

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

THÈSE présentée par :
Hélène JAGLINE

soutenue le : 07 novembre 2017

afin d'obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**
Spécialité : Aspect moléculaire et cellulaire de la biologie

Compréhension des mécanismes
physiopathologiques des hétérotopies
nodulaires périventriculaires associées à des
mutations dans le gène *NEDD4L*

THÈSE dirigée par :
M. CHELLY Jamel

PU-PH, IGBMC, Illkirch-Graffenstaden

RAPPORTEURS :
Mme THAUVIN-ROBINET Christel
M. CARDOSO Carlos

PU-PH, CHU de Dijon
PU, INMED, Marseille

EXAMINATEUR :
M. LELIEVRE Vincent

PU, INCI, Strasbourg

INVITÉ
M. DEVYS Didier

MCU-PH, IGBMC, Illkirch-Graffenstaden

*« Celui qui trouve sans chercher
est celui qui a longtemps cherché sans trouver. »*

Gaston Bachelard

REMERCIEMENTS

En ce début de manuscrit, je souhaite adresser mes remerciements aux membres du jury, Christel Thauvin-Robinet et Carlos Cardoso ainsi que Didier Devys et Vincent Lelièvre qui ont accepté d'être respectivement rapporteurs et examinateurs de cette thèse.

Je remercie aussi Jamel de m'avoir confié ce projet ainsi que d'avoir supervisé cette thèse. Merci d'avoir été disponible et d'avoir pris le temps de corriger ce manuscrit.

Bien évidemment je remercie tous les membres du labo qui ont participé au projet NEDD4L, ça a été difficile, les expériences n'ont pas toujours (souvent ?) fonctionnées, nos résultats étaient quelquefois hasardeux mais ils ont permis de faire avancer le schmilblick (regarde les vidéos de Coluche Vicky, tu comprendras peut-être :)). Je remercie donc Loïc (Briox ^^) qui a beaucoup fait avancer ce projet, Vicky qui a supervisé le travail avec Jamel et qui a mis de côté nos idées "débiles" :D, Nath (aka La machine de guerre de l'équipe) qui est la déesse des clonages, Ekaterina qui a aussi mis de côté son projet pour nous aider pendant le rush, Peggy qui a fait des tonnes d'électroporation et Tristan qui faisait des trucs qu'on comprenait pas mais tant pis ^^ . Donc merci à la team Chelly !

Merci aussi à l'équipe Mandel qui a fusionné avec nous et qui apporte un peu de renouveau entre les murs de l'ICS, merci Angélique, Amélie, Fransceca, Timothée, Karima, Florent, Eric, Jérémie, Andréa, Hervé et Jean-Louis.

Alors bien sûr je remercie toutes les personnes qui ont participé au projet mais je les remercie aussi pour tout ce qu'elles ont pu apporter au labo (et je ne parle pas que des gâteaux, pour ça je ne vous remercie pas, j'ai pris au moins 5kg pendant cette thèse !!!).

Vicky, je te remercie pour tout, ta bonne humeur, ton expertise Western Blotique, ton style, t'es rock'n roll Vicks ! Merci d'avoir eu ton bébé pendant ma thèse, ça m'a permis de reporter mon manque de neveux et nièce sur ton Tiger-Roberto <3. Merci aussi pour tes incompréhensions linguistiques et notamment ton rôle de hamster ^^.

Un grand merci aussi à Gabi, merci de m'avoir aidée dans la rédaction de notre revue, merci d'avoir corrigé cette thèse et merci pour ta gentillesse et ta disponibilité, sans toi ce manuscrit serait totalement différent et mon moral aussi ! Merci aussi à toi et à Maïté pour l'impression de cette thèse.

Je remercie tous mes collègues (Comme dit : « On n'est pas que collègues hein, on est amis aussi ! ») pour nos petites soirées, notre séjour à Lyon, vos blagues, vos preuves d'amour (^_^), nos repas du midi, nos attaques de machine. Alors merci Loïc, Vicky, Johan (aka Stagiaire), Tristan, Solveig, Tim, Nathalie et Peggy et puis aussi tous les stagiaires qui sont passés au labo Chelly !

Et puis il y a les copines, la Duchesse Chachatte, qui n'a de duchesse que le nom, car elle perd un peu de son prestige au Molodoï :b. Merci Charline d'avoir participé à ma vie sociale à Strasbourg, merci pour nos sorties qui remontent le moral quand ça va pas et surtout courage pour la suite, ne lâche rien et crois en toi, tu n'es pas arrivée là par hasard ! Merci aussi à Justine (du steack, du steack, du steack !) et Karima (wesh wesh !) pour tout ce que vous m'avez apporté, ma vie aurait été bien morne sans vous, les sorties et les blagues !

Cette thèse je ne l'aurai pas fait sans Yoann, alors un grand merci à toi, je n'ai passé que 5 mois à Cochin avec toi et Karine, mais au final ces 5 mois ont eu un réel impact sur ma vie, alors merci à vous deux ! Et puis aussi merci à Xavier que je n'ai jamais rencontré mais c'est un peu grâce à lui si j'en suis arrivée là !

Un grand, énorme merci à mes amis qui se reconnaîtront (je ne les cite pas je risquerais d'en oublier !) et que j'ai rencontré au lycée, à l'IUT, puis à la fac, vous avez su me changer les idées pendant ces 3 ans, on a voyagé ensemble, on s'est amusé, et vous ne m'avez pas lâché même si je ne revenais pas vous voir souvent <3.

Et pour finir un grand merci à ma famille, mes sœurs d'abord, Emilie et Marina et bien sûr leur famille (Augustin, Eloïse et Julian vous êtes mes rayons de soleil), si vous saviez tout le bien que ça m'a fait de vous voir pendant ces 3 ans... Et puis mes parents qui ne savent pas vraiment ce que je fais et qui pensent que je sers de cobaye pour étudier le retard mental ! Merci Maman et Papa de m'avoir soutenu dans tout ce que j'entreprenais, courage ce n'est pas encore fini, vous n'êtes pas encore débarrassés de moi!

ABBREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique
ARN : Acide Ribo Nucléique
CGR : Cellule Gliale Radiaire
CNE : Cellule NeuroEpithéliale
CNV : Copy Number Variation
DCF : Dysplasie Corticale Focale
DI : Déficience Intellectuelle
DILX : Déficience Intellectuelle liée à l'X
DLT : Dépression à Long Terme
DUB : Déubiquitinase
HECT : Homologous to the E6-AP Carboxyl
HNP : Hétérotopie Nodulaire Périventriculaire
KI : Knock-In
KO : Knock-Out
LGE : Lateral Ganglion Eminence
MDC : Malformation du Développement Cortical
MGE : Medial Ganglion Eminence
NGS : Next Generation Sequencing
PB : Progéniteur Basal
PC : Plaque Corticale
PLT : Potentialisation à Long Terme
RING : Really Interesting Gene
SNC : Système Nerveux Central
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
ULM : Ubiquitin-Like protein Modifier
UPS : Ubiquitin-Proteasome System
ZI : Zone Intermédiaire
ZM : Zone Marginale
ZSV : Zone Sous-Ventriculaire
ZV : Zone Ventriculaire

SOMMAIRE

Introduction	1
1. Le développement cortical	2
1.1. Généralités.....	2
1.2. La neurogenèse.....	4
1.2.1 Mécanismes de régulation dans la neurogenèse	7
1.2.1.1 Plan de clivage mitotique	7
1.2.1.2 Cil primaire et neurogenèse	8
1.2.1.3 Contrôle du cycle cellulaire	9
1.2.1.4 Voies de signalisation impliquées dans la neurogenèse	9
1.2.1.4.1 Notch.....	9
1.2.1.4.2 Wnt/ β -caténine	10
1.2.1.4.3 Bone Morphogenetic Protein (BMP).....	11
1.3. La migration neuronale.....	12
1.3.1 Généralités.....	12
1.3.2 Rôle de LIS1/NDEL1/dynéine dans la régulation de la migration neuronale.....	14
1.3.3 Rôle de la voie Reelin dans la migration neuronale.....	15
1.4. Neuritogenèse	17
1.4.1 Axonogenèse.....	19
1.4.2 Dendritogenèse.....	21
1.5. Synaptogenèse.....	22
2. Ubiquitination	24
2.1. Généralités.....	24
2.2. L'ubiquitine	25
2.3. Les enzymes d'activation : E1	27
2.4. Les enzymes de conjugaison : E2.....	27

2.5.	Les ubiquitine ligase : E3.....	28
2.5.1	Les E3 Really Interesting New Gene (RING) et U-box	29
2.5.2	Les E3 Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus (HECT)	29
2.5.3	Les N-Recognins	30
2.6.	Les E4	30
2.7.	Les déubiquitinases (DUB).....	31
2.8.	Devenir des protéines ubiquitinées.....	33
2.9.	Protéasome.....	35
3.	Régulation du développement cortical par l'ubiquitination	36
3.1.	Régulation de la neurogenèse par l'ubiquitination	36
3.1.1	Signalisation Notch et ubiquitination	36
3.1.1.1	Ubiquitination du récepteur NOTCH inactivé.....	38
3.1.1.1.1	ITCH et (NEDD4-1	38
3.1.1.1.2	DX et (SU(DX)	38
3.1.1.1.3	USP12	39
3.1.1.2	Ubiquitination du récepteur Notch activé	39
3.1.1.2.1	FBW7	39
3.1.1.2.2	C-CBL	40
3.1.1.2.3	EIF3F	40
3.1.1.3	Ubiquitination des ligands DSL.....	40
3.1.1.3.1	NEUR1	41
3.1.1.3.2	MIB1	41
3.1.1.4	Ubiquitination des facteurs de transcription	42
3.1.1.4.1	TRIM11	42
3.1.1.4.2	BTBD6.....	42
3.1.1.4.3	HUWE1	43
3.1.1.4.4	TRIM32	43
3.1.1.5	Ubiquitination de régulateurs de la voie Notch	44

