, B. A., DiFiglia, M., Sharp, A. H., Ross, C. A., … Bates, G. P. (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell*, *90*(3), 537–548.

de Almeida, L. P., Ross, C. A., Zala, D., Aebischer, P., & Deglon, N. (2002). Lentiviral-mediated delivery of mutant huntingtin in the striatum of rats induces a selective neuropathology modulated by polyglutamine repeat size, huntingtin expression levels, and protein length. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *22*(9), 3473–3483. https://doi.org/20026337

de la Monte, S. M., Vonsattel, J. P., & Richardson, E. P. J. (1988). Morphometric demonstration of atrophic changes in the cerebral cortex, white matter, and neostriatum in Huntington's disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *47*(5), 516–525. https://doi.org/10.1097/00005072-198809000-00003

Del Bene, F., Wehman, A. M., Link, B. A., & Baier, H. (2008). Regulation of neurogenesis by interkinetic nuclear migration through an apical-basal notch gradient. *Cell*, *134*(6), 1055–1065. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.017

des Portes, V., Francis, F., Pinard, J. M., Desguerre, I., Moutard, M. L., Snoeck, I., … Beldjord, C. (1998). doublecortin is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia (SCLH). *Human Molecular Genetics*, *7*(7), 1063–1070. https://doi.org/10.1093/hmg/7.7.1063

Developmental alterations in Huntington's disease neural cells and pharmacological rescue in cells and mice. (2017). *Nature Neuroscience*, *20*(5), 648–660. https://doi.org/10.1038/nn.4532

DiFiglia, M. (2002). Huntingtin fragments that aggregate go their separate ways. *Molecular Cell*, *10*(2), 224–225.

Dong, X., Shen, K., & Bulow, H. E. (2015). Intrinsic and extrinsic mechanisms of dendritic morphogenesis. *Annual Review of Physiology*, *77*, 271–300. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021014-071746

Dong, Z., Yang, N., Yeo, S.-Y., Chitnis, A., & Guo, S. (2012). Intralineage directional Notch signaling regulates self-renewal and differentiation of asymmetrically dividing radial glia. *Neuron*, *74*(1), 65–78. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.01.031

Dragatsis, I., Dietrich, P., Ren, H., Deng, Y. P., Del Mar, N., Wang, H. B., … Reiner, A. (2018). Effect of early embryonic deletion of huntingtin from pyramidal neurons on the development and long-term survival of neurons in cerebral cortex and striatum. *Neurobiology of Disease*, *111*, 102–117. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.12.015

Dragatsis, I., Efstratiadis, A., & Zeitlin, S. (1998). Mouse mutant embryos lacking huntingtin are rescued from lethality by wild-type extraembryonic tissues. *Development (Cambridge, England)*, *125*(8), 1529–1539.

Dragatsis, I., Goldowitz, D., Del Mar, N., Deng, Y. P., Meade, C. A., Liu, L., … Reiner, A. (2009). CAG repeat lengths > or =335 attenuate the phenotype in the R6/2 Huntington's disease transgenic mouse. *Neurobiology of Disease*, *33*(3), 315–330. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.10.009

Dragatsis, I., Levine, M. S., & Zeitlin, S. (2000). Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nature Genetics*, *26*(3), 300–306. https://doi.org/10.1038/81593

Dunah, A. W., Jeong, H., Griffin, A., Kim, Y.-M., Standaert, D. G., Hersch, S. M., … Krainc, D. (2002). Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science (New York, N.Y.)*, *296*(5576), 2238–2243. https://doi.org/10.1126/science.1072613

Duyao, M. P., Auerbach, A. B., Ryan, A., Persichetti, F., Barnes, G. T., McNeil, S. M., … Joyner, A. L. (1995). Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science (New York, N.Y.)*, *269*(5222), 407–410.

Eckler, M. J., Nguyen, T. D., McKenna, W. L., Fastow, B. L., Guo, C., Rubenstein, J. L. R., & Chen, B. (2015). Cux2-positive radial glial cells generate diverse subtypes of neocortical projection neurons and macroglia. *Neuron*, *86*(4), 1100–1108. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.04.020

El-Daher, M.-T., Hangen, E., Bruyere, J., Poizat, G., Al-Ramahi, I., Pardo, R., … Saudou, F. (2015). Huntingtin proteolysis releases non-polyQ fragments that cause toxicity through dynamin 1 dysregulation. *The EMBO Journal*, *34*(17), 2255–2271. https://doi.org/10.15252/embj.201490808

Elias, S., McGuire, J. R., Yu, H., & Humbert, S. (2015). Huntingtin Is Required for Epithelial Polarity through RAB11A-Mediated Apical Trafficking of PAR3-aPKC. *PLoS Biology*, *13*(5), e1002142. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002142

Elias, S., Thion, M. S., Yu, H., Sousa, C. M., Lasgi, C., Morin, X., & Humbert, S. (2014). Huntingtin regulates mammary stem cell division and differentiation. *Stem Cell Reports*, *2*(4), 491–506. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.02.011

Emery, G., Hutterer, A., Berdnik, D., Mayer, B., Wirtz-Peitz, F., Gaitan, M. G., & Knoblich, J. A. (2005). Asymmetric Rab 11 endosomes regulate delta recycling and specify cell fate in the Drosophila nervous system. *Cell*, *122*(5), 763–773. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.017

Engelender, S., Sharp, A. H., Colomer, V., Tokito, M. K., Lanahan, A., Worley, P., … Ross, C. A. (1997). Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) interacts with the p150Glued subunit of dynactin. *Human Molecular Genetics*, *6*(13), 2205–2212.

Englund, C., Fink, A., Lau, C., Pham, D., Daza, R. A. M., Bulfone, A., … Hevner, R. F. (2005). Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate

progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *25*(1), 247–251. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2899-04.2005

Epping, E. A., Kim, J. I., Craufurd, D., Brashers-Krug, T. M., Anderson, K. E., McCusker, E., … Paulsen, J. S. (2016). Longitudinal psychiatric symptoms in prodromal Huntington's disease: A decade of data. *American Journal of Psychiatry*, *173*(2), 187–192. https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2015.14121551

Epping, E. A., & Paulsen, J. S. (2011). Depression in the early stages of Huntington disease. *Neurodegenerative Disease Management*, *1*(5), 407–414. https://doi.org/10.2217/nmt.11.45

Erck, C., Peris, L., Andrieux, A., Meissirel, C., Gruber, A. D., Vernet, M., … Wehland, J. (2005). A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(22), 7853–7858. https://doi.org/10.1073/pnas.0409626102

Estrada Sanchez, A. M., Mejia-Toiber, J., & Massieu, L. (2008). Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease. *Archives of Medical Research*, *39*(3), 265–276. https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2007.11.011

Faber, P. W., Alter, J. R., MacDonald, M. E., & Hart, A. C. (1999). Polyglutamine-mediated dysfunction and apoptotic death of a Caenorhabditis elegans sensory neuron. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(1), 179–184.

Faber, P. W., Barnes, G. T., Srinidhi, J., Chen, J., Gusella, J. F., & MacDonald, M. E. (1998). Huntingtin interacts with a family of WW domain proteins. *Human Molecular Genetics*, *7*(9), 1463–1474.

Fan, J., Cowan, C. M., Zhang, L. Y. J., Hayden, M. R., & Raymond, L. A. (2009). Interaction of postsynaptic density protein-95 with NMDA receptors influences excitotoxicity in the yeast artificial chromosome mouse model of Huntington's disease. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *29*(35), 10928–10938. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2491-09.2009

Ferrer, I., Goutan, E., Marin, C., Rey, M. J., & Ribalta, T. (2000). Brain-derived neurotrophic factor in Huntington disease. *Brain Research*, *866*(1–2), 257–261.

Fietz, S. A., Kelava, I., Vogt, J., Wilsch-Brauninger, M., Stenzel, D., Fish, J. L., … Huttner, W. B. (2010). OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. *Nature Neuroscience*, *13*(6), 690–699. https://doi.org/10.1038/nn.2553

Fisher, E. R., & Hayden, M. R. (2014). Multisource ascertainment of Huntington disease in Canada: Prevalence and population at risk. *Movement Disorders*, *29*(1), 105–114. https://doi.org/10.1002/mds.25717

Florio, M., & Huttner, W. B. (2014). Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. *Development (Cambridge, England)*, *141*(11), 2182–2194. https://doi.org/10.1242/dev.090571

Fothergill, T., Donahoo, A.-L. S., Douglass, A., Zalucki, O., Yuan, J., Shu, T., … Richards, L. J. (2014). Netrin-DCC signaling regulates corpus callosum formation through attraction of pioneering axons and by modulating Slit2-mediated repulsion. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, *24*(5), 1138–1151. https://doi.org/10.1093/cercor/bhs395

Fousse, J., Gautier, E., Patti, D., & Dehay, C. (2019). Developmental changes in interkinetic nuclear migration dynamics with respect to cell-cycle progression in the mouse cerebral

cortex ventricular zone. *The Journal of Comparative Neurology*, *527*(10), 1545–1557. https://doi.org/10.1002/cne.24641

Franco, S. J., Gil-Sanz, C., Martinez-Garay, I., Espinosa, A., Harkins-Perry, S. R., Ramos, C., & Muller, U. (2012). Fate-restricted neural progenitors in the mammalian cerebral cortex. *Science (New York, N.Y.)*, *337*(6095), 746–749. https://doi.org/10.1126/science.1223616

Franco, S. J., Martinez-Garay, I., Gil-Sanz, C., Harkins-Perry, S. R., & Muller, U. (2011). Reelin regulates cadherin function via Dab1/Rap1 to control neuronal migration and lamination in the neocortex. *Neuron*, *69*(3), 482–497. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.01.003

Franco, S. J., & Muller, U. (2013). Shaping our minds: stem and progenitor cell diversity in the mammalian neocortex. *Neuron*, *77*(1), 19–34. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.022

Frantz, G. D., & McConnell, S. K. (1996). Restriction of late cerebral cortical progenitors to an upper-layer fate. *Neuron*, *17*(1), 55–61.

Fusco, F. R., Chen, Q., Lamoreaux, W. J., Figueredo-Cardenas, G., Jiao, Y., Coffman, J. A., … Reiner, A. (1999). Cellular Localization of Huntingtin in Striatal and Cortical Neurons in Rats: Lack of Correlation with Neuronal Vulnerability in Huntington's Disease. *The Journal of Neuroscience*, *19*(4), 1189–1202.

Gafni, J., & Ellerby, L. M. (2002). Calpain activation in Huntington's disease. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *22*(12), 4842–4849.

Gafni, J., Hermel, E., Young, J. E., Wellington, C. L., Hayden, M. R., & Ellerby, L. M. (2004). Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(19), 20211–20220. https://doi.org/10.1074/jbc.M401267200

Gal, J. S., Morozov, Y. M., Ayoub, A. E., Chatterjee, M., Rakic, P., & Haydar, T. F. (2006). Molecular and morphological heterogeneity of neural precursors in the mouse neocortical proliferative zones. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *26*(3), 1045–1056. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4499-05.2006

Gammill, L. S., & Bronner-Fraser, M. (2003). Neural crest specification: migrating into genomics. *Nature Reviews. Neuroscience*, *4*(10), 795–805. https://doi.org/10.1038/nrn1219

Gatto, R. G., Chu, Y., Ye, A. Q., Price, S. D., Tavassoli, E., Buenaventura, A., … Morfini, G. A. (2015). Analysis of YFP(J16)-R6/2 reporter mice and postmortem brains reveals early pathology and increased vulnerability of callosal axons in Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, *24*(18), 5285–5298. https://doi.org/10.1093/hmg/ddv248

Gauthier, L. R., Charrin, B. C., Borrell-Pagès, M., Dompierre, J. P., Rangone, H., Cordelières, F. P., … Saudou, F. (2004). Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell*, *118*(1), 127–138. https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.018

Gauthier, L. R., Charrin, C., Dompierre, J. P., Borrell-page, M., Cordelie, F. P., Mey, J. De, … Gutenberg-universita, J. (2004). and Survival of Neurons by Enhancing BDNF Vesicular Transport along Microtubules. *Cell*, *118*, 127–138.

Ge, X., Frank, C. L., Calderon de Anda, F., & Tsai, L.-H. (2010). Hook3 interacts with PCM1 to regulate pericentriolar material assembly and the timing of neurogenesis. *Neuron*, *65*(2), 191–203. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.01.011

Gil-Sanz, C., Espinosa, A., Fregoso, S. P., Bluske, K. K., Cunningham, C. L., Martinez-Garay, I., … Muller, U. (2015). Lineage Tracing Using Cux2-Cre and Cux2-CreERT2 Mice. *Neuron*, *86*(4), 1091–1099. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.04.019

Gil-Sanz, C., Franco, S. J., Martinez-Garay, I., Espinosa, A., Harkins-Perry, S., & Muller, U. (2013). Cajal-Retzius cells instruct neuronal migration by coincidence signaling between secreted and contact-dependent guidance cues. *Neuron*, *79*(3), 461–477. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.06.040

Gilmore, E. C., Ohshima, T., Goffinet, A. M., Kulkarni, A. B., & Herrup, K. (1998). Cyclin-dependent kinase 5-deficient mice demonstrate novel developmental arrest in cerebral cortex. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *18*(16), 6370–6377.

Gipson, T. A., Neueder, A., Wexler, N. S., Bates, G. P., & Housman, D. (2013). Aberrantly spliced HTT, a new player in Huntington's disease pathogenesis. *RNA Biology*, *10*(11), 1647–1652. https://doi.org/10.4161/rna.26706

Gleeson, J. G., Allen, K. M., Fox, J. W., Lamperti, E. D., Berkovic, S., Scheffer, I., … Walsh, C. A. (1998). Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell*, *92*(1), 63–72.