3.1.1.5.1	MDM2	44
3.1.2	Bone Morphogenetic Protein (BMP)	44
3.1.3	Modifications épigénétiques régulées par l'ubiquitination	44
3.2.	Régulation de la migration neuronale par l'ubiquitination	45
3.3.	Régulation de la neuritogenèse par l'ubiquitination.....	46
3.3.1	NEDD4-1, SMURF1 et SMURF2	47
3.3.2	APC.....	48
3.3.3	HUWE1.....	49
3.3.4	Autres E3 ubiquitine ligases impliquées dans la croissance axonale	49
3.4.	Régulation de la synaptogenèse par l'ubiquitination	50
4.	Malformations du développement cortical	51
4.1.	Phénotypes associés aux malformations du développement corticales.....	52
4.2.	Malformations liées à des anomalies de la prolifération ou de l'apoptose	53
4.2.1	Microcéphalies.....	53
4.2.2	Mégalencéphalies	54
4.2.3	Dysplasies corticales focales	54
4.3.	Malformations liées à des anomalies de la migration.....	54
4.3.1	Lissencéphalies et hétérotopies en bandes	54
4.3.2	Polymicrogyries.....	55
4.3.3	Hétérotopies	56
5.	Ubiquitination et malformations neurodéveloppementales	57
5.1.	Les E3 ubiquitine ligases à domaine RING	57
5.1.1	MID1	57
5.1.2	CUL4B.....	58
5.2.	Les N-recognins.....	60
5.2.1	UBR1	60
5.3.	Les E3 ubiquitine ligases à domaine HECT.....	61

5.3.1	UBE3A	61
5.3.2	HACE1	63
5.3.3	HUWE1.....	63
5.3.4	HERC1.....	64
5.3.5	HERC2.....	65
5.3.6	HECW2	65
5.3.7	TRIP12	65
5.3.8	UBE3B	66
5.4.	Les déubiquitinasés	66
5.4.1	STAMBP.....	66
5.4.2	USP7	67
5.4.3	USP9X.....	67
5.5.	Autres protéines impliquées dans les maladies neurodéveloppementales.....	68
5.5.1	UBE2A	68
5.5.2	PSMD12.....	69
	Résultats	73
	Discussion/Perspectives	79
1.	Un mécanisme physiopathologique original.....	80
2.	Implication de la voie mTORC1 dans la surexpression de la forme WT	86
3.	Conséquences de la surexpression des formes NEDD4L mutées sur les voies PI3K-AKT-mTOR	91
4.	Perspectives	93
	Bibliographie	95

Introduction

1. Le développement cortical

1.1. Généralités

Le cortex est constitué de milliards de neurones de différentes formes, organisés en couches et qui fonctionnent en réseau avec de 1000 à 10 000 contacts synaptiques (Lange, 1975; Shariff, 1953). Au cours du développement embryonnaire, le tube neural, mis en place à la fin de la gastrulation et de la neurulation, forme rapidement trois vésicules primitives : le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale (Figure 1). Le prosencéphale, la partie la plus rostrale du système nerveux, se divise ensuite en trois vésicules cérébrales: les deux vésicules symétriques du télencéphale (qui donneront cortex et striatum) et le diencephale (qui donnera le thalamus et l'hypothalamus). Le mésencéphale participera à la formation du futur cervelet tandis que le rhombencéphale sera divisé en métencéphale (futur pont et cervelet) et en myélocéphale (futur bulbe rachidien). Le télencéphale se subdivise en *pallium* qui donnera naissance aux différentes régions du cortex (comme l'hippocampe) et en *subpallium* qui donnera naissance aux ganglions de la base (striatum et pallidum) (Figure 2). La formation de ces différentes régions est dépendante de l'établissement de gradients morphogènes (BMP, Wnt, FGF et SHH) qui vont permettre la segmentation du tube neural selon les axes antéro-postérieur et dorso-ventral. Ces morphogènes vont également permettre d'induire la neurogenèse embryonnaire.

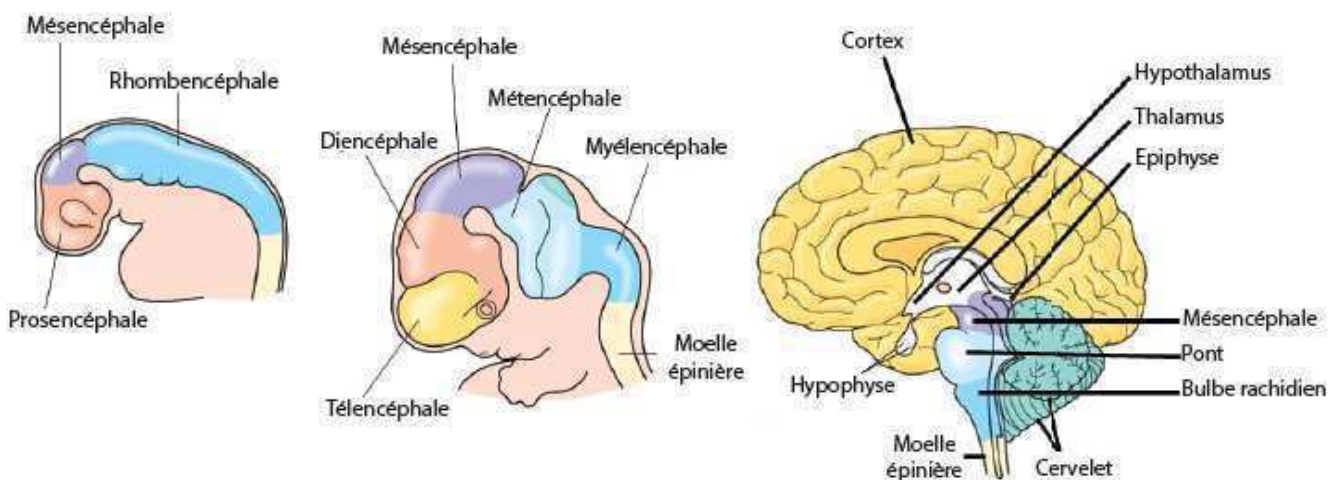


Figure 1 : Mise en place des différentes structures du cerveau humain (voir texte principal)

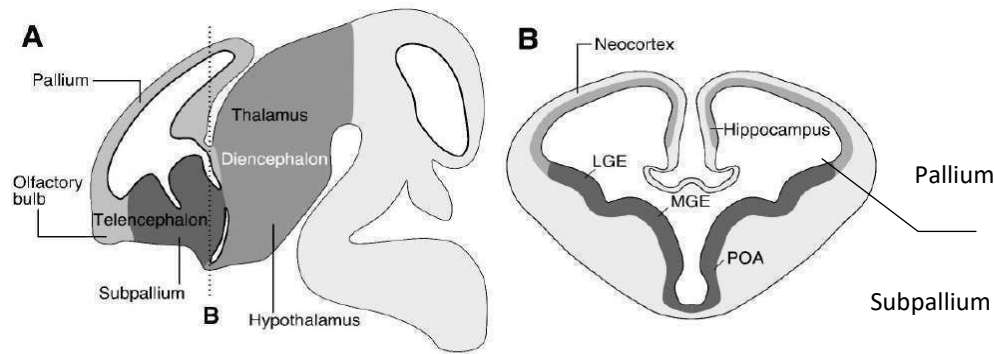


Figure 2 : Régionalisation anatomique du cerveau en développement. A- Schéma d'une coupe sagittale d'un cerveau de souris à E12,5. B- Schéma d'une coupe coronale du télencéphale caudal d'un cerveau de souris à E12,5. La coupe passe à travers le pallium et le subpallium représenté en B. LGE : Eminences Ganglionnaires Latérales, MGE : Eminences Ganglionnaires Médianes ; POA : Aire Antérieure Préoptique. D'après Marin et Müller 2014.

Le développement du cortex se déroule en quatre principales étapes que sont la neurogenèse, la migration neuronale, la neuritogenèse et enfin la synaptogenèse (Figure 3). Dans la suite de ce mémoire, les quatre étapes seront développées.

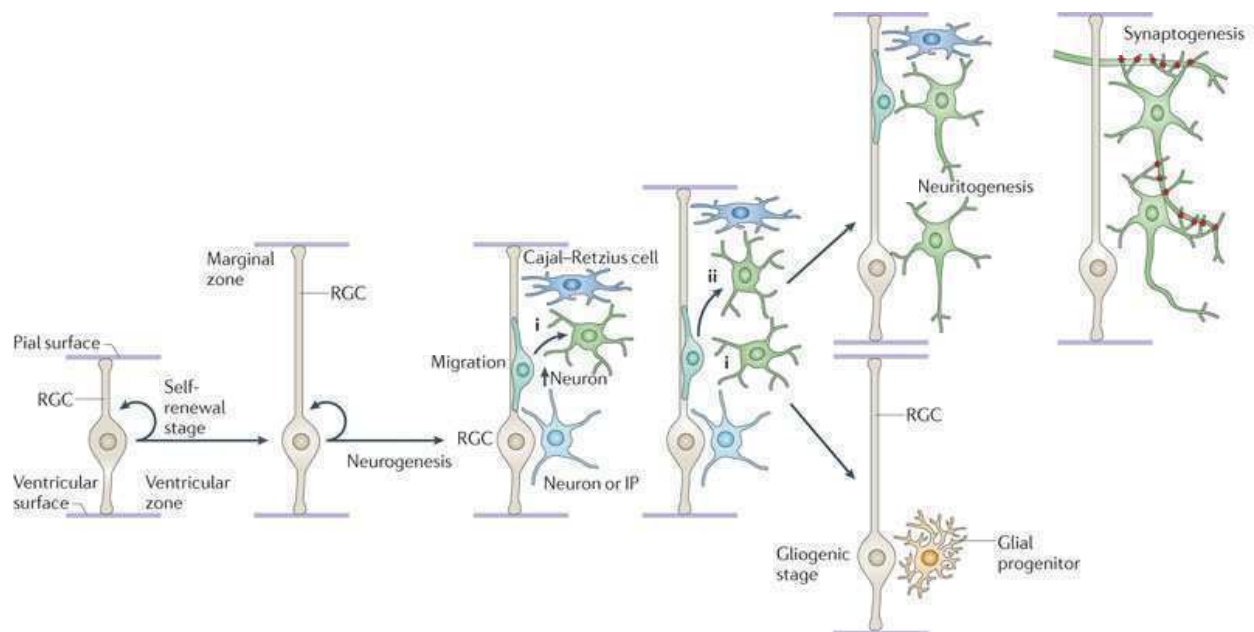


Figure 3 : Schéma récapitulatif des étapes principales du développement cortical. Après la fermeture du tube neural, les cellules neuroépithéliales prolifèrent et se différencient en cellules gliales radiales (RGC) qui vont continuer de proliférer en se divisant de façon symétrique. Elles peuvent aussi se différencier en neurones immatures ou en progéniteurs intermédiaires qui sont générés par division asymétrique. Les cellules de Cajal-Retzius générées très tôt durant la neurogenèse migrent jusqu'à la zone marginale. Les RGC continuent de générer des neurones immatures, des progéniteurs intermédiaires ou encore des cellules gliales (oligodendrocytes et astrocytes). Les nouveaux neurones vont migrer le long de la glie radiale et former une couche horizontale dans la plaque corticale. Les neurones suivants vont migrer à travers cette couche (migration « inside-out ») et vont se différencier en générant les futures dendrites et axone, c'est la neuritogenèse. A terme, les neurones vont étendre leurs neurites afin d'établir le réseau neuronal et réguler la synaptogenèse. D'après Kawabe et Brose 2011.

1.2. La neurogenèse

La fermeture du tube neural conduit à la formation d'un canal central qui est à l'origine du système ventriculaire. A partir de E9 chez la souris (4^{ème} semaine de gestation chez l'Homme), les cellules neuroépithéliales (CNE) qui forment le tube neural commencent à se diviser de manière asymétrique conduisant à un auto-renouvellement des cellules et la naissance des premiers neurones, c'est le début de la neurogenèse (Götz et Huttner, 2005). Les CNE ont une polarité apico-basale et sont ancrées à la surface ventriculaire par des jonctions serrées et adhérentes (Aaku-Saraste et al., 1997; Manabe et al., 2002; Zhadanov et al., 1999) tandis qu'elles sont ancrées à la surface piaie par des intégrines (Graus-Porta et al., 2001; Radakovits et al., 2009).

De façon concomitante à la génération de neurones, les CNE acquièrent une identité de cellules gliales radiaires. Durant cette transformation, les CNE perdent leurs propriétés épithéliales en faveur de caractéristiques gliales, elles gardent néanmoins contact avec les surfaces ventriculaire et piaie ce qui maintient leur morphologie radiale et conduit à leur nom de cellules gliales radiaires (CGR). Parmi les changements induits par la transformation, on trouve la perte des jonctions serrées au profit des jonctions adhérentes (Aaku-Saraste et al., 1997; Götz et Huttner, 2005; Kriegstein et varez-Buylla, 2009), l'acquisition de granules de stockage de glycogène (Brückner et Biesold, 1981; Gadisseux et Evrard, 1985) et l'expression de marqueurs astrogliaux comme le Glutamate-aspartate transporter (GLAST), la Brain lipid binding protein (BLBP), la Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), la Nestin, la Vimentine, RC1 ou RC2. Les CGR sont des cellules polarisées avec un cil primaire, comme les CNE elles restent en contact avec la surface du ventricule via un court processus apical mais elles disposent aussi d'un processus basal plus long qui est en contact avec la membrane piaie et qui va s'allonger au fur et à mesure de l'épaississement du cortex. Ce processus permettra aux neurones de traverser de longues distances à travers le cortex et de se localiser dans la plaque corticale. Les CNE sont les progéniteurs de la plupart des neurones du système nerveux central mais aussi des deux types de cellules macrogliales, les astrocytes et les oligodendrocytes. Les CGR vont subir deux types de division (Figure 4), des divisions symétriques entraînant une augmentation du pool de progéniteurs ou alors des divisions asymétriques qui peuvent être prolifératives, différentielles ou neurogéniques. Les divisions prolifératives mènent à la formation d'une CGR avec un progéniteur basal (PB), tandis que les divisions neurogéniques conduisent à une CGR et à un neurone (Götz et Huttner, 2005). Il

peut y avoir formation d'une CGR et d'un PB et on appelle cette division la division différentielle (Figure 5). Au niveau de la zone ventriculaire, on retrouve un autre type de population de progéniteurs, ce sont les progéniteurs intermédiaires apicaux (PIa), qui peuvent générer des neurones par neurogenèse directe, mais ils sont peu abondants dans le cerveau d'embryon de souris et leur rôle est encore à définir (Pilz et al., 2013). De même, une autre population de cellules gliales radiaires existe dans les stades plus tardifs du développement du cortex, ce sont les cellules gliales radiaires basales mais, là encore, leur rôle reste à éclaircir (Shitamukai et al., 2011).

Les progéniteurs basaux (PB) ne sont pas liés à la surface ventriculaire et vont migrer et proliférer à distance de cette surface afin de former la zone sous-ventriculaire (ZSV) (Haubensak et al., 2004; Kowalczyk et al., 2009; Noctor et al., 2004). L'absence d'attachement à la membrane basale va conduire les PB à acquérir une morphologie multipolaire (Miyata, 2004; Noctor et al., 2004). Ces progéniteurs expriment des facteurs de transcription spécifiques tels que TBR2, NGN2, CUX1, CUX2 et n'expriment pas PAX6 et GLAST. Du côté dorsal du télencéphale (qui donnera le cortex cérébral), les progéniteurs basaux vont se diviser de façon exclusivement symétrique, d'abord en générant deux autres progéniteurs basaux, puis en conduisant à la formation de deux neurones de projection (Miyata, 2004; Noctor et al., 2004). Les progéniteurs basaux génèrent la majorité des neurones du cortex dont les neurones précoces des couches profondes et les neurones nouvellement formés des couches plus superficielles (Farkas et Huttner, 2008). Dans le télencéphale ventral, les divisions des progéniteurs basaux qui donneront les ganglions basaux et les interneurons dans le cortex sont très peu caractérisées.

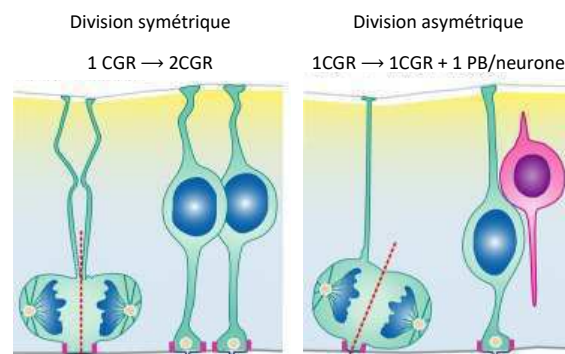


Figure 4 : Division symétrique versus asymétrique des cellules gliales radiaires (CGR). Le plan de clivage détermine le type de division. La division symétrique va permettre la prolifération du pool de progéniteurs, tandis que la division asymétrique peut être, soit proliférative (lorsqu'elle conduit à un progéniteur basal (PB), soit neurogénique (lorsqu'elle conduit à un neurone). D'après Paridaen et Huttner 2014.

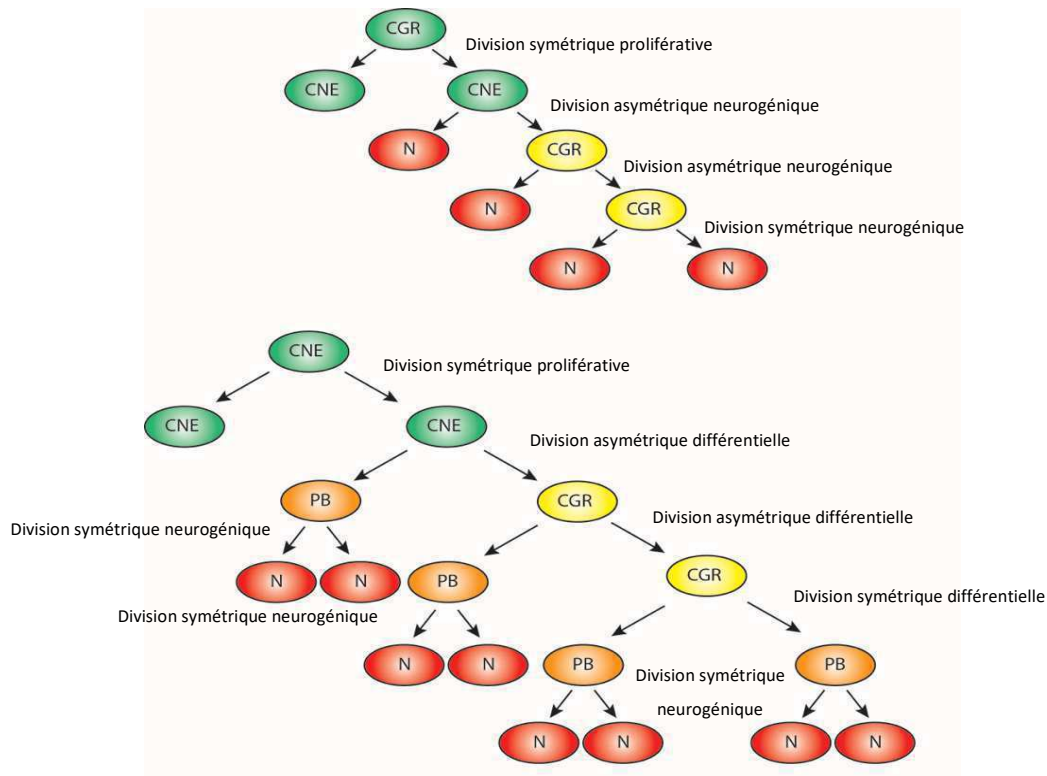


Figure 5 : Balance entre prolifération et différenciation durant la neurogenèse. Vue simplifiée des relations entre cellules neuroépithéliales (CNE), cellules gliales radiaires (CGR) et neurones (N) avec (a) ou sans (b) les progéniteurs basaux (PB) qui peuvent servir d'intermédiaires.