Godin, J. D., Colombo, K., Molina-Calavita, M., Keryer, G., Zala, D., Charrin, B. C., … Humbert, S. (2010). Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis. *Neuron*, *67*(3), 392–406. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.06.027

Godin, J. D., Poizat, G., Hickey, M. A., Maschat, F., & Humbert, S. (2010). Mutant huntingtin-impaired degradation of beta-catenin causes neurotoxicity in Huntington's disease. *The EMBO Journal*, *29*(14), 2433–2445. https://doi.org/10.1038/emboj.2010.117

Godin, J. D., Thomas, N., Laguesse, S., Malinouskaya, L., Close, P., Malaise, O., … Nguyen, L. (2012). p27(Kip1) is a microtubule-associated protein that promotes microtubule polymerization during neuron migration. *Developmental Cell*, *23*(4), 729–744. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.08.006

Goffredo, D., Rigamonti, D., Tartari, M., De Micheli, A., Verderio, C., Matteoli, M., … Cattaneo, E. (2002). Calcium-dependent cleavage of endogenous wild-type huntingtin in primary cortical neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(42), 39594–39598. https://doi.org/10.1074/jbc.C200353200

Goldberg, Y. P., Nicholson, D. W., Rasper, D. M., Kalchman, M. A., Koide, H. B., Graham, R. K., … Hayden, M. R. (1996). Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract. *Nature Genetics*, *13*(4), 442–449. https://doi.org/10.1038/ng0896-442

Gomez-Tortosa, E., del Barrio, A., Barroso, T., & Garcia Ruiz, P. J. (1996). Visual processing disorders in patients with Huntington's disease and asymptomatic carriers. *Journal of Neurology*, *243*(3), 286–292.

Gong, B., Lim, M. C. Y., Wanderer, J., Wyttenbach, A., & Morton, A. J. (2008). Time-lapse analysis of aggregate formation in an inducible PC12 cell model of Huntington's disease reveals time-dependent aggregate formation that transiently delays cell death. *Brain Research Bulletin*, *75*(1), 146–157. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.08.005

Gorski, J. A., Zeiler, S. R., Tamowski, S., & Jones, K. R. (2003). Brain-derived neurotrophic factor is required for the maintenance of cortical dendrites. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *23*(17), 6856–6865.

Gotz, M., & Huttner, W. B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nature Reviews.*

Molecular Cell Biology, *6*(10), 777–788. https://doi.org/10.1038/nrm1739

Graham, R. K., Deng, Y., Slow, E. J., Haigh, B., Bissada, N., Lu, G., … Hayden, M. R. (2006). Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. *Cell*, *125*(6), 1179–1191. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.026

Gray, M., Shirasaki, D. I., Cepeda, C., Andre, V. M., Wilburn, B., Lu, X.-H., … Yang, X. W. (2008). Full-length human mutant huntingtin with a stable polyglutamine repeat can elicit progressive and selective neuropathogenesis in BACHD mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *28*(24), 6182–6195. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0857-08.2008

Greig, L. C., Woodworth, M. B., Galazo, M. J., Padmanabhan, H., & Macklis, J. D. (2013). Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nature Reviews. Neuroscience*, *14*(11), 755–769. https://doi.org/10.1038/nrn3586

Gu, M., Gash, M. T., Mann, V. M., Javoy-Agid, F., Cooper, J. M., & Schapira, A. H. (1996). Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Annals of Neurology*, *39*(3), 385–389. https://doi.org/10.1002/ana.410390317

Guedes-Dias, P., & Holzbaur, E. L. F. (2017). Huntingtin Fibrils Poke Membranes. *Cell*, *171*(1), 32–33. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.009

Guillemot, F. (2005). Cellular and molecular control of neurogenesis in the mammalian telencephalon. *Current Opinion in Cell Biology*, *17*(6), 639–647. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.09.006

Gunawardena, S., Her, L.-S., Brusch, R. G., Laymon, R. A., Niesman, I. R., Gordesky-Gold, B., … Goldstein, L. S. B. (2003). Disruption of axonal transport by loss of huntingtin or expression of pathogenic polyQ proteins in Drosophila. *Neuron*, *40*(1), 25–40.

Guo, C., Eckler, M. J., McKenna, W. L., McKinsey, G. L., Rubenstein, J. L. R., & Chen, B. (2013). Fezf2 expression identifies a multipotent progenitor for neocortical projection neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. *Neuron*, *80*(5), 1167–1174. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.037

Guo, Q., Huang, B., Cheng, J., Seefelder, M., Engler, T., Pfeifer, G., … Kochanek, S. (2018). The cryo-electron microscopy structure of huntingtin. *Nature*, *555*(7694), 117–120. https://doi.org/10.1038/nature25502

Guo, X., Disatnik, M.-H., Monbureau, M., Shamloo, M., Mochly-Rosen, D., & Qi, X. (2013). Inhibition of mitochondrial fragmentation diminishes Huntington's disease-associated neurodegeneration. *The Journal of Clinical Investigation*, *123*(12), 5371–5388. https://doi.org/10.1172/JCI70911

Gusella, J. F., & MacDonald, M. E. (2009). Huntington's disease: the case for genetic modifiers. *Genome Medicine*, *1*(8), 80. https://doi.org/10.1186/gm80

Gusella, J. F., Wexler, N. S., Conneally, P. M., Naylor, S. L., Anderson, M. A., Tanzi, R. E., … Sakaguchi, A. Y. (1983). A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature*, *306*(5940), 234–238. https://doi.org/10.1007/BF02500925

Gutekunst, C. A., Li, S. H., Yi, H., Mulroy, J. S., Kuemmerle, S., Jones, R., … Li, X. J. (1999). Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *19*(7), 2522–2534.

Han, W., Kwan, K. Y., Shim, S., Lam, M. M. S., Shin, Y., Xu, X., … Sestan, N. (2011). TBR1

directly represses Fezf2 to control the laminar origin and development of the corticospinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(7), 3041–3046. https://doi.org/10.1073/pnas.1016723108

Hansen, D. V, Lui, J. H., Parker, P. R. L., & Kriegstein, A. R. (2010). Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature*, *464*(7288), 554–561. https://doi.org/10.1038/nature08845

Hardingham, G. E., & Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nature Reviews. Neuroscience*, *11*(10), 682–696. https://doi.org/10.1038/nrn2911

Haremaki, T., Deglincerti, A., & Brivanlou, A. H. (2015). Huntingtin is required for ciliogenesis and neurogenesis during early Xenopus development. *Developmental Biology*, *408*(2), 305–315. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.07.013

Harjes, P., & Wanker, E. E. (2003). The hunt for huntingtin function: Interaction partners tell many different stories. *Trends in Biochemical Sciences*, *28*(8), 425–433. https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00168-3

Hatanaka, Y., Yamauchi, K., & Murakami, F. (2012). Formation of axon-dendrite polarity in situ: initiation of axons from polarized and non-polarized cells. *Development, Growth & Differentiation*, *54*(3), 398–407. https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2012.01344.x

Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W., & Huttner, W. B. (2004). Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(9), 3196–3201. https://doi.org/10.1073/pnas.0308600100

Haushalter, C., Asselin, L., Fraulob, V., Dolle, P., & Rhinn, M. (2017). Retinoic acid controls early neurogenesis in the developing mouse cerebral cortex. *Developmental Biology*, *430*(1), 129–141. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.08.006

Haushalter, C., Schuhbaur, B., Dolle, P., & Rhinn, M. (2017). Meningeal retinoic acid contributes to neocortical lamination and radial migration during mouse brain development. *Biology Open*, *6*(2), 148–160. https://doi.org/10.1242/bio.021063

Hayashi, K., Ohshima, T., Hashimoto, M., & Mikoshiba, K. (2007). Pak1 regulates dendritic branching and spine formation. *Developmental Neurobiology*, *67*(5), 655–669. https://doi.org/10.1002/dneu.20363

Haycraft, C. J., Banizs, B., Aydin-Son, Y., Zhang, Q., Michaud, E. J., & Yoder, B. K. (2005). Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS Genetics*, *1*(4), e53. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0010053

Hayden, M. R., Hopkins, H. C., Macrea, M., & Beighton, P. H. (1980). The origin of Huntington's chorea in the Afrikaner population of South Africa. *South African Medical Journal = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Geneeskunde*, *58*(5), 197–200.

Hedreen, J. C., Peyser, C. E., Folstein, S. E., & Ross, C. A. (1991). Neuronal loss in layers V and VI of cerebral cortex in Huntington's disease. *Neuroscience Letters*, *133*(2), 257–261. https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.03.027

Her, L.-S., & Goldstein, L. S. B. (2008). Enhanced sensitivity of striatal neurons to axonal transport defects induced by mutant huntingtin. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *28*(50), 13662–13672. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4144-08.2008

Hermel, E., Gafni, J., Propp, S. S., Leavitt, B. R., Wellington, C. L., Young, J. E., … Ellerby,

L. M. (2004). Specific caspase interactions and amplification are involved in selective neuronal vulnerability in Huntington's disease. *Cell Death and Differentiation*, *11*(4), 424–438. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401358

Hevner, R. F., Shi, L., Justice, N., Hsueh, Y., Sheng, M., Smiga, S., … Rubenstein, J. L. (2001). Tbr1 regulates differentiation of the preplate and layer 6. *Neuron*, *29*(2), 353–366.

Higginbotham, H., Guo, J., Yokota, Y., Umberger, N. L., Su, C.-Y., Li, J., … Anton, E. S. (2013). Arl13b-regulated cilia activities are essential for polarized radial glial scaffold formation. *Nature Neuroscience*, *16*(8), 1000–1007. https://doi.org/10.1038/nn.3451

Hilditch-Maguire, P., Trettel, F., Passani, L. A., Auerbach, A., Persichetti, F., & MacDonald, M. E. (2000). Huntingtin: an iron-regulated protein essential for normal nuclear and perinuclear organelles. *Human Molecular Genetics*, *9*(19), 2789–2797. https://doi.org/citeulike-article-id:10817845\ndoi: 10.1093/hmg/9.19.2789

Hinckelmann, M.-V., Virlogeux, A., Niehage, C., Poujol, C., Choquet, D., Hoflack, B., … Saudou, F. (2016). Self-propelling vesicles define glycolysis as the minimal energy machinery for neuronal transport. *Nature Communications*, *7*, 13233. https://doi.org/10.1038/ncomms13233

Hirabayashi, Y., Itoh, Y., Tabata, H., Nakajima, K., Akiyama, T., Masuyama, N., & Gotoh, Y. (2004). The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development (Cambridge, England)*, *131*(12), 2791–2801. https://doi.org/10.1242/dev.01165

Hirabayashi, Y., Suzki, N., Tsuboi, M., Endo, T. A., Toyoda, T., Shinga, J., … Gotoh, Y. (2009). Polycomb limits the neurogenic competence of neural precursor cells to promote astrogenic fate transition. *Neuron*, *63*(5), 600–613. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.08.021

Hiscock, T. W., Miesfeld, J. B., Mosaliganti, K. R., Link, B. A., & Megason, S. G. (2018). Feedback between tissue packing and neurogenesis in the zebrafish neural tube. *Development (Cambridge, England)*, *145*(9). https://doi.org/10.1242/dev.157040

Ho, L. W., Brown, R., Maxwell, M., Wyttenbach, A., & Rubinsztein, D. C. (2001). Wild type Huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant Huntingtin in mammalian cell models of Huntington's disease. *Journal of Medical Genetics*, *38*(7), 450–452.

Hodges, A., Strand, A. D., Aragaki, A. K., Kuhn, A., Sengstag, T., Hughes, G., … Luthi-Carter, R. (2006). Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Human Molecular Genetics*, *15*(6), 965–977. https://doi.org/10.1093/hmg/ddl013

Hodgson, J. G., Agopyan, N., Gutekunst, C. A., Leavitt, B. R., LePiane, F., Singaraja, R., … Hayden, M. R. (1999). A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron*, *23*(1), 181–192.

Hoffner, G., Kahlem, P., & Djian, P. (2002). Perinuclear localization of huntingtin as a consequence of its binding to microtubules through an interaction with beta-tubulin: relevance to Huntington's disease. *J Cell Sci*, *115*(Pt 5), 941–948. https://doi.org/citeulike-article-id:12436792

Homem, C. C. F., & Knoblich, J. A. (2012). Drosophila neuroblasts: a model for stem cell biology. *Development (Cambridge, England)*, *139*(23), 4297–4310. https://doi.org/10.1242/dev.080515

Huang, K., Sanders, S. S., Kang, R., Carroll, J. B., Sutton, L., Wan, J., … Hayden, M. R.

(2011). Wild-type HTT modulates the enzymatic activity of the neuronal palmitoyl transferase HIP14. *Human Molecular Genetics*, *20*(17), 3356–3365. https://doi.org/10.1093/hmg/ddr242

Hughes, A. C., Mort, M., Elliston, L., Thomas, R. M., Brooks, S. P., Dunnett, S. B., & Jones, L. (2014). Identification of novel alternative splicing events in the huntingtin gene and assessment of the functional consequences using structural protein homology modelling. *Journal of Molecular Biology*, *426*(7), 1428–1438. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.12.028

Humbert, S., Bryson, E. A., Cordelières, F. P., Connors, N. C., Datta, S. R., Finkbeiner, S., … Saudou, F. (2002). The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt. *Developmental Cell*, *2*(6), 831–837. https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00188-0

Huttner, W. B., & Brand, M. (1997). Asymmetric division and polarity of neuroepithelial cells. *Current Opinion in Neurobiology*, *7*(1), 29–39.

Imayoshi, I., Shimojo, H., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., & Kageyama, R. (2013). Genetic visualization of notch signaling in mammalian neurogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *70*(12), 2045–2057. https://doi.org/10.1007/s00018-012-1151-x

Israsena, N., Hu, M., Fu, W., Kan, L., & Kessler, J. A. (2004). The presence of FGF2 signaling determines whether beta-catenin exerts effects on proliferation or neuronal differentiation of neural stem cells. *Developmental Biology*, *268*(1), 220–231. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.12.024

Jabaudon, D. (2017). Fate and freedom in developing neocortical circuits. *Nature Communications*, *8*, 16042. https://doi.org/10.1038/ncomms16042

Jaglin, X. H., & Chelly, J. (2009). Tubulin-related cortical dysgeneses: microtubule dysfunction underlying neuronal migration defects. *Trends in Genetics : TIG*, *25*(12), 555–566. https://doi.org/10.1016/j.tig.2009.10.003

Jana, N. R., Zemskov, E. A., Gh, W., & Nukina, N. (2001). Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Human Molecular Genetics*, *10*(10), 1049–1059.