Il existe un autre type de progéniteurs, les progéniteurs neuronaux courts. Ils partagent des similitudes avec les CGR, en effet ils sont situés dans la zone ventriculaire, ils ont un processus apical en contact avec la surface ventriculaire et ils expriment PAX6, mais il existe aussi une similarité avec les progéniteurs basaux notamment au niveau du profil moléculaire des cellules. Leur rôle et leur origine sont encore à éclaircir.

Au fur et à mesure que la neurogenèse progresse, les progéniteurs tendent à diminuer le nombre de divisions symétriques entraînant une diminution puis un arrêt de l'expansion du pool de progéniteurs.

1.2.1 Mécanismes de régulation dans la neurogenèse

La neurogenèse est une étape finement régulée, en effet, il existe un équilibre entre la prolifération et la différenciation des progéniteurs neuronaux qui permet un développement du cerveau normal. Cet équilibre passe par une alternance entre division symétrique, qui permet d'agrandir le pool de progéniteurs, puis division asymétrique qui permet la différenciation des progéniteurs. Plusieurs facteurs interviennent dans la régulation de la neurogenèse, dont l'orientation du fuseau mitotique, la polarité apico-basale des progéniteurs neuronaux mais aussi le contrôle du cycle cellulaire.

1.2.1.1 Plan de clivage mitotique

La polarité apico-basale des CNE et des CGR est très importante lors du déterminisme du type de division. En effet, lors d'une division symétrique les composants cellulaires sont répartis de façon égale entre les deux cellules filles contrairement à la division asymétrique, où l'une des cellules va recevoir une majorité de constituants apicaux et l'autre une majorité de constituants basaux (Figure 6). Le plan de clivage est donc très important lors de la division.

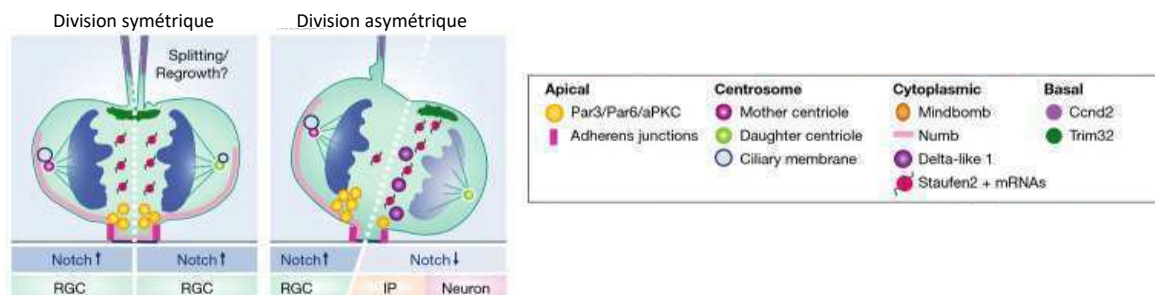


Figure 6 : La répartition des déterminants cellulaires peut être équivalente (division symétrique) ou inégales (division asymétrique) dans les cellules filles. D'après Paridaen et Huttner 2014.

Néanmoins il a été montré que les plans de clivage horizontaux (conduisant à une division asymétrique) sont assez rares (Kosodo et al., 2004; Landrieu et Goffinet, 1979; Smart, 1973), et donc que des divisions avec un plan de clivage vertical pouvaient conduire à des divisions asymétriques (Huttner et Brand, 1997; Kosodo et al., 2004) grâce à une distribution inégale de la membrane apicale et l'expression de TIS21 (Kosodo et al., 2004). Des facteurs de transcription permettent aussi de promouvoir certains types de division, ainsi il a été montré

qu'EMX2 promeut la division symétrique des cellules et donc la prolifération contrairement à PAX6 qui promeut la division asymétrique et donc la division neurogénique.

L'orientation du fuseau mitotique a elle aussi été montrée comme cruciale dans la régulation de la balance division symétrique/asymétrique (Figure 7). Cette orientation est notamment régulée par le complexe d'orientation du fuseau mitotique LGN/Gai/NuMa et par le complexe de polarité apicale PAR3-PAR6-aPKC. Ces mécanismes dépendent des centrosomes et des microtubules (Matsuzaki et Shitamukai, 2015). De nombreuses protéines mutées ont aussi été montrées comme responsables de malformations corticales dues à des anomalies de l'orientation du fuseau. Par exemple des mutations dans des régulateurs de l'orientation du fuseau, *LIS1* et *HTT*, par exemple, conduisent respectivement à des lissencéphalies de type 1 et à la maladie de Huntington. Les deux protéines régulent la dynéine qui permet la régulation de l'orientation du fuseau et qui est, elle aussi, impliquée dans les malformations du développement cortical.

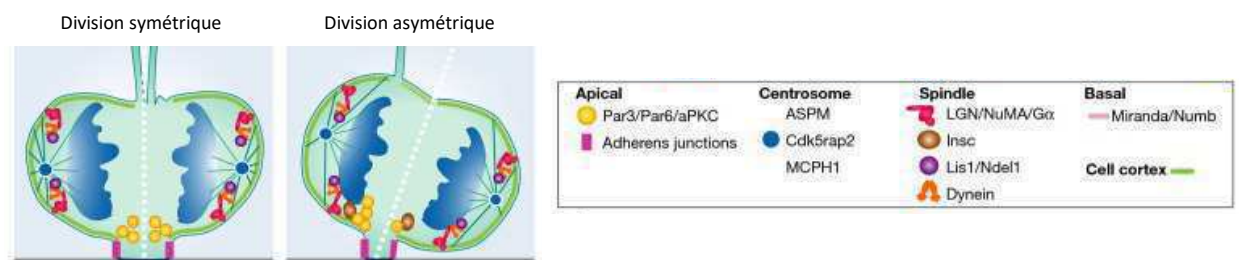


Figure 7 : Le choix entre division symétrique et asymétrique est régulé par l'orientation du fuseau mitotique et par les protéines centrosomales. D'après Paridaen et Huttner 2014.

1.2.1.2 Cil primaire et neurogénèse

Il a été montré que le cil primaire jouait aussi un rôle important dans la neurogénèse. Les progéniteurs neuronaux (CNE et CGR) sont en effet dotés d'un cil primaire, cet organite sensoriel constitué de microtubules permet de capter différents signaux présents dans le milieu extracellulaire et en particulier les effecteurs de la voie Sonic Hedgehog, WNT ou IGF (Lehtinen et Walsh, 2011; Louvi et Grove, 2011). Le cil primaire est ancré au niveau du centrosome et le corps basal du cil est le centriole père du centrosome. Lors des divisions asymétriques, la cellule fille qui hérite du centriole père le plus âgé reforme donc un cil primaire plus rapidement que l'autre cellule fille. Cela lui permet de répondre plus

rapidement aux signaux extracellulaires et favorise son maintien à l'état progéniteur. L'autre cellule fille quant à elle hérite du centriole fille, et va se différencier et former un nouveau cil primaire au niveau de sa membrane baso-latérale (au lieu d'apicale auparavant) ce qui va entraîner son détachement de la paroi ventriculaire (Wilsch-Brauninger et al., 2012).

1.2.1.3 Contrôle du cycle cellulaire

Il a été montré que la longueur du cycle cellulaire avait une incidence sur le type de division des progéniteurs. En effet, il semble chez la souris qu'au cours de la neurogenèse le temps de division s'allonge et les CGR en fin de neurogenèse ont notamment des phase G1 et S allongées par rapport aux CGR au début de la neurogenèse (Arai et al., 2011; Calegari et al., 2005). Des études ont aussi montré que les cellules prolifératives ont une phase S raccourcie par rapport aux cellules neurogéniques. Arai et al suggèrent que cet allongement serait la conséquence d'une réplication plus lente et donc plus fidèle de l'ADN afin qu'il existe le moins d'erreurs possible dans les cellules prolifératives (Arai et al., 2011).

1.2.1.4 Voies de signalisation impliquées dans la neurogenèse

1.2.1.4.1 *Notch*

La principale voie de signalisation impliquée dans la neurogenèse est la voie Notch. Il a, en effet, été montré que cette voie jouait un rôle essentiel dans les processus de différenciation cellulaire du système nerveux, les cellules exprimant les ligands Notch vont empêcher transitoirement la différenciation des cellules voisines et ralentissent ainsi leur engagement dans la neurogenèse (Figure 8).

Une perte de fonction de Notch entraîne l'expression de gènes proneuraux dans les cellules progénitrices qui vont alors se différencier en cellules neurales. A l'inverse, une activation constitutive conduit à une inhibition de la différenciation. Les cellules exprimant les ligands de Notch se retrouvent engagées dans une voie de différenciation tout en empêchant la différenciation de leurs voisines, c'est le mécanisme d'inhibition latérale.

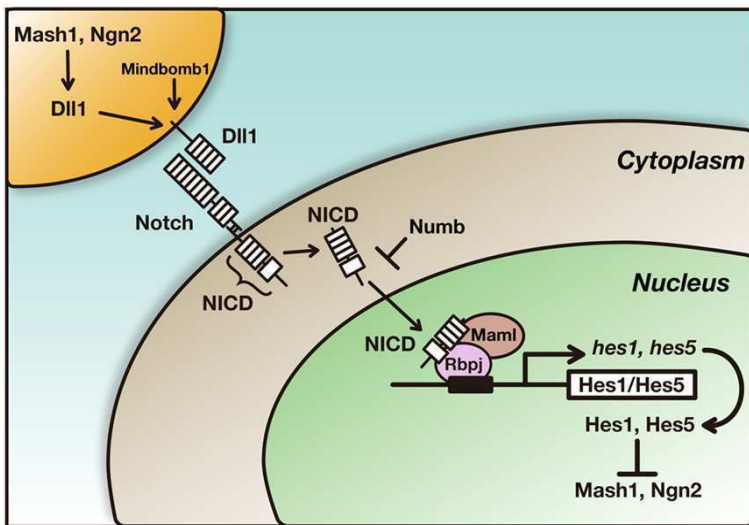


Figure 8 : La signalisation Notch est la principale voie impliquée dans la neurogenèse notamment via le mécanisme d'inhibition latérale. Les gènes proneuronaux comme *MASH1* et *NGN2* promeuvent la différenciation et induisent l'expression de *DLL1* qui va activer Notch dans les cellules voisines. Après l'activation de NOTCH, le domaine intracellulaire de NOTCH (NICD) est relargué dans le cytoplasme et transféré dans le noyau où il forme un complexe avec RBPJ et MAML. Ce complexe va induire l'expression de gènes répresseurs transcriptionnels comme HES1 et HES5. Ces deux gènes vont réprimer l'expression des gènes proneuronaux et *DLL1* ce qui va conduire à la maintenance des cellules progénitrices. De son côté NUMB va inhiber la voie Notch et induire la différenciation neuronale. D'après Shimojo, Ohtsuka, et Kageyama 2011.

1.2.1.4.2 Wnt/ β -caténine

La voie de signalisation Wnt/ β -caténine est, elle aussi, essentielle lors du développement du cerveau (Figure 9). Des expériences de gain et perte de fonction ont permis d'impliquer Wnt dans la prolifération et le renouvellement des CGR (Chenn et Walsh, 2002; Machon et al., 2003). La voie Wnt est aussi impliquée dans la différenciation des CGR en progéniteurs basaux puis dans leur prolifération via la régulation de *N-MYC* et du gène proneural *NGN1* (Hirabayashi et al., 2004; Kuwahara et al., 2010; Viti et al., 2003). Munji et al ont ensuite montré que la voie Wnt était impliquée dans la différenciation des PB (Roeben N. Munji, Youngshik Choe, Guangnan Li, Julie A. Siegenthaler, 2011). Néanmoins, il faut garder à l'esprit que la plupart de ces études utilisent la β -caténine qui est une cible majeure de la voie canonique de Wnt mais cette protéine est aussi impliquée dans des fonctions indépendantes de la voie Wnt. Les phénotypes observés pourraient donc ne pas être exclusivement liés à des dérégulations de la voie Wnt.

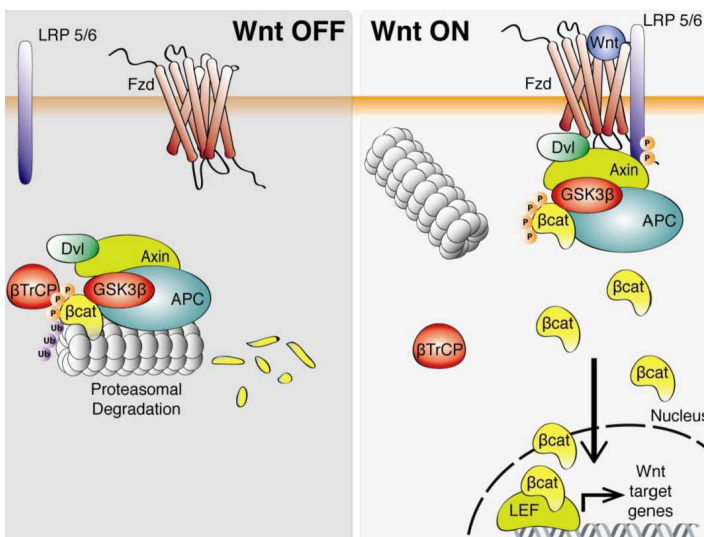


Figure 9 : La voie de signalisation Wnt/ β -caténine est essentielle à la neurogenèse. Panel de gauche : en l'absence de la protéine WNT, GSK-3 β phosphoryle la β -caténine ce qui va conduire à l'ubiquitination par la β -TrCP et à la dégradation par le protéasome. Panel de droite : l'activation de la voie par liaison de Wnt aux récepteur FZD et aux co-récepteurs LRP5/6 déclenche l'association du complexe avec les LRP phosphorylés. Dans cette condition, le complexe capture et phosphoryle la β -caténine empêchant son ubiquitination. La β -caténine est ensuite libérée dans le cytoplasme et entre dans le noyau pour réguler la transcription des gènes cibles de la voie Wnt. D'après Inestrosa et Varela-nallar (2014).

1.2.1.4.3 Bone Morphogenetic Protein (BMP)

Comme la voie Notch et la voie Wnt, la signalisation BMP joue un rôle dans la neurogenèse (Figure 10). Il a en effet été montré que la voie BMP participait à la promotion de la neurogenèse en favorisant la différenciation des progéniteurs en neurones et en inhibant la différenciation en oligodendrocytes (Li et al., 1998; Mabie et al., 1999; Mehler et al., 2000; Moon et al., 2009). La différenciation en neurone est induite via l'expression de TUJ1 (neuron-specific class II β -tubulin) qui est activé par la voie ERK (extracellular-signal-related kinase) (Moon et al., 2009). A la fin de la neurogenèse, la signalisation BMP va arrêter de promouvoir la différenciation en neurone et va plutôt induire une différenciation en cellules astrogliales et cela avant la gliogenèse (Mabie et al., 1999; Mehler et al., 2000).

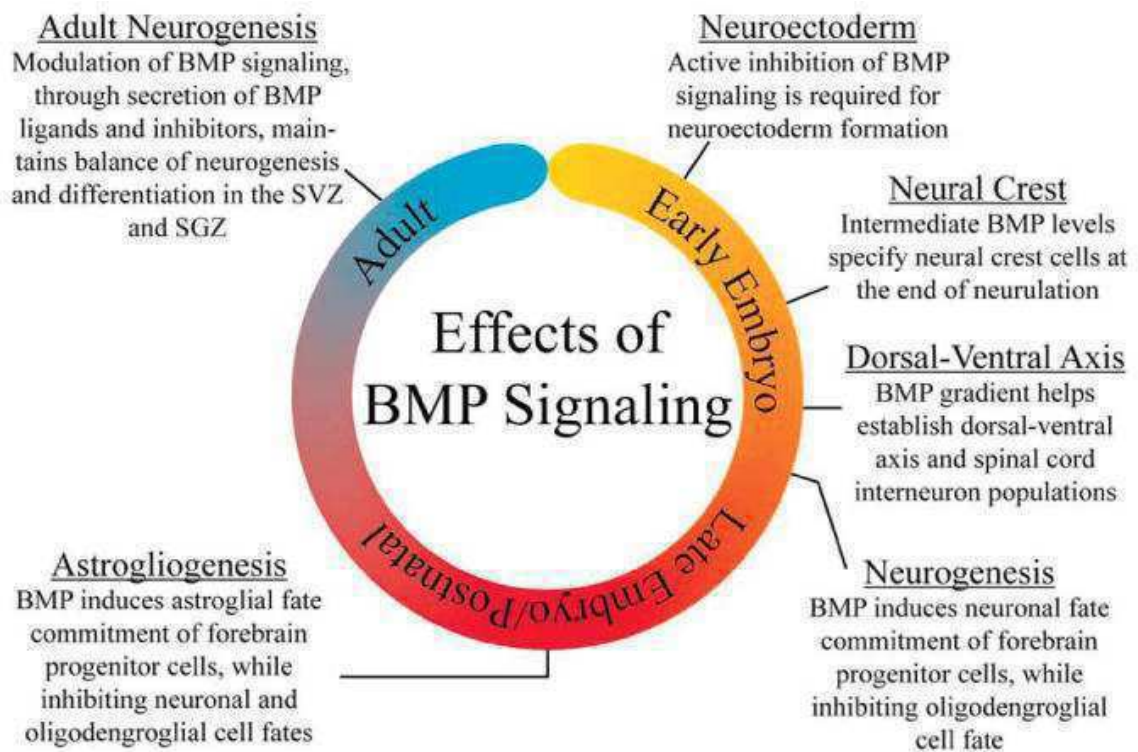


Figure 10 : La voie de signalisation BMP est impliquée dans plusieurs processus neurodéveloppementaux et notamment durant la neurogenèse. D'après Bond 2012.

1.3. La migration neuronale

1.3.1 Généralités

Le cortex cérébral est un réseau composé de milliards de neurones de projection excitateurs et d'interneurones inhibiteurs, ce réseau requiert une architecture complexe et une organisation stricte. Le cortex mature est composé de six couches distinctes qui sont composées de cellules ayant des compositions et des fonctions différentes.