Jansen, A. H. P., van Hal, M., Op den Kelder, I. C., Meier, R. T., de Ruiter, A.-A., Schut, M. H., … Reits, E. A. (2017). Frequency of nuclear mutant huntingtin inclusion formation in neurons and glia is cell-type-specific. *Glia*, *65*(1), 50–61. https://doi.org/10.1002/glia.23050

Jason, G. W., Pajurkova, E. M., Suchowersky, O., Hewitt, J., Hilbert, C., Reed, J., & Hayden, M. R. (1988). Presymptomatic neuropsychological impairment in Huntington's disease. *Archives of Neurology*, *45*(7), 769–773.

Javaherian, A., & Kriegstein, A. (2009). A stem cell niche for intermediate progenitor cells of the embryonic cortex. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, *19 Suppl 1*, i70-7. https://doi.org/10.1093/cercor/bhp029

Jenkins, B. G., Koroshetz, W. J., Beal, M. F., & Rosen, B. R. (1993). Evidence for impairment of energy metabolism in vivo in Huntington's disease using localized 1H NMR spectroscopy. *Neurology*, *43*(12), 2689–2695.

Jeong, H., Then, F., Melia, T. J. J., Mazzulli, J. R., Cui, L., Savas, J. N., … Krainc, D. (2009). Acetylation targets mutant huntingtin to autophagosomes for degradation. *Cell*, *137*(1), 60–72. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.018

Johnson, D. I. (1999). Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, *63*(1), 54–105.

Julien, C. L., Thompson, J. C., Wild, S., Yardumian, P., Snowden, J. S., Turner, G., & Craufurd, D. (2007). Psychiatric disorders in preclinical Huntington's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, *78*(9), 939–943. https://doi.org/10.1136/jnnp.2006.103309

Kadowaki, M., Nakamura, S., Machon, O., Krauss, S., Radice, G. L., & Takeichi, M. (2007). N-cadherin mediates cortical organization in the mouse brain. *Developmental Biology*, *304*(1), 22–33. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.12.014

Kageyama, R., Ohtsuka, T., Shimojo, H., & Imayoshi, I. (2008). Dynamic Notch signaling in neural progenitor cells and a revised view of lateral inhibition. *Nature Neuroscience*, *11*(11), 1247–1251. https://doi.org/10.1038/nn.2208

Kalchman, M. A., Graham, R. K., Xia, G., Koide, H. B., Hodgson, J. G., Graham, K. C., … Hayden, M. R. (1996). Huntingtin is ubiquitinated and interacts with a specific ubiquitin-conjugating enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*(32), 19385–19394.

Karam, A., Tebbe, L., Weber, C., Messaddeq, N., Morle, L., Kessler, P., … Trottier, Y. (2015). A novel function of Huntingtin in the cilium and retinal ciliopathy in Huntington's disease mice. *Neurobiology of Disease*, *80*, 15–28. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.05.008

Karpuj, M. V, Garren, H., Slunt, H., Price, D. L., Gusella, J., Becher, M. W., & Steinman, L. (1999). Transglutaminase aggregates huntingtin into nonamyloidogenic polymers, and its enzymatic activity increases in Huntington's disease brain nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(13), 7388–7393.

Kassubek, J., Juengling, F. D., Ecker, D., & Landwehrmeyer, G. B. (2005). Thalamic atrophy in Huntington's disease co-varies with cognitive performance: a morphometric MRI analysis. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, *15*(6), 846–853. https://doi.org/10.1093/cercor/bhh185

Kawaguchi, D., Furutachi, S., Kawai, H., Hozumi, K., & Gotoh, Y. (2013). Dll1 maintains quiescence of adult neural stem cells and segregates asymmetrically during mitosis. *Nature Communications*, *4*, 1880. https://doi.org/10.1038/ncomms2895

Kawauchi, T. (2015). Cellullar insights into cerebral cortical development: focusing on the locomotion mode of neuronal migration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*, 394. https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00394

Kawauchi, T., Chihama, K., Nabeshima, Y., & Hoshino, M. (2003). The in vivo roles of STEF/Tiam1, Rac1 and JNK in cortical neuronal migration. *The EMBO Journal*, *22*(16), 4190–4201. https://doi.org/10.1093/emboj/cdg413

Kawauchi, T., Chihama, K., Nabeshima, Y., & Hoshino, M. (2006). Cdk5 phosphorylates and stabilizes p27kip1 contributing to actin organization and cortical neuronal migration. *Nature Cell Biology*, *8*(1), 17–26. https://doi.org/10.1038/ncb1338

Kawauchi, T., Sekine, K., Shikanai, M., Chihama, K., Tomita, K., Kubo, K., … Hoshino, M. (2010). Rab GTPases-dependent endocytic pathways regulate neuronal migration and maturation through N-cadherin trafficking. *Neuron*, *67*(4), 588–602. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.07.007

Keays, D. A., Tian, G., Poirier, K., Huang, G.-J., Siebold, C., Cleak, J., … Flint, J. (2007). Mutations in alpha-tubulin cause abnormal neuronal migration in mice and lissencephaly in humans. *Cell*, *128*(1), 45–57. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.017

Kegel, K. B., Meloni, A. R., Yi, Y., Kim, Y. J., Doyle, E., Cuiffo, B. G., … Difiglia, M. (2002). Huntingtin is present in the nucleus, interacts with the transcriptional corepressor C-terminal binding protein, and represses transcription. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(9), 7466–7476. https://doi.org/10.1074/jbc.M103946200

Kemp, J. M., & Powell, T. P. (1971). The connexions of the striatum and globus pallidus: synthesis and speculation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *262*(845), 441–457. https://doi.org/10.1098/rstb.1971.0106

Keryer, G., Pineda, J. R., Liot, G., Kim, J., Dietrich, P., Benstaali, C., … Saudou, F. (2011). Ciliogenesis is regulated by a huntingtin-HAP1-PCM1 pathway and is altered in Huntington disease. *The Journal of Clinical Investigation*, *121*(11), 4372–4382. https://doi.org/10.1172/JCI57552

Khazaei, M. R., & Puschel, A. W. (2009). Phosphorylation of the par polarity complex protein Par3 at serine 962 is mediated by aurora a and regulates its function in neuronal polarity. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(48), 33571–33579. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.055897

Kholmanskikh, S. S., Dobrin, J. S., Wynshaw-Boris, A., Letourneau, P. C., & Ross, M. E. (2003). Disregulated RhoGTPases and actin cytoskeleton contribute to the migration defect in Lis1-deficient neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *23*(25), 8673–8681.

Killoran, A., Biglan, K. M., Jankovic, J., Eberly, S., Kayson, E., Oakes, D., … Shoulson, I. (2013). Characterization of the Huntington intermediate CAG repeat expansion phenotype in PHAROS. *Neurology*, *80*(22), 2022–2027. https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318294b304

Kim, D.-K., Cho, K.-W., Ahn, W. J., Perez-Acuna, D., Jeong, H., Lee, H.-J., & Lee, S.-J. (2017). Cell-to-cell Transmission of Polyglutamine Aggregates in C. elegans. *Experimental Neurobiology*, *26*(6), 321–328. https://doi.org/10.5607/en.2017.26.6.321

Kim, J., Moody, J. P., Edgerly, C. K., Bordiuk, O. L., Cormier, K., Smith, K., … Ferrante, R. J. (2010). Mitochondrial loss, dysfunction and altered dynamics in Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, *19*(20), 3919–3935. https://doi.org/10.1093/hmg/ddq306

Kim, Y. J., Yi, Y., Sapp, E., Wang, Y., Cuiffo, B., Kegel, K. B., … DiFiglia, M. (2001). Caspase 3-cleaved N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington's disease brains, associate with membranes, and undergo calpain-dependent proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(22), 12784–12789. https://doi.org/10.1073/pnas.221451398

Kishi, Y., Fujii, Y., Hirabayashi, Y., & Gotoh, Y. (2012). HMGA regulates the global chromatin state and neurogenic potential in neocortical precursor cells. *Nature Neuroscience*, *15*(8), 1127–1133. https://doi.org/10.1038/nn.3165

Komada, M. (2012). Sonic hedgehog signaling coordinates the proliferation and differentiation of neural stem/progenitor cells by regulating cell cycle kinetics during development of the neocortex. *Congenital Anomalies*, *52*(2), 72–77. https://doi.org/10.1111/j.1741-4520.2012.00368.x

Komada, M., Saitsu, H., Kinboshi, M., Miura, T., Shiota, K., & Ishibashi, M. (2008). Hedgehog signaling is involved in development of the neocortex. *Development (Cambridge, England)*, *135*(16), 2717–2727. https://doi.org/10.1242/dev.015891

Konno, D., Shioi, G., Shitamukai, A., Mori, A., Kiyonari, H., Miyata, T., & Matsuzaki, F.

(2008). Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nature Cell Biology*, *10*(1), 93–101. https://doi.org/10.1038/ncb1673

Kosodo, Y., Roper, K., Haubensak, W., Marzesco, A.-M., Corbeil, D., & Huttner, W. B. (2004). Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells. *The EMBO Journal*, *23*(11), 2314–2324. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600223

Kosodo, Y., Suetsugu, T., Suda, M., Mimori-Kiyosue, Y., Toida, K., Baba, S. A., … Matsuzaki, F. (2011). Regulation of interkinetic nuclear migration by cell cycle-coupled active and passive mechanisms in the developing brain. *The EMBO Journal*, *30*(9), 1690–1704. https://doi.org/10.1038/emboj.2011.81

Kowalczyk, T., Pontious, A., Englund, C., Daza, R. A. M., Bedogni, F., Hodge, R., … Hevner, R. F. (2009). Intermediate neuronal progenitors (basal progenitors) produce pyramidal-projection neurons for all layers of cerebral cortex. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, *19*(10), 2439–2450. https://doi.org/10.1093/cercor/bhn260

Kuemmerle, S., Gutekunst, C. A., Klein, A. M., Li, X. J., Li, S. H., Beal, M. F., … Ferrante, R. J. (1999). Huntington aggregates may not predict neuronal death in Huntington's disease. *Annals of Neurology*, *46*(6), 842–849.

Kuhn, A., Goldstein, D. R., Hodges, A., Strand, A. D., Sengstag, T., Kooperberg, C., … Luthi-Carter, R. (2007). Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage. *Human Molecular Genetics*, *16*(15), 1845–1861. https://doi.org/10.1093/hmg/ddm133

Kumar, R. A., Pilz, D. T., Babatz, T. D., Cushion, T. D., Harvey, K., Topf, M., … Dobyns, W. B. (2010). TUBA1A mutations cause wide spectrum lissencephaly (smooth brain) and suggest that multiple neuronal migration pathways converge on alpha tubulins. *Human Molecular Genetics*, *19*(14), 2817–2827. https://doi.org/10.1093/hmg/ddq182

Kuwahara, A., Hirabayashi, Y., Knoepfler, P. S., Taketo, M. M., Sakai, J., Kodama, T., & Gotoh, Y. (2010). Wnt signaling and its downstream target N-myc regulate basal progenitors in the developing neocortex. *Development (Cambridge, England)*, *137*(7), 1035–1044. https://doi.org/10.1242/dev.046417

Kwon, Y. T., & Tsai, L. H. (1998). A novel disruption of cortical development in p35(-/-) mice distinct from reeler. *The Journal of Comparative Neurology*, *395*(4), 510–522.

Labuschagne, I., Cassidy, A. M., Scahill, R. I., Johnson, E. B., Rees, E., O'Regan, A., … Stout, J. C. (2016). Visuospatial Processing Deficits Linked to Posterior Brain Regions in Premanifest and Early Stage Huntington's Disease. *Journal of the International Neuropsychological Society : JINS*, *22*(6), 595–608. https://doi.org/10.1017/S1355617716000321

Lai Wing Sun, K., Correia, J. P., & Kennedy, T. E. (2011). Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions. *Development (Cambridge, England)*, *138*(11), 2153–2169. https://doi.org/10.1242/dev.044529

Lakoma, J., Garcia-Alonso, L., & Luque, J. M. (2011). Reelin sets the pace of neocortical neurogenesis. *Development (Cambridge, England)*, *138*(23), 5223–5234. https://doi.org/10.1242/dev.063776

Lancaster, M. A., & Knoblich, J. A. (2012). Spindle orientation in mammalian cerebral cortical development. *Current Opinion in Neurobiology*, *22*(5), 737–746. https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.04.003

Lange, C., Huttner, W. B., & Calegari, F. (2009). Cdk4/cyclinD1 overexpression in neural stem cells shortens G1, delays neurogenesis, and promotes the generation and expansion of basal progenitors. *Cell Stem Cell*, *5*(3), 320–331. https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.026

Latasa, M. J., Cisneros, E., & Frade, J. M. (2009). Cell cycle control of Notch signaling and the functional regionalization of the neuroepithelium during vertebrate neurogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*, *53*(7), 895–908. https://doi.org/10.1387/ijdb.082721ml

Leavitt, B. R., van Raamsdonk, J. M., Shehadeh, J., Fernandes, H., Murphy, Z., Graham, R. K., … Hayden, M. R. (2006). Wild-type huntingtin protects neurons from excitotoxicity. *Journal of Neurochemistry*, *96*(4), 1121–1129. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03605.x

Lee, J.-M., Ramos, E. M., Lee, J.-H., Gillis, T., Mysore, J. S., Hayden, M. R., … COHORT study of the HSG. (2012). CAG repeat expansion in Huntington disease determines age at onset in a fully dominant fashion. *Neurology*, *78*(10), 690–695. https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318249f683

Lee, W.-C. M., Yoshihara, M., & Littleton, J. T. (2004). Cytoplasmic aggregates trap polyglutamine-containing proteins and block axonal transport in a Drosophila model of Huntington's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(9), 3224–3229. https://doi.org/10.1073/pnas.0400243101

Legendre-Guillemin, V., Metzler, M., Charbonneau, M., Gan, L., Chopra, V., Philie, J., … McPherson, P. S. (2002). HIP1 and HIP12 display differential binding to F-actin, AP2, and clathrin. Identification of a novel interaction with clathrin light chain. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(22), 19897–19904. https://doi.org/10.1074/jbc.M112310200

Leone, D. P., Heavner, W. E., Ferenczi, E. A., Dobreva, G., Huguenard, J. R., Grosschedl, R., & McConnell, S. K. (2015). Satb2 Regulates the Differentiation of Both Callosal and Subcerebral Projection Neurons in the Developing Cerebral Cortex. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, *25*(10), 3406–3419. https://doi.org/10.1093/cercor/bhu156

Leone, D. P., Srinivasan, K., Chen, B., Alcamo, E., & McConnell, S. K. (2008). The determination of projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Current Opinion in Neurobiology*, *18*(1), 28–35. https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.05.006

Levine, M. S., Cepeda, C., & Andre, V. M. (2010). Location, location, location: contrasting roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in Huntington's disease. *Neuron*, *65*(2), 145–147. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.01.010

Leyva-Diaz, E., del Toro, D., Menal, M. J., Cambray, S., Susin, R., Tessier-Lavigne, M., … Lopez-Bendito, G. (2014). FLRT3 is a Robo1-interacting protein that determines Netrin-1 attraction in developing axons. *Current Biology : CB*, *24*(5), 494–508. https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.01.042

Leyva-Diaz, E., & Lopez-Bendito, G. (2013). In and out from the cortex: development of major forebrain connections. *Neuroscience*, *254*, 26–44. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.08.070

Li, J., Lee, W.-L., & Cooper, J. A. (2005). NudEL targets dynein to microtubule ends through LIS1. *Nature Cell Biology*, *7*(7), 686–690. https://doi.org/10.1038/ncb1273

Li, L., Wei, D., Wang, Q., Pan, J., Liu, R., Zhang, X., & Bao, L. (2012). MEC-17 deficiency leads to reduced alpha-tubulin acetylation and impaired migration of cortical neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *32*(37), 12673–12683. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0016-12.2012

Li, X.-J., Friedman, M., & Li, S. (2007). Interacting proteins as genetic modifiers of Huntington disease. *Trends in Genetics : TIG*, *23*(11), 531–533. https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.07.007

Li, X. J., Li, S. H., Sharp, A. H., Nucifora, F. C. J., Schilling, G., Lanahan, A., … Ross, C. A. (1995). A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology. *Nature*, *378*(6555), 398–402. https://doi.org/10.1038/378398a0

Li, X., Sapp, E., Valencia, A., Kegel, K. B., Qin, Z.-H., Alexander, J., … Difiglia, M. (2008). A function of huntingtin in guanine nucleotide exchange on Rab11. *Neuroreport*, *19*(16), 1643–1647. https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e328315cd4c

Liot, G., Zala, D., Pla, P., Mottet, G., Piel, M., & Saudou, F. (2013). Mutant Huntingtin alters retrograde transport of TrkB receptors in striatal dendrites. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *33*(15), 6298–6309. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2033-12.2013

Liu, A., Wang, B., & Niswander, L. A. (2005). Mouse intraflagellar transport proteins regulate both the activator and repressor functions of Gli transcription factors. *Development (Cambridge, England)*, *132*(13), 3103–3111. https://doi.org/10.1242/dev.01894

Liu, X., Hashimoto-Torii, K., Torii, M., Ding, C., & Rakic, P. (2010). Gap junctions/hemichannels modulate interkinetic nuclear migration in the forebrain precursors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *30*(12), 4197–4209. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4187-09.2010

Liu, X., Peng, T., & Li, H. (2018). Using Huntingtin Knock-In Minipigs to Fill the Gap Between Mouse Models and Patients with Huntington's Disease. *Neuroscience Bulletin*, 10–12. https://doi.org/10.1007/s12264-018-0272-0

Liu, X., Sun, L., Torii, M., & Rakic, P. (2012). Connexin 43 controls the multipolar phase of neuronal migration to the cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(21), 8280–8285. https://doi.org/10.1073/pnas.1205880109

Liu, Z., Steward, R., & Luo, L. (2000). Drosophila Lis1 is required for neuroblast proliferation, dendritic elaboration and axonal transport. *Nature Cell Biology*, *2*(11), 776–783. https://doi.org/10.1038/35041011

Lo Sardo, V., Zuccato, C., Gaudenzi, G., Vitali, B., Ramos, C., Tartari, M., … Cattaneo, E. (2012). An evolutionary recent neuroepithelial cell adhesion function of huntingtin implicates ADAM10-Ncadherin. *Nature Neuroscience*, *15*(5), 713–721. https://doi.org/10.1038/nn.3080

Lodato, S., Shetty, A. S., & Arlotta, P. (2015). Cerebral cortex assembly: generating and reprogramming projection neuron diversity. *Trends in Neurosciences*, *38*(2), 117–125. https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.11.003

Lui, J. H., Hansen, D. V, & Kriegstein, A. R. (2011). Development and evolution of the human neocortex. *Cell*, *146*(1), 18–36. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.030

Luthi-Carter, R., Hanson, S. A., Strand, A. D., Bergstrom, D. A., Chun, W., Peters, N. L., … Olson, J. M. (2002). Dysregulation of gene expression in the R6/2 model of polyglutamine disease: parallel changes in muscle and brain. *Human Molecular Genetics*, *11*(17), 1911–1926. https://doi.org/10.1093/hmg/11.17.1911

Luthi-Carter, R., Strand, A., Peters, N. L., Solano, S. M., Hollingsworth, Z. R., Menon, A. S., … Olson, J. M. (2000). Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, *9*(9), 1259–1271. https://doi.org/10.1093/hmg/9.9.1259

Ma, B., Savas, J. N., Yu, M.-S., Culver, B. P., Chao, M. V, & Tanese, N. (2011). Huntingtin mediates dendritic transport of beta-actin mRNA in rat neurons. *Scientific Reports*, *1*, 140. https://doi.org/10.1038/srep00140

Ma, S., Kwon, H. J., Johng, H., Zang, K., & Huang, Z. (2013). Radial glial neural progenitors regulate nascent brain vascular network stabilization via inhibition of Wnt signaling. *PLoS Biology*, *11*(1), e1001469. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001469

Macdonald, V., & Halliday, G. (2002). Pyramidal cell loss in motor cortices in Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*, *10*(3), 378–386. https://doi.org/10.1006/nbdi.2002.0528

Macdonald, V., Halliday, G. M., Trent, R. J., & McCusker, E. A. (1997). Significant loss of pyramidal neurons in the angular gyrus of patients with Huntington's disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *23*(6), 492–495. https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1997.tb01326.x

Machon, O., van den Bout, C. J., Backman, M., Kemler, R., & Krauss, S. (2003). Role of beta-catenin in the developing cortical and hippocampal neuroepithelium. *Neuroscience*, *122*(1), 129–143.

Malatesta, P., Appolloni, I., & Calzolari, F. (2008). Radial glia and neural stem cells. *Cell and Tissue Research*, *331*(1), 165–178. https://doi.org/10.1007/s00441-007-0481-8

Malatesta, P., Hack, M. A., Hartfuss, E., Kettenmann, H., Klinkert, W., Kirchhoff, F., & Gotz, M. (2003). Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron*, *37*(5), 751–764.

Mandel, G., Fiondella, C. G., Covey, M. V, Lu, D. D., Loturco, J. J., & Ballas, N. (2011). Repressor element 1 silencing transcription factor (REST) controls radial migration and temporal neuronal specification during neocortical development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(40), 16789–16794. https://doi.org/10.1073/pnas.1113486108

Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., … Bates, G. P. (1996). Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*, *87*(3), 493–506.

Marcora, E., Gowan, K., & Lee, J. E. (2003). Stimulation of NeuroD activity by huntingtin and huntingtin-associated proteins HAP1 and MLK2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(16), 9578–9583. https://doi.org/10.1073/pnas.1133382100

Marcora, E., & Kennedy, M. B. (2010). The Huntington's disease mutation impairs Huntingtin's role in the transport of NF-kappaB from the synapse to the nucleus. *Human Molecular Genetics*, *19*(22), 4373–4384. https://doi.org/10.1093/hmg/ddq358

Marques Sousa, C., & Humbert, S. (2013). Huntingtin: Here, there, everywhere! *Journal of Huntington's Disease*, *2*(4), 395–403. https://doi.org/10.3233/JHD-130082

Marthiens, V., & ffrench-Constant, C. (2009). Adherens junction domains are split by asymmetric division of embryonic neural stem cells. *EMBO Reports*, *10*(5), 515–520. https://doi.org/10.1038/embor.2009.36

Martin, D. D. O., Heit, R. J., Yap, M. C., Davidson, M. W., Hayden, M. R., & Berthiaume, L. G. (2014). Identification of a post-translationally myristoylated autophagy-inducing domain released by caspase cleavage of huntingtin. *Human Molecular Genetics*, *23*(12), 3166–3179. https://doi.org/10.1093/hmg/ddu027

Matsunaga, Y., Noda, M., Murakawa, H., Hayashi, K., Nagasaka, A., Inoue, S., … Nakajima,

K. (2017). Reelin transiently promotes N-cadherin-dependent neuronal adhesion during mouse cortical development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(8), 2048–2053. https://doi.org/10.1073/pnas.1615215114

McConnell, S. K., & Kaznowski, C. E. (1991). Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex. *Science (New York, N.Y.)*, *254*(5029), 282–285.

McGeer, E. G., & McGeer, P. L. (1976). Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acids. *Nature*, *263*(5577), 517–519.

McGuire, J. R., Rong, J., Li, S.-H., & Li, X.-J. (2006). Interaction of Huntingtin-associated protein-1 with kinesin light chain: implications in intracellular trafficking in neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(6), 3552–3559. https://doi.org/10.1074/jbc.M509806200

McKenna, W. L., Betancourt, J., Larkin, K. A., Abrams, B., Guo, C., Rubenstein, J. L. R., & Chen, B. (2011). Tbr1 and Fezf2 regulate alternate corticofugal neuronal identities during neocortical development. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *31*(2), 549–564. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4131-10.2011

McKinstry, S. U., Karadeniz, Y. B., Worthington, A. K., Hayrapetyan, V. Y., Ozlu, M. I., Serafin-Molina, K., … Eroglu, C. (2014). Huntingtin is required for normal excitatory synapse development in cortical and striatal circuits. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *34*(28), 9455–9472. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4699-13.2014

McNeil, S. M., Novelletto, A., Srinidhi, J., Barnes, G., Kornbluth, I., Altherr, M. R., … Myers, R. H. (1997). Reduced penetrance of the Huntington's disease mutation. *Human Molecular Genetics*, *6*(5), 775–779. https://doi.org/10.1093/hmg/6.5.775

Menalled, L. B., Kudwa, A. E., Miller, S., Fitzpatrick, J., Watson-Johnson, J., Keating, N., … Howland, D. (2012). Comprehensive behavioral and molecular characterization of a new knock-in mouse model of Huntington's disease: zQ175. *PloS One*, *7*(12), e49838. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049838

Menalled, L. B., Sison, J. D., Dragatsis, I., Zeitlin, S., & Chesselet, M.-F. (2003). Time course of early motor and neuropathological anomalies in a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. *The Journal of Comparative Neurology*, *465*(1), 11–26. https://doi.org/10.1002/cne.10776

Mende-Mueller, L. M., Toneff, T., Hwang, S. R., Chesselet, M. F., & Hook, V. Y. (2001). Tissue-specific proteolysis of Huntingtin (htt) in human brain: evidence of enhanced levels of N- and C-terminal htt fragments in Huntington's disease striatum. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *21*(6), 1830–1837.

Mesngon, M. T., Tarricone, C., Hebbar, S., Guillotte, A. M., Schmitt, E. W., Lanier, L., … Smith, D. S. (2006). Regulation of cytoplasmic dynein ATPase by Lis1. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *26*(7), 2132–2139. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5095-05.2006

Mihalas, A. B., & Hevner, R. F. (2018). Clonal analysis reveals laminar fate multipotency and daughter cell apoptosis of mouse cortical intermediate progenitors. *Development (Cambridge, England)*, *145*(17). https://doi.org/10.1242/dev.164335

Miyata, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Kawano, M., Muto, T., & Ogawa, M. (2004). Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells.

Development (Cambridge, England), *131*(13), 3133–3145. https://doi.org/10.1242/dev.01173

Miyata, T., Okamoto, M., Shinoda, T., & Kawaguchi, A. (2014). Interkinetic nuclear migration generates and opposes ventricular-zone crowding: insight into tissue mechanics. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*, 473. https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00473

Molero, A. E., Arteaga-Bracho, E. E., Chen, C. H., Gulinello, M., Winchester, M. L., Pichamoorthy, N., … Mehler, M. F. (2016). Selective expression of mutant huntingtin during development recapitulates characteristic features of Huntington's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(20), 5736–5741. https://doi.org/10.1073/pnas.1603871113

Molina-Calavita, M., Barnat, M., Elias, S., Aparicio, E., Piel, M., & Humbert, S. (2014). Mutant huntingtin affects cortical progenitor cell division and development of the mouse neocortex. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *34*(30), 10034–10040. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0715-14.2014

Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Menezes, J. R. L., & Macklis, J. D. (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nature Reviews Neuroscience*, *8*(6), 427–437. https://doi.org/10.1038/nrn2151

Montoya, A., Price, B. H., Menear, M., & Lepage, M. (2006). Brain imaging and cognitive dysfunctions in Huntington's disease. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, *31*(1), 21–29. https://doi.org/.

Moon, H. M., Youn, Y. H., Pemble, H., Yingling, J., Wittmann, T., & Wynshaw-Boris, A. (2014). LIS1 controls mitosis and mitotic spindle organization via the LIS1-NDEL1-dynein complex. *Human Molecular Genetics*, *23*(2), 449–466. https://doi.org/10.1093/hmg/ddt436

Morin, X., Jaouen, F., & Durbec, P. (2007). Control of planar divisions by the G-protein regulator LGN maintains progenitors in the chick neuroepithelium. *Nature Neuroscience*, *10*(11), 1440–1448. https://doi.org/10.1038/nn1984

Munji, R. N., Choe, Y., Li, G., Siegenthaler, J. A., & Pleasure, S. J. (2011). Wnt signaling regulates neuronal differentiation of cortical intermediate progenitors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *31*(5), 1676–1687. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5404-10.2011

Murphy, K. P., Carter, R. J., Lione, L. A., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G. P., … Morton, A. J. (2000). Abnormal synaptic plasticity and impaired spatial cognition in mice transgenic for exon 1 of the human Huntington's disease mutation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *20*(13), 5115–5123.

Nachury, M. V, Loktev, A. V, Zhang, Q., Westlake, C. J., Peranen, J., Merdes, A., … Jackson, P. K. (2007). A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. *Cell*, *129*(6), 1201–1213. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.053

Nakayama, A. Y., Harms, M. B., & Luo, L. (2000). Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *20*(14), 5329–5338.