Il existe deux types de migration dans le cortex : une migration tangentielle des interneurones des éminences ganglionnaires jusqu'au cortex (Batista-Brito et Fishell, 2009; Faux et al., 2012; Marín, 2013; Wonders et Anderson, 2006), et une migration radiaire des neurones de projection qui sont générés dans les zones ventriculaires et sub-ventriculaires du télencéphale dorsal (Fietz et Huttner, 2011; Franco et Müller, 2013) et migrent perpendiculairement à la surface du ventricule (Ayala et al., 2007; Oscar Marín¹ et al., 2010)(Figure 11).

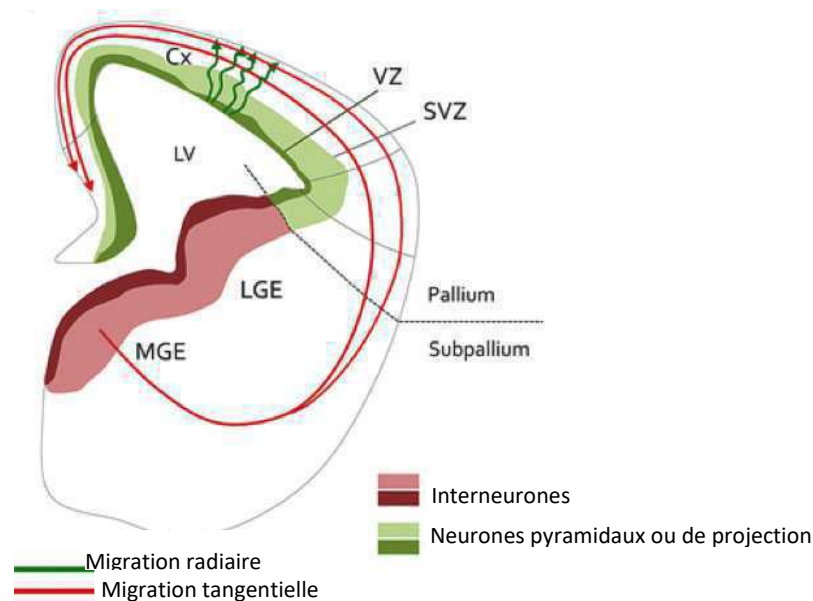


Figure 11 : Schéma d'une coupe coronale d'un hémisphère cérébral de souris en développement. Deux types de migration existe : la migration tangentielle (en rouge) des interneurones à partir des éminences ganglionnaires latérales et médianes (LGE et MGE) pour atteindre le cortex ; et la migration radiaire (en vert) des neurones pyramidaux ou de projection qui sont générés dans les zones ventriculaires et sous-ventriculaire (VZ et SVZ) et qui migrent vers la plaque corticale. Adapté de Godin et Nguyen 2014.

Le positionnement des neurones de projection dans les différentes couches est très bien caractérisé, il a été montré que les neurones migrent selon un ordre « *inside-out* » très finement régulé (Figure 12). Les premiers neurones formés se localisent au niveau des couches les plus profondes, tandis que les neurones formés plus tardivement occupent progressivement les couches les plus superficielles (Angevine et Sidman, 1961; McConnell, 1995; Pasko Rakic, 2007; Rakic, 1974) (Figure 12). Alors que chez les rongeurs la migration effectuée est de l'ordre de quelques centaines de microns, chez l'Homme la distance de migration est d'environ 2 cm (Bystron et al., 2008; Molnár et al., 2006).

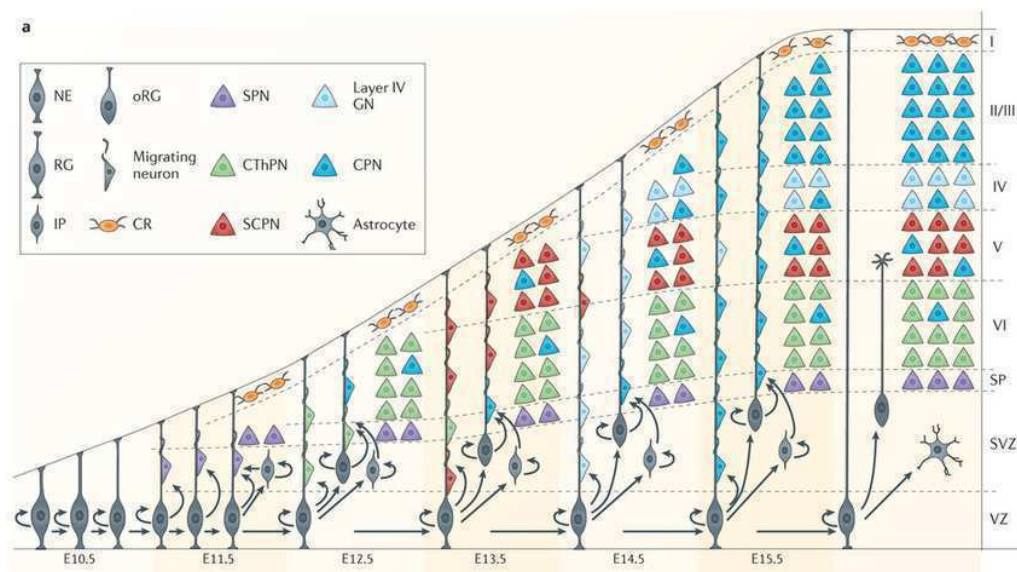


Figure 12 : Schéma représentant la génération séquentielle des neurones de projection et leur migration vers la couche appropriée du cortex au cours du développement embryonnaire de la souris. La production de neurones commence à environ E11,5. Les premiers neurones formés vont former les couches les plus profondes du cortex (cellules violettes), tandis que ceux produits plus tardivement vont migrer à travers les couches selon le processus « *inside-out* » et atteindre les couches les plus superficielles (cellules bleues). D'après Greig et al. 2013.

Les neurones utilisent deux modes de migration différents suivant le stade de développement : les premiers neurones vont migrer par translocation somatique et les seconds vont utiliser les prolongements de la glie radiaire (locomotion) pour atteindre leur destination finale (Ayala et al., 2007).

Les premiers neurones formés ont hérité du prolongement de la glie radiaire dont l'extrémité du « *leading process* » du neurone est d'ores et déjà ancrée à la membrane piaie. Ce « *leading process* » va progressivement rétrécir ce qui va tirer le corps cellulaire du neurone vers la membrane piaie (Miyata et al., 2001; Nadarajah et al., 2001), c'est la translocation somatique (Figure 13).

Les neurones formés plus tardivement utilisent le système de locomotion, cette migration peut être divisée en quatre étapes principales (Figure 13).

Après leur différenciation en neurones, les cellules qui se situent dans la ZV, vont adopter une forme bipolaire et vont rejoindre la partie apicale de la ZSV. Dans la ZSV, les neurones vont adopter une morphologie multipolaire entre 24 et 36h avec une phase dynamique d'extension et de rétractation des prolongements qui leur permet de se déplacer lentement dans toutes les directions (Noctor et al., 2004). Ils vont ensuite adopter une morphologie bipolaire et migrer le long des fibres de la glie radiaire jusqu'à la membrane piale par locomotion (Nadarajah et al., 2001; Noctor et al., 2004; Pasko Rakic, 2007). Les neurones vont allonger puis rétracter leurs processus permettant au corps cellulaire de se déplacer, ils traversent ainsi la sous-plaque, entrent dans la plaque corticale et se déplacent vers la zone marginale. Lorsqu'ils sont arrivés dans la zone la plus supérieure de la plaque corticale, les neurones se détachent de la glie radiaire et migrent grâce à leur processus antérieur qui est ancré à la zone marginale, c'est la translocation somatique. Cette translocation est la dernière étape de migration, le neurone va se localiser à sa position finale.

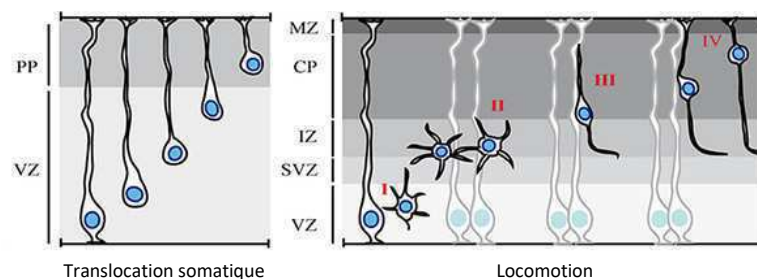


Figure 13 : Schéma illustrant les deux mécanismes de migration des neurones. Les premiers neurones vont migrer par translocation somatique tandis que les plus tardifs vont adopter une morphologie multipolaire (I) ce qui va leur permettre de se rapprocher d'une glie radiaire (II). Ils vont adopter de nouveau une morphologie bipolaire qui leur permettra de migrer le long de la glie radiaire par locomotion (III) et finalement d'être transloqués dans la zone marginale (IV). D'après Azzarelli et al., 2015.

1.3.2 Rôle du complexe LIS1/NDEL1/dynéine dans la régulation de la migration neuronale

Plusieurs études ont montré une implication du complexe LIS1/NDEL1 au cours de la migration (Cahana et al., 2001; Gambello et al., 2003; Tsai et al., 2005; Youn et al., 2009). Il a été montré que LIS1 interagissait avec NDEL1 ainsi qu'avec la dynéine cytoplasmique et la

dynactine. Il a aussi été montré que des mutations dans les gènes *LIS1* et *DYNC1H1* conduisaient à des malformations du développement cortical (Pilz et al., 1999; Poirier et al., 2013). La formation de ce complexe permettrait de créer une force le long des microtubules permettant la nucléokinèse nécessaire à la migration (Tsai et Gleeson, 2005; Vallee et al., 2009). Il a été montré que ce complexe était régulé notamment par la palmitoylation de NDEL1 (Shmueli et al., 2010) mais aussi par la phosphorylation de NDEL1 par CDK5 (Niethammer et al., 2000) et Aurora A (Mori et al., 2007).

1.3.3 Rôle de la voie Reelin dans la migration neuronale

La signalisation Reelin joue un rôle fondamental dans la migration neuronale et dans le processus de migration « *inside-out* ». Des mutations dans le gène *RELN* conduisent à des lissencéphalies et des hypoplasies cérébelleuses (Hong et al., 2000). Les souris KO pour *Reln* présentent une désorganisation des couches corticales due à une incapacité de réaliser le processus « *inside-out* » ce qui provoque une inversion de la lamination (Tissir et Goffinet, 2003). Des phénotypes similaires ont été retrouvés chez des souris mutantes spontanées pour *Dab1*, *Vldlr* et *Lrp8* (D'Arcangelo et al., 1995; Howell et al., 1997; Sheldon et al., 1997; Trommsdorff et al., 1999). Ces trois protéines interviennent dans la même voie de signalisation que la Reelin et sont cruciales lors de la migration des neurones pyramidaux (D'Arcangelo et al., 1995; Hiesberger et al., 1999). Hiesberger et al ont montré que la RELN se liait aux deux récepteurs VLDLR et LRP8 ce qui induisait la phosphorylation de DAB1 par des protéines kinases de la famille Src : FYN et SRC (Howell et al., 1999). Ces kinases sont elles-mêmes régulées par une voie DAB1-dépendante (Arnaud et al., 2003; Bock et Herz, 2003) (Figure 14).

Le mécanisme moléculaire de la migration par translocation implique plusieurs systèmes moléculaires. Le premier est le système DAB1/CRK/RAP1. En effet, l'adaptateur CRK va se lier à la protéine DAB1 phosphorylée et activer le facteur d'échange GTP (GEF), C3G et provoquer l'activation de RAP1 GTPase (Franco et Müller, 2013; Jossin et Cooper, 2011). Jossin et Cooper ont montré que cette signalisation intervenait lors de la migration des neurones multipolaires. Par ailleurs, le complexe CRK/C3G/RAP1 permet ensuite aux neurones en migration et aux cellules Cajal-Retzius produisant la Reelin d'interagir via des molécules d'adhésion (Nectine1/3, et N-Cadhérines) permettant la formation d'une couche « *inside-out* ». La voie Reelin intervient aussi à l'étape de translocation terminale (Franco et

al., 2011; Sekine et al., 2012), en effet deux études ont montré l'implication du système DAB1/CRK/RAP1 dans la dernière étape de la migration neuronale, notamment via l'activation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (récepteur de la fibronectine) entraînant l'adhésion des neurones à la matrice extracellulaire de la zone marginale. Cette adhésion permettrait la translocation terminale du neurone.

Par ailleurs, une étude a montré que la voie Notch très impliquée durant la neurogenèse jouait un rôle critique lors de la migration neuronale en régulant la signalisation Reelin (Hashimoto-Torii et al., 2008) mais le mécanisme précis reste encore à élucider.

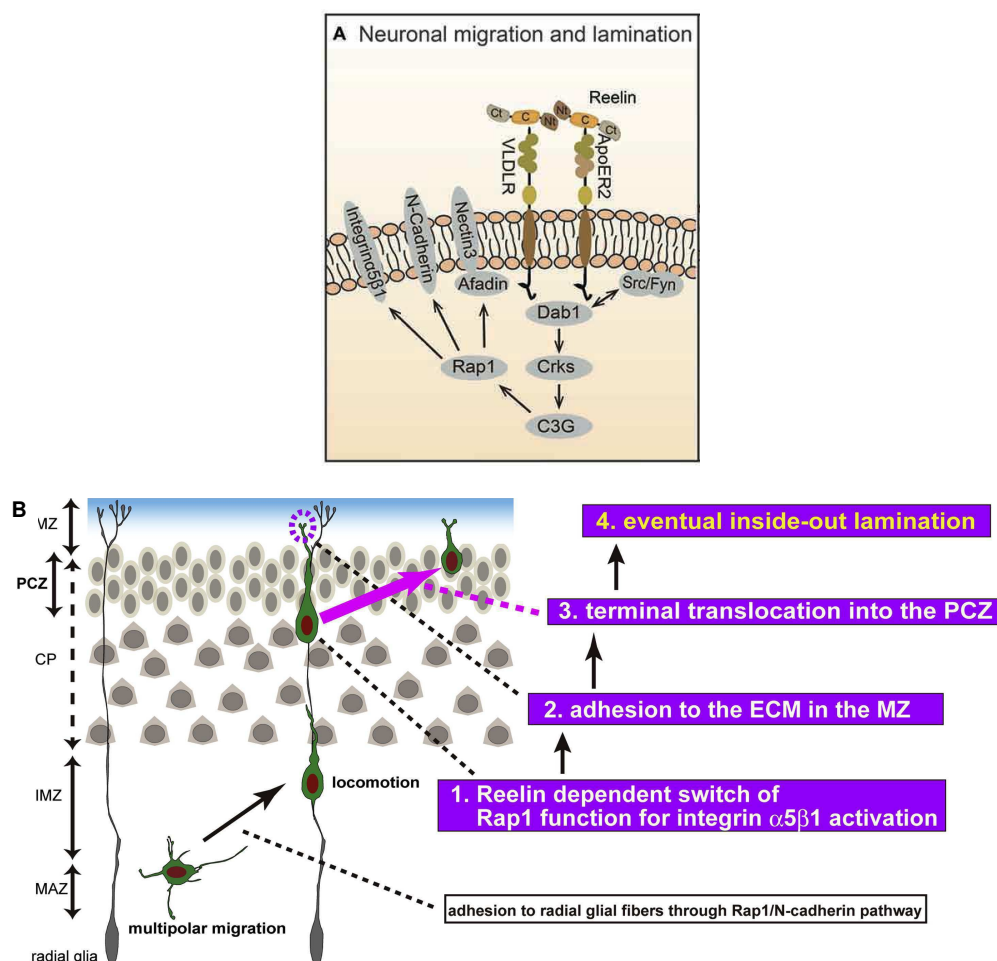


Figure 14 : Rôle de la Reelin dans la migration neuronale. A- La Reelin est sécrétée comme une longue protéine qui contient trois domaines clivables (un domaine Nt, un C et un Ct). Le domaine central va se lier aux récepteurs APOER2 et VLDLR qui vont transduire le signal en activant les kinases SRC/FYN et induire la phosphorylation de DAB1. La Reelin permet ainsi de contrôler la migration neuronale via la signalisation CRK/C3G/RAP1. D'après Lee & D'Arcangelo, 2016. B- Schéma représentant la migration d'un neurone. Les neurones multipolaires changent leur morphologie et deviennent bipolaires ce qui leur permet d'adhérer aux fibres de la glie radiaire via la signalisation RAP1/N-cadhérine et permet la locomotion. Après avoir atteint la PCZ (zone corticale primitive), il y a activation des intégrines $\alpha 5\beta 1$ via la signalisation Reelin ce qui permet l'adhésion à l'ECM (matrice extracellulaire) dans la zone marginale (MZ). Le neurone peut alors changer de mode de migration et terminer sa migration par la translocation somatique assurant ainsi l'organisation « *inside-out* » du cortex. D'après Sekine et al. 2011.

1.4. Neuritogenèse

Le cortex est composé de six couches de cellules qui peuvent être définies par la combinaison de différents facteurs de transcription (Figure 15). Ces couches distinctes sont interconnectées par l'intermédiaire de nombreuses synapses. La couche I, la plus superficielle, est principalement constituée de cellules gliales, mais contient aussi des axones et des dendrites. Dans la couche II, on retrouve des petits neurones inhibiteurs, la couche III contient les neurones pyramidaux à axone intra et interhémisphérique et à dendrites apicales. La couche IV contient des cellules étoilées principalement et des neurones pyramidaux. Dans la couche V, on retrouve aussi des neurones pyramidaux avec des dendrites projetées dans les couches I ou IV. Enfin la couche VI, la plus profonde est constituée de neurones pyramidaux qui projettent leur axone en direction du thalamus.

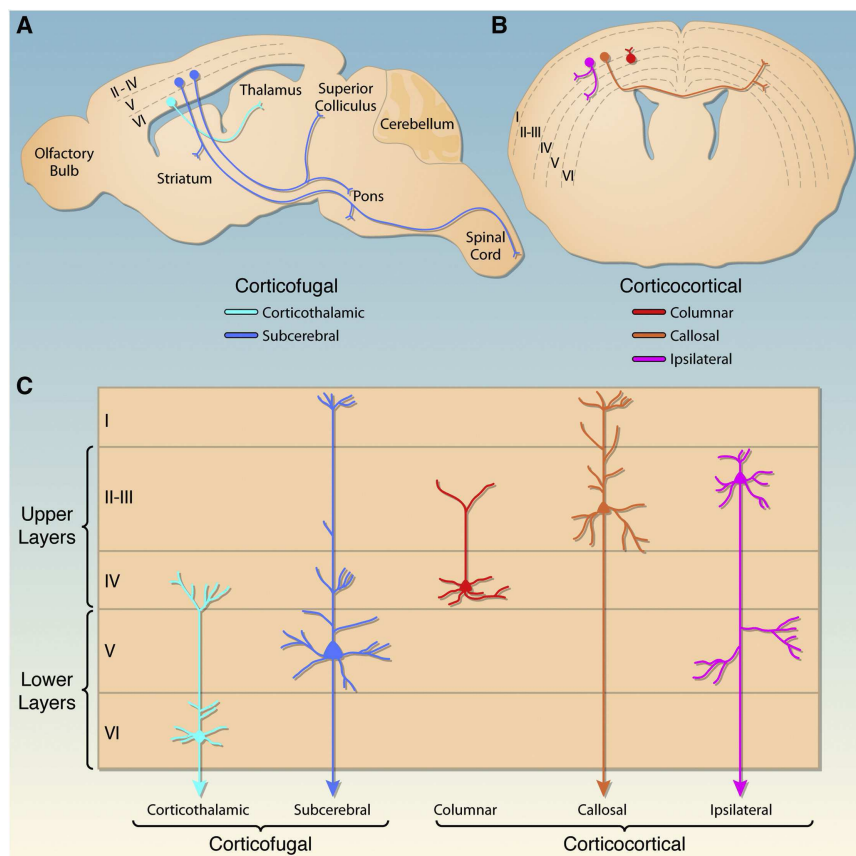


Figure 15 : Les différents types de neurones de projection et leur distribution dans le cortex. D'après Marín et Müller 2014.