Namba, T., Kibe, Y., Funahashi, Y., Nakamuta, S., Takano, T., Ueno, T., … Kaibuchi, K. (2014). Pioneering axons regulate neuronal polarization in the developing cerebral cortex. *Neuron*, *81*(4), 814–829. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.015

Namihira, M., Kohyama, J., Semi, K., Sanosaka, T., Deneen, B., Taga, T., & Nakashima, K. (2009). Committed neuronal precursors confer astrocytic potential on residual neural precursor cells. *Developmental Cell*, *16*(2), 245–255. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.12.014

Nasir, J., Floresco, S. B., O'Kusky, J. R., Diewert, V. M., Richman, J. M., Zeisler, J., … Hayden, M. R. (1995). Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell*, *81*(5), 811–823.

Nechiporuk, T., McGann, J., Mullendorff, K., Hsieh, J., Wurst, W., Floss, T., & Mandel, G. (2016). The REST remodeling complex protects genomic integrity during embryonic neurogenesis. *ELife*, *5*, e09584. https://doi.org/10.7554/eLife.09584

Neueder, A., Dumas, A. A., Benjamin, A. C., & Bates, G. P. (2018). Regulatory mechanisms of incomplete huntingtin mRNA splicing. *Nature Communications*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-018-06281-3

Neueder, A., Landles, C., Ghosh, R., Howland, D., Myers, R. H., Faull, R. L. M., … Bates, G. P. (2017). The pathogenic exon 1 HTT protein is produced by incomplete splicing in Huntington's disease patients. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–10. https://doi.org/10.1038/s41598-017-01510-z

Neveklovska, M., Clabough, E. B. D., Steffan, J. S., & Zeitlin, S. O. (2012). Deletion of the huntingtin proline-rich region does not significantly affect normal huntingtin function in mice. *Journal of Huntington's Disease*, *1*(1), 71–87. https://doi.org/10.3233/JHD-2012-120016

Nguyen, G. D., Gokhan, S., Molero, A. E., & Mehler, M. F. (2013). Selective roles of normal and mutant huntingtin in neural induction and early neurogenesis. *PloS One*, *8*(5), e64368. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064368

Nguyen, M. M., McCracken, C. J., Milner, E. S., Goetschius, D. J., Weiner, A. T., Long, M. K., … Rolls, M. M. (2014). Gamma-tubulin controls neuronal microtubule polarity independently of Golgi outposts. *Molecular Biology of the Cell*, *25*(13), 2039–2050. https://doi.org/10.1091/mbc.E13-09-0515

Nguyen, M. M., Stone, M. C., & Rolls, M. M. (2011). Microtubules are organized independently of the centrosome in Drosophila neurons. *Neural Development*, *6*, 38. https://doi.org/10.1186/1749-8104-6-38

Nicklas, S., Hillje, A.-L., Okawa, S., Rudolph, I.-M., Collmann, F. M., van Wuellen, T., … Schwamborn, J. C. (2019). A complex of the ubiquitin ligase TRIM32 and the deubiquitinase USP7 balances the level of c-Myc ubiquitination and thereby determines neural stem cell fate specification. *Cell Death and Differentiation*, *26*(4), 728–740. https://doi.org/10.1038/s41418-018-0144-1

Nikolopoulou, E., Galea, G. L., Rolo, A., Greene, N. D. E., & Copp, A. J. (2017). Neural tube closure: cellular, molecular and biomechanical mechanisms. *Development (Cambridge, England)*, *144*(4), 552–566. https://doi.org/10.1242/dev.145904

Nishimura, Y. V, Shikanai, M., Hoshino, M., Ohshima, T., Nabeshima, Y., Mizutani, K.-I., … Kawauchi, T. (2014). Cdk5 and its substrates, Dcx and p27kip1, regulate cytoplasmic dilation formation and nuclear elongation in migrating neurons. *Development (Cambridge, England)*, *141*(18), 3540–3550. https://doi.org/10.1242/dev.111294

Noctor, S. C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L., & Kriegstein, A. R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature Neuroscience*, *7*(2), 136–144. https://doi.org/10.1038/nn1172

Noctor, S. C., Martinez-Cerdeno, V., & Kriegstein, A. R. (2008). Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *The Journal of Comparative Neurology*, *508*(1), 28–44. https://doi.org/10.1002/cne.21669

Nopoulos, P. C., Aylward, E. H., Ross, C. A., Mills, J. A., Langbehn, D. R., Johnson, H. J., … Paulsen, J. S. (2011). Smaller intracranial volume in prodromal Huntington's disease: Evidence for abnormal neurodevelopment. *Brain*, *134*(1), 137–142. https://doi.org/10.1093/brain/awq280

Nucifora, F. C. J., Sasaki, M., Peters, M. F., Huang, H., Cooper, J. K., Yamada, M., … Ross, C. A. (2001). Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science (New York, N.Y.)*, *291*(5512), 2423–2428. https://doi.org/10.1126/science.1056784

Nusser, N., Gosmanova, E., Makarova, N., Fujiwara, Y., Yang, L., Guo, F., … Tigyi, G. (2006). Serine phosphorylation differentially affects RhoA binding to effectors: implications to NGF-induced neurite outgrowth. *Cellular Signalling*, *18*(5), 704–714. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.06.010

Oberst, P., Agirman, G., & Jabaudon, D. (2019). Principles of progenitor temporal patterning in the developing invertebrate and vertebrate nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*, *56*, 185–193. https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.03.004

Ochaba, J., Lukacsovich, T., Csikos, G., Zheng, S., Margulis, J., Salazar, L., … Steffan, J. S. (2014). Potential function for the Huntingtin protein as a scaffold for selective autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(47), 16889–16894. https://doi.org/10.1073/pnas.1420103111

Ohshima, T., Hirasawa, M., Tabata, H., Mutoh, T., Adachi, T., Suzuki, H., … Mikoshiba, K. (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 (Cambridge, England)*, *134*(12), 2273–2282. https://doi.org/10.1242/dev.02854

Ohtaka-Maruyama, C., Okamoto, M., Endo, K., Oshima, M., Kaneko, N., Yura, K., … Maeda, N. (2018). Synaptic transmission from subplate neurons controls radial migration of neocortical neurons. *Science (New York, N.Y.)*, *360*(6386), 313–317. https://doi.org/10.1126/science.aar2866

Oishi, K., & Nakajima, K. (2018). Subtype Specification of Cerebral Cortical Neurons in Their Immature Stages. *Neurochemical Research*, *43*(1), 238–244. https://doi.org/10.1007/s11064-017-2441-3

Okamoto, S., Pouladi, M. A., Talantova, M., Yao, D., Xia, P., Ehrnhoefer, D. E., … Lipton, S. A. (2009). Balance between synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor activity influences inclusions and neurotoxicity of mutant huntingtin. *Nature Medicine*, *15*(12), 1407–1413. https://doi.org/10.1038/nm.2056

Ori-McKenney, K. M., Jan, L. Y., & Jan, Y.-N. (2012). Golgi outposts shape dendrite morphology by functioning as sites of acentrosomal microtubule nucleation in neurons. *Neuron*, *76*(5), 921–930. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.10.008

Ornitz, D. M., & Itoh, N. (2015). The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, *4*(3), 215–266. https://doi.org/10.1002/wdev.176

Orr, A. L., Li, S., Wang, C.-E., Li, H., Wang, J., Rong, J., … Li, X.-J. (2008). N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*,

28(11), 2783–2792. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0106-08.2008

Pal, A., Severin, F., Lommer, B., Shevchenko, A., & Zerial, M. (2006). Huntingtin-HAP40 complex is a novel Rab5 effector that regulates early endosome motility and is up-regulated in Huntington's disease. *The Journal of Cell Biology*, *172*(4), 605–618. https://doi.org/10.1083/jcb.200509091

Palidwor, G. A., Shcherbinin, S., Huska, M. R., Rasko, T., Stelzl, U., Arumughan, A., … Andrade-Navarro, M. A. (2009). Detection of alpha-rod protein repeats using a neural network and application to huntingtin. *PLoS Computational Biology*, *5*(3). https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000304

Pandey, N. K., Isas, J. M., Rawat, A., Lee, R. V, Langen, J., Pandey, P., & Langen, R. (2018). The 17-residue-long N terminus in huntingtin controls stepwise aggregation in solution and on membranes via different mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*, *293*(7), 2597–2605. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.813667

Panov, A. V., Gutekunst, C. A., Leavitt, B. R., Hayden, M. R., Burke, J. R., Strittmatter, W. J., & Greenamyre, J. T. (2002). Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nature Neuroscience*, *5*(8), 731–736. https://doi.org/10.1038/nn884

Paridaen, J. T. M. L., Wilsch-Brauninger, M., & Huttner, W. B. (2013). Asymmetric inheritance of centrosome-associated primary cilium membrane directs ciliogenesis after cell division. *Cell*, *155*(2), 333–344. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.060

Parker, J. A., Connolly, J. B., Wellington, C., Hayden, M., Dausset, J., & Neri, C. (2001). Expanded polyglutamines in Caenorhabditis elegans cause axonal abnormalities and severe dysfunction of PLM mechanosensory neurons without cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(23), 13318–13323. https://doi.org/10.1073/pnas.231476398

Parsons, M. P., Kang, R., Buren, C., Dau, A., Southwell, A. L., Doty, C. N., … Raymond, L. A. (2014). Bidirectional control of postsynaptic density-95 (PSD-95) clustering by Huntingtin. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(6), 3518–3528. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.513945

Paulsen, J. S. (2011). Cognitive impairment in Huntington disease: Diagnosis and treatment. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, *11*(5), 474–483. https://doi.org/10.1007/s11910-011-0215-x

Pearce, M. M. P., Spartz, E. J., Hong, W., Luo, L., & Kopito, R. R. (2015). Prion-like transmission of neuronal huntingtin aggregates to phagocytic glia in the Drosophila brain. *Nature Communications*, *6*, 6768. https://doi.org/10.1038/ncomms7768

Pedersen, L. B., Mogensen, J. B., & Christensen, S. T. (2016). Endocytic Control of Cellular Signaling at the Primary Cilium. *Trends in Biochemical Sciences*, *41*(9), 784–797. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.06.002

Peng, Q., Wu, B., Jiang, M., Jin, J., Hou, Z., Zheng, J., … Duan, W. (2016). Characterization of Behavioral, Neuropathological, Brain Metabolic and Key Molecular Changes in zQ175 Knock-In Mouse Model of Huntington's Disease. *PloS One*, *11*(2), e0148839. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148839

Peyre, E., Jaouen, F., Saadaoui, M., Haren, L., Merdes, A., Durbec, P., & Morin, X. (2011). A lateral belt of cortical LGN and NuMA guides mitotic spindle movements and planar division in neuroepithelial cells. *The Journal of Cell Biology*, *193*(1), 141–154. https://doi.org/10.1083/jcb.201101039

Peyre, E., & Morin, X. (2012). An oblique view on the role of spindle orientation in vertebrate

neurogenesis. *Development, Growth & Differentiation*, *54*(3), 287–305. https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2012.01350.x

Pilaz, L.-J., Patti, D., Marcy, G., Ollier, E., Pfister, S., Douglas, R. J., … Dehay, C. (2009). Forced G1-phase reduction alters mode of division, neuron number, and laminar phenotype in the cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(51), 21924–21929. https://doi.org/10.1073/pnas.0909894106

Piper, M., Plachez, C., Zalucki, O., Fothergill, T., Goudreau, G., Erzurumlu, R., … Richards, L. J. (2009). Neuropilin 1-Sema signaling regulates crossing of cingulate pioneering axons during development of the corpus callosum. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, *19 Suppl 1*, i11-21. https://doi.org/10.1093/cercor/bhp027

Pouladi, M. A., Morton, A. J., & Hayden, M. R. (2013). Choosing an animal model for the study of Huntington's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(10), 708–721. https://doi.org/10.1038/nrn3570

Quarrell, O., O'Donovan, K. L., Bandmann, O., & Strong, M. (2012). The Prevalence of Juvenile Huntington's Disease: A Review of the Literature and Meta-Analysis. *PLoS Currents*, *4*, e4f8606b742ef3. https://doi.org/10.1371/4f8606b742ef3

Quigley, J. (2017). Juvenile Huntington's Disease: Diagnostic and Treatment Considerations for the Psychiatrist. *Current Psychiatry Reports*, *19*(2), 17–20. https://doi.org/10.1007/s11920-017-0759-9

Rakic, P. (1971). Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Research*, *33*(2), 471–476.

Rakic, P. (1974). Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science (New York, N.Y.)*, *183*(4123), 425–427.

Ranen, N. G., Stine, C., Abbott, M. H., Sherr, M., Codori, A.-M., Louise Franz, M., … Ranen or Christopher A Ross, N. G. (1995). Anticipation and Instability of IT-IS (CAG)N Repeats in Parent- Offspring Pairs with Huntington Disease. *Am. J. Hum. Genet*, *57*, 593–602. https://doi.org/10.1007/s10689-013-9669-0

Rash, B. G., Lim, H. D., Breunig, J. J., & Vaccarino, F. M. (2011). FGF signaling expands embryonic cortical surface area by regulating Notch-dependent neurogenesis. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *31*(43), 15604–15617. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4439-11.2011

Ravindran, S., Nalavadi, V. C., & Muddashetty, R. S. (2019). BDNF Induced Translation of Limk1 in Developing Neurons Regulates Dendrite Growth by Fine-Tuning Cofilin1 Activity. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *12*, 64. https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00064

Reillo, I., de Juan Romero, C., Garcia-Cabezas, M. A., & Borrell, V. (2011). A role for intermediate radial glia in the tangential expansion of the mammalian cerebral cortex. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, *21*(7), 1674–1694. https://doi.org/10.1093/cercor/bhq238

Reiner, A., Albin, R. L., Anderson, K. D., D'Amato, C. J., Penney, J. B., & Young, A. B. (1988). Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *85*(15), 5733–5737. https://doi.org/10.1073/pnas.85.15.5733

Reiner, A., Del Mar, N., Meade, C. A., Yang, H., Dragatsis, I., Zeitlin, S., & Goldowitz, D. (2001). Neurons lacking huntingtin differentially colonize brain and survive in chimeric mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for*

Neuroscience, *21*(19), 7608–7619.

Reiner, O., & Sapir, T. (2013). LIS1 functions in normal development and disease. *Current Opinion in Neurobiology*, *23*(6), 951–956. https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.08.001

Richfield, E. K., Maguire-Zeiss, K. A., Vonkeman, H. E., & Voorn, P. (1995). Preferential loss of preproenkephalin versus preprotachykinin neurons from the striatum of Huntington's disease patients. *Annals of Neurology*, *38*(6), 852–861. https://doi.org/10.1002/ana.410380605

Rigamonti, D., Sipione, S., Goffredo, D., Zuccato, C., Fossale, E., & Cattaneo, E. (2001). Huntingtin's neuroprotective activity occurs via inhibition of procaspase-9 processing. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(18), 14545–14548. https://doi.org/10.1074/jbc.C100044200

Ring, K. L., An, M. C., Zhang, N., O'Brien, R. N., Ramos, E. M., Gao, F., … Ellerby, L. M. (2015). Genomic Analysis Reveals Disruption of Striatal Neuronal Development and Therapeutic Targets in Human Huntington's Disease Neural Stem Cells. *Stem Cell Reports*, *5*(6), 1023–1038. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.11.005

Ritch, J. J., Valencia, A., Alexander, J., Sapp, E., Gatune, L., Sangrey, G. R., … Kegel, K. B. (2012). Multiple phenotypes in Huntington disease mouse neural stem cells. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *50*(1), 70–81. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.03.011

Rivas, R. J., & Hatten, M. E. (1995). Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *15*(2), 981–989.

Romo, L., Ashar-Patel, A., Pfister, E., & Aronin, N. (2017). Alterations in mRNA 3′ UTR Isoform Abundance Accompany Gene Expression Changes in Human Huntington's Disease Brains. *Cell Reports*, *20*(13), 3057–3070. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.009

Romo, L., Mohn, E. S., & Aronin, N. (2018). A fresh look at huntingtin mRNA processing in huntington's disease. *Journal of Huntington's Disease*, *7*(2), 101–108. https://doi.org/10.3233/JHD-180292

Rong, J., Li, S.-H., & Li, X.-J. (2007). Regulation of intracellular HAP1 trafficking. *Journal of Neuroscience Research*, *85*(14), 3025–3029. https://doi.org/10.1002/jnr.21326

Rosas, H. D., Koroshetz, W. J., Chen, Y. I., Skeuse, C., Vangel, M., Cudkowicz, M. E., … Goldstein, J. M. (2003). Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD: an MRI-based morphometric analysis. *Neurology*, *60*(10), 1615–1620. https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000065888.88988.6e

Rosas, H. D., Liu, A. K., Hersch, S., Glessner, M., Ferrante, R. J., Salat, D. H., … Fischl, B. (2002). Regional and progressive thinning of the cortical ribbon in Huntington's disease. *Neurology*, *58*(5), 695–701. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11889230

Rosas, H. D., Salat, D. H., Lee, S. Y., Zaleta, A. K., Pappu, V., Fischl, B., … Hersch, S. M. (2008). Cerebral cortex and the clinical expression of Huntington's disease: Complexity and heterogeneity. *Brain*, *131*(4), 1057–1068. https://doi.org/10.1093/brain/awn025

Ross, C. A. (1997). Intranuclear neuronal inclusions: a common pathogenic mechanism for glutamine-repeat neurodegenerative diseases? *Neuron*, *19*(6), 1147–1150.

Ross, C. A., & Tabrizi, S. J. (2011). Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *The Lancet. Neurology*, *10*(1), 83–98. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70245-3

Roszko, I., Afonso, C., Henrique, D., & Mathis, L. (2006). Key role played by RhoA in the balance between planar and apico-basal cell divisions in the chick neuroepithelium. *Developmental Biology*, *298*(1), 212–224. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.06.031

Rousso, D. L., Pearson, C. A., Gaber, Z. B., Miquelajauregui, A., Li, S., Portera-Cailliau, C., … Novitch, B. G. (2012). Foxp-mediated suppression of N-cadherin regulates neuroepithelial character and progenitor maintenance in the CNS. *Neuron*, *74*(2), 314–330. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.024

Rub, U., Hoche, F., Brunt, E. R., Heinsen, H., Seidel, K., Del Turco, D., … den Dunnen, W. F. (2013). Degeneration of the cerebellum in Huntington's disease (HD): possible relevance for the clinical picture and potential gateway to pathological mechanisms of the disease process. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, *23*(2), 165–177. https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2012.00629.x

Rüb, U., Seidel, K., Vonsattel, J. P., Lange, H. W., Eisenmenger, W., Götz, M., … Heinsen, H. (2015). Huntington's Disease (HD): Neurodegeneration of Brodmann's Primary Visual Area 17 (BA17). *Brain Pathology*, *25*(6), 701–711. https://doi.org/10.1111/bpa.12237

Rubinsztein, D. C., Leggo, J., Coles, R., Almqvist, E., Biancalana, V., Cassiman, J. J., … Hayden, M. R. (1996). Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *American Journal of Human Genetics*, *59*(1), 16–22. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8659522

Rui, Y.-N., Xu, Z., Patel, B., Chen, Z., Chen, D., Tito, A., … Zhang, S. (2015). Huntingtin functions as a scaffold for selective macroautophagy. *Nature Cell Biology*, *17*(3), 262–275. https://doi.org/10.1038/ncb3101

Ruzo, A., Croft, G. F., Metzger, J. J., Galgoczi, S., Gerber, L. J., Pellegrini, C., … Brivanlou, A. H. (2018). Chromosomal instability during neurogenesis in Huntington's disease. *Development (Cambridge, England)*, *145*(2). https://doi.org/10.1242/dev.156844

Sahara, S., & O'Leary, D. D. M. (2009). Fgf10 regulates transition period of cortical stem cell differentiation to radial glia controlling generation of neurons and basal progenitors. *Neuron*, *63*(1), 48–62. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.06.006

Sanders, S. S., & Hayden, M. R. (2015). Aberrant palmitoylation in Huntington disease. *Biochemical Society Transactions*, *43*(2), 205–210. https://doi.org/10.1042/BST20140242

Sarmiere, P. D., & Bamburg, J. R. (2004). Regulation of the neuronal actin cytoskeleton by ADF/cofilin. *Journal of Neurobiology*, *58*(1), 103–117. https://doi.org/10.1002/neu.10267

Sathasivam, K., Hobbs, C., Turmaine, M., Mangiarini, L., Mahal, A., Bertaux, F., … Bates, G. P. (1999). Formation of polyglutamine inclusions in non-CNS tissue. *Human Molecular Genetics*, *8*(5), 813–822.

Sathasivam, K., Neueder, A., Gipson, T. A., Landles, C., Benjamin, A. C., Bondulich, M. K., … Bates, G. P. (2013). Aberrant splicing of HTT generates the pathogenic exon 1 protein in Huntington disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(6), 2366–2370. https://doi.org/10.1073/pnas.1221891110

Satoh, D., Sato, D., Tsuyama, T., Saito, M., Ohkura, H., Rolls, M. M., … Uemura, T. (2008). Spatial control of branching within dendritic arbors by dynein-dependent transport of Rab5-endosomes. *Nature Cell Biology*, *10*(10), 1164–1171. https://doi.org/10.1038/ncb1776

Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D., & Greenberg, M. E. (1998). Huntingtin acts in the

nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell*, *95*(1), 55–66.

Saudou, F., & Humbert, S. (2016). The Biology of Huntingtin. *Neuron*, *89*(5), 910–926. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.003

Sauer, B. (2002). Cre/lox: one more step in the taming of the genome. *Endocrine*, *19*(3), 221–228.

SAUER, M. E., & WALKER, B. E. (1959). Radioautographic study of interkinetic nuclear migration in the neural tube. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, *101*(3), 557–560.

Schenk, J., Wilsch-Brauninger, M., Calegari, F., & Huttner, W. B. (2009). Myosin II is required for interkinetic nuclear migration of neural progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(38), 16487–16492. https://doi.org/10.1073/pnas.0908928106

Scherzinger, E., Sittler, A., Schweiger, K., Heiser, V., Lurz, R., Hasenbank, R., … Wanker, E. E. (1999). Self-assembly of polyglutamine-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils: implications for Huntington's disease pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(8), 4604–4609.

Schliwa, M., & Woehlke, G. (2003). Molecular motors. *Nature*, *422*(6933), 759–765. https://doi.org/10.1038/nature01601

Schwamborn, J. C., Berezikov, E., & Knoblich, J. A. (2009). The TRIM-NHL protein TRIM32 activates microRNAs and prevents self-renewal in mouse neural progenitors. *Cell*, *136*(5), 913–925. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.024

Sebastianutto, I., Cenci, M. A., & Fieblinger, T. (2017). Alterations of striatal indirect pathway neurons precede motor deficits in two mouse models of Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*, *105*, 117–131. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.05.011

Sekine, K., Kubo, K., & Nakajima, K. (2014). How does Reelin control neuronal migration and layer formation in the developing mammalian neocortex? *Neuroscience Research*, *86*, 50–58. https://doi.org/10.1016/j.neures.2014.06.004

Seong, I. S., Woda, J. M., Song, J.-J., Lloret, A., Abeyrathne, P. D., Woo, C. J., … MacDonald, M. E. (2010). Huntingtin facilitates polycomb repressive complex 2. *Human Molecular Genetics*, *19*(4), 573–583. https://doi.org/10.1093/hmg/ddp524

Seuntjens, E., Nityanandam, A., Miquelajauregui, A., Debruyn, J., Stryjewska, A., Goebbels, S., … Tarabykin, V. (2009). Sip1 regulates sequential fate decisions by feedback signaling from postmitotic neurons to progenitors. *Nature Neuroscience*, *12*(11), 1373–1380. https://doi.org/10.1038/nn.2409

Shikanai, M., Nakajima, K., & Kawauchi, T. (2011). N-cadherin regulates radial glial fiber-dependent migration of cortical locomoting neurons. *Communicative & Integrative Biology*, *4*(3), 326–330. https://doi.org/10.4161/cib.4.3.14886

Shikata, Y., Okada, T., Hashimoto, M., Ellis, T., Matsumaru, D., Shiroishi, T., … Motoyama, J. (2011). Ptch1-mediated dosage-dependent action of Shh signaling regulates neural progenitor development at late gestational stages. *Developmental Biology*, *349*(2), 147–159. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.10.014

Shimojo, H., Ohtsuka, T., & Kageyama, R. (2011). Dynamic expression of notch signaling genes in neural stem/progenitor cells. *Frontiers in Neuroscience*, *5*, 78. https://doi.org/10.3389/fnins.2011.00078

Shimojo, M. (2008). Huntingtin regulates RE1-silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor (REST/NRSF) nuclear trafficking indirectly through a complex with REST/NRSF-interacting LIM domain protein (RILP) and dynactin p150 Glued. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(50), 34880–34886. https://doi.org/10.1074/jbc.M804183200

Shimojo, M., Courchet, J., Pieraut, S., Torabi-Rander, N., Sando, R. 3rd, Polleux, F., & Maximov, A. (2015). SNAREs Controlling Vesicular Release of BDNF and Development of Callosal Axons. *Cell Reports*, *11*(7), 1054–1066. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.032

Shirasaki, D. I., Greiner, E. R., Al-Ramahi, I., Gray, M., Boontheung, P., Geschwind, D. H., … Yang, X. W. (2012). Network organization of the huntingtin proteomic interactome in mammalian brain. *Neuron*, *75*(1), 41–57. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.05.024

Shirendeb, U. P., Calkins, M. J., Manczak, M., Anekonda, V., Dufour, B., McBride, J. L., … Reddy, P. H. (2012). Mutant huntingtin's interaction with mitochondrial protein Drp1 impairs mitochondrial biogenesis and causes defective axonal transport and synaptic degeneration in Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, *21*(2), 406–420. https://doi.org/10.1093/hmg/ddr475

Shitamukai, A., Konno, D., & Matsuzaki, F. (2011). Oblique radial glial divisions in the developing mouse neocortex induce self-renewing progenitors outside the germinal zone that resemble primate outer subventricular zone progenitors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *31*(10), 3683–3695. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4773-10.2011

Shu, T., Ayala, R., Nguyen, M.-D., Xie, Z., Gleeson, J. G., & Tsai, L.-H. (2004). Ndel1 operates in a common pathway with LIS1 and cytoplasmic dynein to regulate cortical neuronal positioning. *Neuron*, *44*(2), 263–277. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.030

Siegenthaler, J. A., Ashique, A. M., Zarbalis, K., Patterson, K. P., Hecht, J. H., Kane, M. A., … Pleasure, S. J. (2009). Retinoic acid from the meninges regulates cortical neuron generation. *Cell*, *139*(3), 597–609. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.004

Sieradzan, K. A., & Mann, D. M. (2001). The selective vulnerability of nerve cells in Huntington's disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *27*(1), 1–21.

Sinadinos, C., Burbidge-King, T., Soh, D., Thompson, L. M., Marsh, J. L., Wyttenbach, A., & Mudher, A. K. (2009). Live axonal transport disruption by mutant huntingtin fragments in Drosophila motor neuron axons. *Neurobiology of Disease*, *34*(2), 389–395. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.02.012

Slow, E. J., van Raamsdonk, J., Rogers, D., Coleman, S. H., Graham, R. K., Deng, Y., … Hayden, M. R. (2003). Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. *Human Molecular Genetics*, *12*(13), 1555–1567.

Smith, G. A., Rocha, E. M., McLean, J. R., Hayes, M. A., Izen, S. C., Isacson, O., & Hallett, P. J. (2014). Progressive axonal transport and synaptic protein changes correlate with behavioral and neuropathological abnormalities in the heterozygous Q175 KI mouse model of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*, *23*(17), 4510–4527. https://doi.org/10.1093/hmg/ddu166

Solecki, D. J., Trivedi, N., Govek, E.-E., Kerekes, R. A., Gleason, S. S., & Hatten, M. E. (2009). Myosin II motors and F-actin dynamics drive the coordinated movement of the centrosome and soma during CNS glial-guided neuronal migration. *Neuron*, *63*(1), 63–80. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.05.028

Song, C., Zhang, Y., Parsons, C. G., & Liu, Y. F. (2003). Expression of polyglutamine-expanded huntingtin induces tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(35), 33364–33369. https://doi.org/10.1074/jbc.M304240200

Song, W., Chen, J., Petrilli, A., Liot, G., Klinglmayr, E., Zhou, Y., … Bossy-Wetzel, E. (2011). Mutant huntingtin binds the mitochondrial fission GTPase dynamin-related protein-1 and increases its enzymatic activity. *Nature Medicine*, *17*(3), 377–382. https://doi.org/10.1038/nm.2313

Spires, T. L., Grote, H. E., Varshney, N. K., Cordery, P. M., van Dellen, A., Blakemore, C., & Hannan, A. J. (2004). Environmental enrichment rescues protein deficits in a mouse model of Huntington's disease, indicating a possible disease mechanism. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *24*(9), 2270–2276. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1658-03.2004

Steffan, J. S., Agrawal, N., Pallos, J., Rockabrand, E., Lloyd, C., Slepko, N., … Pandoui, P. P. (2004). SUMO Modification of Huntingtin and Huntington ' S Disease Pathology Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : http://www.jstor.org/stable/3836620 JSTOR is a not-for-profit service that helps scholars , researchers ,. *Science*, *304*(5667), 100–104. https://doi.org/10.1017/S0020818312000033

Steffan, J. S., Bodai, L., Pallos, J., Poelman, M., McCampbell, A., Apostol, B. L., … Thompson, L. M. (2001). Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in Drosophila. *Nature*, *413*(6857), 739–743. https://doi.org/10.1038/35099568

Steffan, J. S., Kazantsev, A., Spasic-Boskovic, O., Greenwald, M., Zhu, Y. Z., Gohler, H., … Thompson, L. M. (2000). The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(12), 6763–6768. https://doi.org/10.1073/pnas.100110097

Stoeckli, E. T. (2018). Understanding axon guidance: are we nearly there yet? *Development (Cambridge, England)*, *145*(10). https://doi.org/10.1242/dev.151415

Stoykova, A., Gotz, M., Gruss, P., & Price, J. (1997). Pax6-dependent regulation of adhesive patterning, R-cadherin expression and boundary formation in developing forebrain. *Development (Cambridge, England)*, *124*(19), 3765–3777.

Subramaniam, S., Sixt, K. M., Barrow, R., & Snyder, S. H. (2009). Rhes, a striatal specific protein, mediates mutant-huntingtin cytotoxicity. *Science (New York, N.Y.)*, *324*(5932), 1327–1330. https://doi.org/10.1126/science.1172871

Sugars, K. L., & Rubinsztein, D. C. (2003). Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends in Genetics : TIG*, *19*(5), 233–238. https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00074-X

Sun, Y., Savanenin, A., Reddy, P. H., & Liu, Y. F. (2001). Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(27), 24713–24718. https://doi.org/10.1074/jbc.M103501200

Switonska, K., Szlachcic, W. J., Handschuh, L., Wojciechowski, P., Marczak, L., Stelmaszczuk, M., … Figiel, M. (2018). Identification of Altered Developmental Pathways in Human Juvenile HD iPSC With 71Q and 109Q Using Transcriptome Profiling. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*, 528. https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00528

Szlachcic, W. J., Switonski, P. M., Krzyzosiak, W. J., Figlerowicz, M., & Figiel, M. (2015). Huntington disease iPSCs show early molecular changes in intracellular signaling, the expression of oxidative stress proteins and the p53 pathway. *Disease Models & Mechanisms*, *8*(9), 1047–1057. https://doi.org/10.1242/dmm.019406

Tamai, H., Shinohara, H., Miyata, T., Saito, K., Nishizawa, Y., Nomura, T., & Osumi, N. (2007). Pax6 transcription factor is required for the interkinetic nuclear movement of neuroepithelial cells. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, *12*(9), 983–996. https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2007.01113.x

Tan, X., & Shi, S.-H. (2013). Neocortical neurogenesis and neuronal migration. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, *2*(4), 443–459. https://doi.org/10.1002/wdev.88

Tanaka, T., Serneo, F. F., Higgins, C., Gambello, M. J., Wynshaw-Boris, A., & Gleeson, J. G. (2004). Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. *The Journal of Cell Biology*, *165*(5), 709–721. https://doi.org/10.1083/jcb.200309025

Tang, B. L. (2016). Rab, Arf, and Arl-Regulated Membrane Traffic in Cortical Neuron Migration. *Journal of Cellular Physiology*, *231*(7), 1417–1423. https://doi.org/10.1002/jcp.25261

Tartari, M., Gissi, C., Lo Sardo, V., Zuccato, C., Picardi, E., Pesole, G., & Cattaneo, E. (2008). Phylogenetic comparison of huntingtin homologues reveals the appearance of a primitive polyQ in sea urchin. *Molecular Biology and Evolution*, *25*(2), 330–338. https://doi.org/10.1093/molbev/msm258

Taschner, M., & Lorentzen, E. (2016). The Intraflagellar Transport Machinery. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(10). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028092

Taschner, M., Weber, K., Mourao, A., Vetter, M., Awasthi, M., Stiegler, M., … Lorentzen, E. (2016). Intraflagellar transport proteins 172, 80, 57, 54, 38, and 20 form a stable tubulin-binding IFT-B2 complex. *The EMBO Journal*, *35*(7), 773–790. https://doi.org/10.15252/embj.201593164

Taverna, E., Götz, M., & Huttner, W. B. (2014). *The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of the development and evolution of the neocortex. Annual review of cell and developmental biology* (Vol. 30). https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155801

Taverna, E., & Huttner, W. B. (2010). Neural progenitor nuclei IN motion. *Neuron*, *67*(6), 906–914. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.027

Tereshchenko, A., Magnotta, V., Epping, E., Mathews, K., Espe-Pfeifer, P., Martin, E., … Nopoulos, P. (2019). Brain structure in juvenile-onset Huntington disease. *Neurology*, *92*(17), e1939–e1947. https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000007355

The Huntington's Disease Collaborative Research Group. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell*, *72*(6), 971–983. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90585-E

Thion, M. S., McGuire, J. R., Sousa, C. M., Fuhrmann, L., Fitamant, J., Leboucher, S., … Humbert, S. (2015). Unraveling the Role of Huntingtin in Breast Cancer Metastasis. *Journal of the National Cancer Institute*, *107*(10). https://doi.org/10.1093/jnci/djv208

Thu, D. C. V., Oorschot, D. E., Tippett, L. J., Nana, A. L., Hogg, V. M., Synek, B. J., … Faull, R. L. M. (2010). Cell loss in the motor and cingulate cortex correlates with symptomatology in Huntington's disease. *Brain*, *133*(4), 1094–1110.

https://doi.org/10.1093/brain/awq047

Tian, G., Jaglin, X. H., Keays, D. A., Francis, F., Chelly, J., & Cowan, N. J. (2010). Disease-associated mutations in TUBA1A result in a spectrum of defects in the tubulin folding and heterodimer assembly pathway. *Human Molecular Genetics*, *19*(18), 3599–3613. https://doi.org/10.1093/hmg/ddq276

Tian, G., Kong, X.-P., Jaglin, X. H., Chelly, J., Keays, D., & Cowan, N. J. (2008). A pachygyria-causing alpha-tubulin mutation results in inefficient cycling with CCT and a deficient interaction with TBCB. *Molecular Biology of the Cell*, *19*(3), 1152–1161. https://doi.org/10.1091/mbc.e07-09-0861

Tokunaga, A., Kohyama, J., Yoshida, T., Nakao, K., Sawamoto, K., & Okano, H. (2004). Mapping spatio-temporal activation of Notch signaling during neurogenesis and gliogenesis in the developing mouse brain. *Journal of Neurochemistry*, *90*(1), 142–154. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02470.x

Tong, Y., Ha, T. J., Liu, L., Nishimoto, A., Reiner, A., & Goldowitz, D. (2011). Spatial and temporal requirements for huntingtin (Htt) in neuronal migration and survival during brain development. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *31*(41), 14794–14799. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2774-11.2011

Tozer, S., Baek, C., Fischer, E., Goiame, R., & Morin, X. (2017). Differential Routing of Mindbomb1 via Centriolar Satellites Regulates Asymmetric Divisions of Neural Progenitors. *Neuron*, *93*(3), 542–551.e4. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.042

Trushina, E., Dyer, R. B., Badger, J. D. 2nd, Ure, D., Eide, L., Tran, D. D., … McMurray, C. T. (2004). Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(18), 8195–8209. https://doi.org/10.1128/MCB.24.18.8195-8209.2004

Tsai, J.-W., Bremner, K. H., & Vallee, R. B. (2007). Dual subcellular roles for LIS1 and dynein in radial neuronal migration in live brain tissue. *Nature Neuroscience*, *10*(8), 970–979. https://doi.org/10.1038/nn1934

Twelvetrees, A. E., Yuen, E. Y., Arancibia-Carcamo, I. L., MacAskill, A. F., Rostaing, P., Lumb, M. J., … Kittler, J. T. (2010). Delivery of GABAARs to synapses is mediated by HAP1-KIF5 and disrupted by mutant huntingtin. *Neuron*, *65*(1), 53–65. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.007

Tyler, W. A., Medalla, M., Guillamon-Vivancos, T., Luebke, J. I., & Haydar, T. F. (2015). Neural precursor lineages specify distinct neocortical pyramidal neuron types. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *35*(15), 6142–6152. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0335-15.2015

Ueno, M., & Yamashita, T. (2014). Bidirectional tuning of microglia in the developing brain: from neurogenesis to neural circuit formation. *Current Opinion in Neurobiology*, *27*, 8–15. https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.02.004

Unni, D. K., Piper, M., Moldrich, R. X., Gobius, I., Liu, S., Fothergill, T., … Richards, L. J. (2012). Multiple Slits regulate the development of midline glial populations and the corpus callosum. *Developmental Biology*, *365*(1), 36–49. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.02.004

Valiente, M., Ciceri, G., Rico, B., & Marin, O. (2011). Focal adhesion kinase modulates radial glia-dependent neuronal migration through connexin-26. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *31*(32), 11678–11691. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2678-11.2011

Valor, L. M. (2014). Transcription, Epigenetics and Ameliorative Strategies in Huntington's Disease: a Genome-Wide Perspective. *Molecular Neurobiology*, *51*(1), 406–423. https://doi.org/10.1007/s12035-014-8715-8

Valor, L. M. (2015). Epigenetic-based therapies in the preclinical and clinical treatment of Huntington's disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *67*, 45–48. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.04.009

van Duijn, E., Kingma, E. M., & van der Mast, R. C. (2007). Psychopathology in Verified Huntington's Disease Gene Carriers. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, *19*(4), 441–448. https://doi.org/10.1176/jnp.2007.19.4.441

Vijayvargia, R., Epand, R., Leitner, A., Jung, T. Y., Shin, B., Jung, R., … Seong, I. S. (2016). Huntingtin's spherical solenoid structure enables polyglutamine tract-dependent modulation of its structure and function. *ELife*, *5*(MARCH2016), 1–16. https://doi.org/10.7554/eLife.11184

Virlogeux, A., Moutaux, E., Christaller, W., Genoux, A., Bruyere, J., Fino, E., … Saudou, F. (2018). Reconstituting Corticostriatal Network on-a-Chip Reveals the Contribution of the Presynaptic Compartment to Huntington's Disease. *Cell Reports*, *22*(1), 110–122. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.013

Vitali, I., Fievre, S., Telley, L., Oberst, P., Bariselli, S., Frangeul, L., … Jabaudon, D. (2018). Progenitor Hyperpolarization Regulates the Sequential Generation of Neuronal Subtypes in the Developing Neocortex. *Cell*, *174*(5), 1264–1276.e15. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.036

Vonsattel, J. P., & DiFiglia, M. (1998). Huntington disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *57*(5), 369–384. https://doi.org/10.1097/00005072-199805000-00001

Vonsattel, J. P., Myers, R. H., Stevens, T. J., Ferrante, R. J., Bird, E. D., & Richardson, E. P. (1985). Neuropathological classification of Huntington's disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *44*(6), 559–577. Retrieved from http://journals.lww.com/jneuropath/Fulltext/1985/11000/Neuropathological_Classification_of_Huntington_s.3.aspx

Waelter, S., Scherzinger, E., Hasenbank, R., Nordhoff, E., Lurz, R., Goehler, H., … Wanker, E. E. (2001). The huntingtin interacting protein HIP1 is a clathrin and alpha-adaptin-binding protein involved in receptor-mediated endocytosis. *Human Molecular Genetics*, *10*(17), 1807–1817.

Walker FO. (2007). Huntington's disease. [Lancet. 2007] - PubMed - NCBI. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60111-1

Wang, H., Ge, G., Uchida, Y., Luu, B., & Ahn, S. (2011). Gli3 is required for maintenance and fate specification of cortical progenitors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *31*(17), 6440–6448. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4892-10.2011

Wang, L., Hou, S., & Han, Y.-G. (2016). Corrigendum: Hedgehog signaling promotes basal progenitor expansion and the growth and folding of the neocortex. *Nature Neuroscience*, *19*(8), 1115. https://doi.org/10.1038/nn0816-1115b

Wang, X., Tsai, J.-W., Imai, J. H., Lian, W.-N., Vallee, R. B., & Shi, S.-H. (2009). Asymmetric centrosome inheritance maintains neural progenitors in the neocortex. *Nature*, *461*(7266), 947–955. https://doi.org/10.1038/nature08435

Warby, S. C., Visscher, H., Collins, J. A., Doty, C. N., Carter, C., Butland, S. L., … Hayden, M. R. (2011). HTT haplotypes contribute to differences in Huntington disease

prevalence between Europe and East Asia. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, *19*(5), 561–566. https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.229

Watanabe, Y., Kawaue, T., & Miyata, T. (2018). Differentiating cells mechanically limit the interkinetic nuclear migration of progenitor cells to secure apical cytogenesis. *Development (Cambridge, England)*, *145*(14). https://doi.org/10.1242/dev.162883

Wexler, N. S., Lorimer, J., Porter, J., Gomez, F., Moskowitz, C., Shackell, E., … U.S.-Venezuela Collaborative Research Project. (2004). Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(10), 3498–3503. https://doi.org/10.1073/pnas.0308679101

Whipple, R. A., Matrone, M. A., Cho, E. H., Balzer, E. M., Vitolo, M. I., Yoon, J. R., … Martin, S. S. (2010). Epithelial-to-mesenchymal transition promotes tubulin detyrosination and microtentacles that enhance endothelial engagement. *Cancer Research*, *70*(20), 8127–8137. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4613

White, J. A. 2nd, Anderson, E., Zimmerman, K., Zheng, K. H., Rouhani, R., & Gunawardena, S. (2015). Huntingtin differentially regulates the axonal transport of a sub-set of Rab-containing vesicles in vivo. *Human Molecular Genetics*, *24*(25), 7182–7195. https://doi.org/10.1093/hmg/ddv415

White, J. K., Auerbach, W., Duyao, M. P., Vonsattel, J. P., Gusella, J. F., Joyner, A. L., & MacDonald, M. E. (1997). Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion. *Nature Genetics*, *17*(4), 404–410. https://doi.org/10.1038/ng1297-404

Wilsch-Brauninger, M., Peters, J., Paridaen, J. T. M. L., & Huttner, W. B. (2012). Basolateral rather than apical primary cilia on neuroepithelial cells committed to delamination. *Development (Cambridge, England)*, *139*(1), 95–105. https://doi.org/10.1242/dev.069294

Woda, J. M., Calzonetti, T., Hilditch-Maguire, P., Duyao, M. P., Conlon, R. A., & MacDonald, M. E. (2005). Inactivation of the Huntington's disease gene (Hdh) impairs anterior streak formation and early patterning of the mouse embryo. *BMC Developmental Biology*, *5*, 17. https://doi.org/10.1186/1471-213X-5-17

Wolf, R. C., Sambataro, F., Vasic, N., Baldas, E. M., Ratheiser, I., Bernhard Landwehrmeyer, G., … Orth, M. (2014). Visual system integrity and cognition in early Huntington's disease. *European Journal of Neuroscience*, *40*(2), 2417–2426. https://doi.org/10.1111/ejn.12575

Wong, Y. C., & Holzbaur, E. L. F. (2014). The regulation of autophagosome dynamics by huntingtin and HAP1 is disrupted by expression of mutant huntingtin, leading to defective cargo degradation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *34*(4), 1293–1305. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1870-13.2014

Woodhead, G. J., Mutch, C. A., Olson, E. C., & Chenn, A. (2006). Cell-autonomous beta-catenin signaling regulates cortical precursor proliferation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *26*(48), 12620–12630. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3180-06.2006

Wrobel, C. N., Mutch, C. A., Swaminathan, S., Taketo, M. M., & Chenn, A. (2007). Persistent expression of stabilized beta-catenin delays maturation of radial glial cells into intermediate progenitors. *Developmental Biology*, *309*(2), 285–297. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.07.013

Xie, J., Li, X., Zhang, W., Chai, X., Huang, Y., Li, K., … Zhao, S. (2017). Aberrant expression of LIMK1 impairs neuronal migration during neocortex development. *Histochemistry and Cell Biology*, *147*(4), 471–479. https://doi.org/10.1007/s00418-016-1514-8

Xie, Z., Sanada, K., Samuels, B. A., Shih, H., & Tsai, L. H. (2003). Serine 732 phosphorylation of FAK by Cdk5 is important for microtubule organization, nuclear movement, and neuronal migration. *Cell*, *114*(4), 469–482.

Yabut, O. R., Fernandez, G., Huynh, T., Yoon, K., & Pleasure, S. J. (2015). Suppressor of Fused Is Critical for Maintenance of Neuronal Progenitor Identity during Corticogenesis. *Cell Reports*, *12*(12), 2021–2034. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.031

Yabut, O. R., & Pleasure, S. J. (2018). Sonic Hedgehog Signaling Rises to the Surface: Emerging Roles in Neocortical Development. *Brain Plasticity (Amsterdam, Netherlands)*, *3*(2), 119–128. https://doi.org/10.3233/BPL-180064

Yamada, M., Toba, S., Takitoh, T., Yoshida, Y., Mori, D., Nakamura, T., … Hirotsune, S. (2010). mNUDC is required for plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein and dynactins by kinesin-1. *The EMBO Journal*, *29*(3), 517–531. https://doi.org/10.1038/emboj.2009.378

Yamanaka, T., Tosaki, A., Miyazaki, H., Kurosawa, M., Furukawa, Y., Yamada, M., & Nukina, N. (2010). Mutant huntingtin fragment selectively suppresses Brn-2 POU domain transcription factor to mediate hypothalamic cell dysfunction. *Human Molecular Genetics*, *19*(11), 2099–2112. https://doi.org/10.1093/hmg/ddq087

Yan, S., Tu, Z., Liu, Z., Fan, N., Yang, H., Yang, S., … Li, X.-J. (2018). A Huntingtin Knockin Pig Model Recapitulates Features of Selective Neurodegeneration in Huntington's Disease. *Cell*, *173*(4), 989–1002.e13. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.005

Yanai, A., Huang, K., Kang, R., Singaraja, R. R., Arstikaitis, P., Gan, L., … Hayden, M. R. (2006). Palmitoylation of huntingtin by HIP14 is essential for its trafficking and function. *Nature Neuroscience*, *9*(6), 824–831. https://doi.org/10.1038/nn1702

Yang, T., Sun, Y., Zhang, F., Zhu, Y., Shi, L., Li, H., & Xu, Z. (2012). POSH localizes activated Rac1 to control the formation of cytoplasmic dilation of the leading process and neuronal migration. *Cell Reports*, *2*(3), 640–651. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.007

Yano, H., Baranov, S. V, Baranova, O. V, Kim, J., Pan, Y., Yablonska, S., … Friedlander, R. M. (2014). Inhibition of mitochondrial protein import by mutant huntingtin. *Nature Neuroscience*, *17*(6), 822–831. https://doi.org/10.1038/nn.3721

Yao, B., Christian, K. M., He, C., Jin, P., Ming, G.-L., & Song, H. (2016). Epigenetic mechanisms in neurogenesis. *Nature Reviews. Neuroscience*, *17*(9), 537–549. https://doi.org/10.1038/nrn.2016.70

Yingling, J., Youn, Y. H., Darling, D., Toyo-Oka, K., Pramparo, T., Hirotsune, S., & Wynshaw-Boris, A. (2008). Neuroepithelial stem cell proliferation requires LIS1 for precise spindle orientation and symmetric division. *Cell*, *132*(3), 474–486. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.026

Yoon, K.-J., Koo, B.-K., Im, S.-K., Jeong, H.-W., Ghim, J., Kwon, M.-C., … Kong, Y.-Y. (2008). Mind bomb 1-expressing intermediate progenitors generate notch signaling to maintain radial glial cells. *Neuron*, *58*(4), 519–531. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.03.018

Youn, Y. H., & Han, Y.-G. (2018). Primary Cilia in Brain Development and Diseases. *The American Journal of Pathology*, *188*(1), 11–22. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.08.031

Ypsilanti, A. R., & Rubenstein, J. L. R. (2016). Transcriptional and epigenetic mechanisms of early cortical development: An examination of how Pax6 coordinates cortical development. *The Journal of Comparative Neurology*, *524*(3), 609–629. https://doi.org/10.1002/cne.23866

Yu, C., Li, C. H., Chen, S., Yoo, H., Qin, X., & Park, H. (2018). Decreased BDNF Release in Cortical Neurons of a Knock-in Mouse Model of Huntington's Disease. *Scientific Reports*, *8*(1), 16976. https://doi.org/10.1038/s41598-018-34883-w

Zala, D., Colin, E., Rangone, H., Liot, G., Humbert, S., & Saudou, F. (2008a). Phosphorylation of mutant huntingtin at S421 restores anterograde and retrograde transport in neurons. *Human Molecular Genetics*, *17*(24), 3837–3846. https://doi.org/10.1093/hmg/ddn281

Zala, D., Colin, E., Rangone, H., Liot, G., Humbert, S., & Saudou, F. (2008b). Phosphorylation of mutant huntingtin at S421 restores anterograde and retrograde transport in neurons. *Human Molecular Genetics*, *17*(24), 3837–3846. https://doi.org/10.1093/hmg/ddn281

Zala, D., Hinckelmann, M. V., Yu, H., Lyra Da Cunha, M. M., Liot, G., Cordelières, F. P., … Saudou, F. (2013). Vesicular glycolysis provides on-board energy for fast axonal transport. *Cell*, *152*(3), 479–491. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.029

Zeitlin, S., Liu, J. P., Chapman, D. L., Papaioannou, V. E., & Efstratiadis, A. (1995). Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nature Genetics*, *11*(2), 155–163. https://doi.org/10.1038/ng1095-155

Zhang, J., Woodhead, G. J., Swaminathan, S. K., Noles, S. R., McQuinn, E. R., Pisarek, A. J., … Chenn, A. (2010). Cortical neural precursors inhibit their own differentiation via N-cadherin maintenance of beta-catenin signaling. *Developmental Cell*, *18*(3), 472–479. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.12.025

Zhang, X., Lei, K., Yuan, X., Wu, X., Zhuang, Y., Xu, T., … 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*(2), 173–187. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.08.018

Zhang, Y., Leavitt, B. R., van Raamsdonk, J. M., Dragatsis, I., Goldowitz, D., MacDonald, M. E., … Friedlander, R. M. (2006). Huntingtin inhibits caspase-3 activation. *The EMBO Journal*, *25*(24), 5896–5906. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601445

Zhao, Y., Zhu, M., Yu, Y., Qiu, L., Zhang, Y., He, L., & Zhang, J. (2017). Brain REST/NRSF Is Not Only a Silent Repressor but Also an Active Protector. *Molecular Neurobiology*, *54*(1), 541–550. https://doi.org/10.1007/s12035-015-9658-4

Zheng, S., Clabough, E. B. D., Sarkar, S., Futter, M., Rubinsztein, D. C., & Zeitlin, S. O. (2010). Deletion of the huntingtin polyglutamine stretch enhances neuronal autophagy and longevity in mice. *PLoS Genetics*, *6*(2), e1000838. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000838

Zheng, Y., Wildonger, J., Ye, B., Zhang, Y., Kita, A., Younger, S. H., … Jan, Y. N. (2008). Dynein is required for polarized dendritic transport and uniform microtubule orientation in axons. *Nature Cell Biology*, *10*(10), 1172–1180. https://doi.org/10.1038/ncb1777

Zuccato, C., Belyaev, N., Conforti, P., Ooi, L., Tartari, M., Papadimou, E., … Cattaneo, E. (2007). Widespread disruption of repressor element-1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencer factor occupancy at its target genes in Huntington's disease. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for*

Neuroscience, *27*(26), 6972–6983. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4278-06.2007

Zuccato, C., & Cattaneo, E. (2007). Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Progress in Neurobiology*, *81*(5–6), 294–330. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.01.003

Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti, D., Leavitt, B. R., Goffredo, D., Conti, L., … Cattaneo, E. (2001). Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science (New York, N.Y.)*, *293*(5529), 493–498. https://doi.org/10.1126/science.1059581

Zuccato, C., Tartari, M., Crotti, A., Goffredo, D., Valenza, M., Conti, L., … Cattaneo, E. (2003). Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nature Genetics*, *35*(1), 76–83. https://doi.org/10.1038/ng1219

Zuccato, C., Valenza, M., & Cattaneo, E. (2010). Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease. *Physiological Reviews*, *90*(3), 905–981. https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2009

HUNTINGTINE ET DEVELOPPEMENT CORTICAL

Mots clés : **[Neurogenèse, Huntingtine, Cortex cérébral, zQ175]**

La maladie de Huntington (MH) est un trouble neurologique transmis selon un mode autosomique dominant qui conduit à l'apparition de symptômes moteurs, psychiatriques et cognitifs chez l'adulte. La MH est caractérisée par une neurodégénérescence massive des neurones striataux et corticaux. La MH est causée par une mutation de la séquence codante de la protéine Huntingtine (HTT) conduisant à la production d'une protéine mutée (mHTT). La mHTT gagne de nouvelles fonctions toxiques mais perd aussi certaines fonctions normales. L'étude de ces deux aspects (à la fois gain et perte de fonction) est donc indispensable à la compréhension du processus pathologique de la MH.

La HTT et mHTT participent au développement des structures cérébrales. Notre hypothèse est donc que les défauts développementaux induits par la mHTT contribuent à la progression physiopathologique de la MH. Notre équipe s'intéresse tout particulièrement au développement du cortex cérébral, largement atteint dans la MH. Nos précédentes études ont démontré le rôle de la HTT et l'effet de sa mutation dans la prolifération des précurseurs neuronaux du cortex cérébral. Cependant, les fonctions de la HTT et de la mHTT lors des étapes plus avancées du développement cortical, restent à ce jour inconnues.

Mon projet de thèse se décompose en deux axes principaux : (i) l'étude des fonctions de la HTT dans les neurones nouvellement produits dans le cortex en développement, notamment au cours de leur migration et de leur maturation dendritique et (ii), la caractérisation de la neurogenèse corticale dans un modèle génétique de la MH : zQ175.

HUNTINGTIN AND CORTICAL DEVELOPMENT

Keywords : **[Neurogenesis, Huntingtin, Cerebral cortex, zQ175]**

Huntington disease (HD) is an autosomal dominant inherited neurological disorder conducting to the appearance of motors, psychiatrics and cognitives symptoms during mid-adulthood. HD is characterised by a massive neurodegenerescence of both striatal and cortical neurons. HD is caused by a mutation in coding region of the protein Huntingtin (HTT) leading to the production of a mutated form (mHTT). mHTT gain new toxic function but also loss some of normal function of HTT. Therefore, studying both gain and loss of function is mandatory to better understand the physiopathological progression of HD.

HTT and mHTT both contribute to development of cerebral structures. Our hypothesis is that developmental defects induced by mHTT could contribute at least in part to the physiological progression of HD. Our work focuses on cerebral cortex development a structure which is largely impacted in HD. Our previous studies demonstrated roles of HTT and the effect of mHTT in neuronal precursor proliferation during neurogenesis. However, roles and functions of HTT and mHTT during later step of cortical neurogenesis remain elusive.

My PhD project has focused on two main aspects: (i) study the function of HTT in newborn post-mitotic neurons in cerebral cortex, notably during their migration and maturation, and (ii), characterising cortical neurogenesis in genetically integrated mouse model of HD: zQ175.