Après la migration des neurones dans la couche appropriée, les neurones vont former dans un premier temps un axone, puis des dendrites acquérant ainsi une morphologie en forme de pyramide. Suivant leur déploiement, ils sont classés en trois classes : les neurones à projection calleuse qui projettent leur axone dans l'hémisphère opposé en passant par le corps calleux (couches II-III principalement mais aussi V et VI) ; les neurones de projection sous-corticale qui projettent leur axone vers le tronc cérébral (couche V) ; et enfin les neurones corticothalamiques qui déploient leur axone vers le thalamus (couche VI).

La formation des neurites est la première étape essentielle à la formation des axones et des dendrites qui sont les composants essentiels au développement du réseau neuronal. Pour établir des connexions synaptiques, un neurone doit allonger son axone et ses dendrites sur de longues distances. Ces elongations sont guidées par une structure appelée cône de croissance localisé au niveau de chaque neurite (Tessier-Lavigne et Goodman, 1996)(Figure 16).

L'extrémité des cônes de croissance est constituée de lamellipodes d'où partent des filopodes et dans lesquels il y a des filaments d'actine et de myosine qui s'allongent puis se rétractent permettant l'allongement du neurite. Cette formation est aussi dépendante des microtubules, ces deux réseaux fonctionnant ensemble (Lindenbaum et al., 1988; Shea et Beermann, 1999; Szaro et al., 1991) .

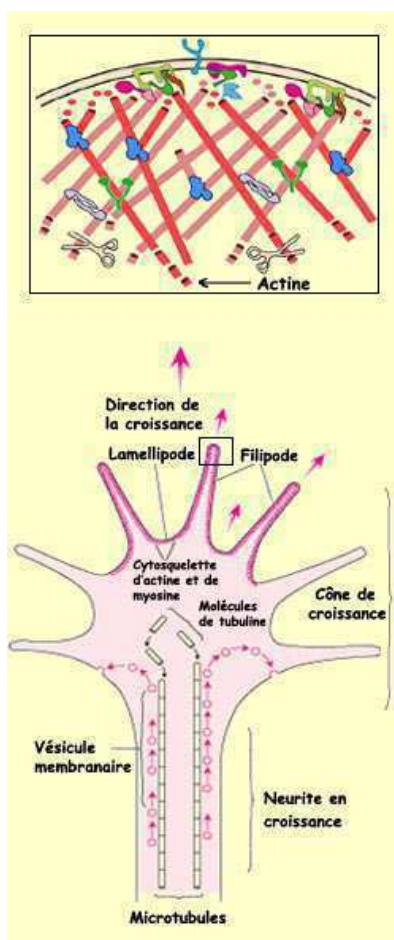


Figure 16 : Schéma illustrant la neuritogenèse. Le cône de croissance est situé à l'extrémité de l'axone et tire celui-ci vers l'avant en effectuant successivement des phases de protrusion, d'adhésion et de contraction. Ces différents mécanismes sont réalisés via des modifications du cytosquelette d'actine et de microtubules. Les filaments d'actine sont projetés dans les filopodes et s'allongent par polymérisation permettant la croissance des filopodes. Au niveau du neurite, au centre de l'axone, c'est la polymérisation des microtubules qui permet l'allongement de l'axone.

1.4.1 Axonogenèse

L'axonogenèse, l'extension d'un processus immature et sa différenciation en axone, est l'événement morphologique initial qui définit la polarisation neuronale. Ce processus est dépendant de signaux extracellulaires qui conduisent à une distribution asymétrique des composants intracellulaires et donc aussi des protéines régulant la polarité cellulaire, comme les protéines du complexe Par et les PI3K.

Les cônes de croissance et donc les futurs axones sont guidés par des molécules présentes dans le milieu extracellulaire. Les premières molécules identifiées sont de la famille des Nétrines, des Sémaforines, les protéines Slits et les Ephrines (Brose et Tessier-Lavigne, 2000; Hung-Hsiang et Kolodkin, 1999; Lemke, 2001; Liu et Strittmatter, 2001; Van Vactor et Flanagan, 1999). Ces molécules peuvent agir comme des attracteurs ou des répulsifs ce qui permet de diriger l'extension des neurites (Figure 17). Plus tard, le nombre de protéines impliquées dans le guidage axonal a augmenté avec l'implication des molécules telles les morphogènes, les facteurs de croissance, et les cytokines qui ont été impliquées dans la croissance axonale (Lyuksyutova, 2003; Mcfarlane et al., 1996; Trousse et al., 2001). La plupart de ces protéines peuvent être attractives ou répulsives suivant le niveau intracellulaire de certains messagers comme cAMP ou cGMP, la composition du milieu extracellulaire, et l'âge du cône de croissance.

Les axones des neurones de projection sont déployés sur de longues distances et la croissance de ces axones est régulée par différentes étapes. Par exemple, le plancher du tube neural va sécréter de la Netrin-1 qui va agir comme cible attractive pour les neurones commissuraux (Tessier-Lavigne et al., 1988). Ensuite, afin de croître plus rapidement au travers du plancher, les cônes de croissance vont de façon coordonnée supprimer l'attraction via la Netrin-1 et la changer en répulsion. Des études assez récentes montrent que la traduction locale permet de contrôler au moins partiellement ce changement attractif/répulsif (Colak et al., 2013; Shigeoka et al., 2013).

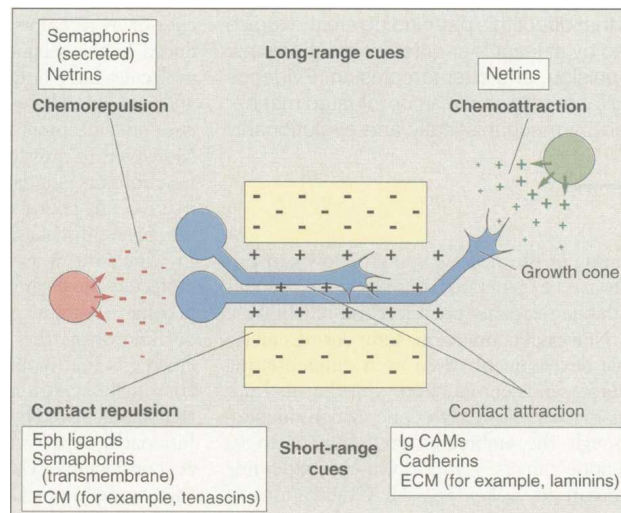


Figure 17 : Mécanismes permettant la croissance axonale. Il existe quatre types de mécanismes permettant le guidage des cônes de croissance : l'attraction par contact, la chemoattraction, la répulsion par contact et la chimiorépulsion. D'après Tessier-Lavigne et Goodman 1996.

L'un des principaux mécanismes contrôlant le guidage axonal est la distribution protéique dans le temps et l'espace au niveau cellulaire. Cette distribution est contrôlée par trois mécanismes : le transport protéique (incluant l'exocytose et l'endocytose), la dégradation protéique (DiAntonio et Hicke, 2004) et la synthèse protéique locale (Colak et al., 2013; Shigeoka et al., 2013). Tous ces mécanismes sont impliqués dans le guidage axonal (Campbell et Holt, 2001).

Comme précisé précédemment, la régulation du cytosquelette d'actine et de microtubules est critique durant l'axonogenèse (Bradke et Dotti, 1999) via les phénomènes de polymérisation-dépolymérisation de ces deux composants. L'actine semble en effet essentielle lors de la sélection du neurite formant l'axone (Bradke et Dotti, 1999), mais l'actine semble peu agir sur l'élongation de celui-ci (Bentley et Toroian-Raymond, 1986). La dynamique des microtubules a été montrée comme essentielle durant l'élongation de l'axone. En effet, les microtubules participent au transport des protéines axonales et une perturbation de ce transport dérégule l'élongation de l'axone (Suter et Miller, 2011).

Parmi les principales voies de signalisation régulant l'arborisation axonale, la voie des RhoGTPases semble jouer un rôle essentiel, de même que la glycogène synthétase kinase 3

(GSK-3). Ces deux signalisations permettent en effet de réguler la dynamique de l'actine et des microtubules grâce aux différents signaux extracellulaires (Figure 18). GSK3- β par exemple participe à la stabilisation des microtubules, en phosphorylant MAP1B ce qui augmente la stabilité des microtubules.

D'autres signaux ont été identifiés comme le NGF qui participe à la formation des filopodes chez le poulet via la signalisation PI3K ce qui permet la polymérisation de l'actine ; le BDNF quant à lui permet de former des branches axonales dans des neurones corticaux de souris via le récepteur TRKB mais participe aussi à la déstabilisation des microtubules permettant la croissance des branches axonales (Figure 18).

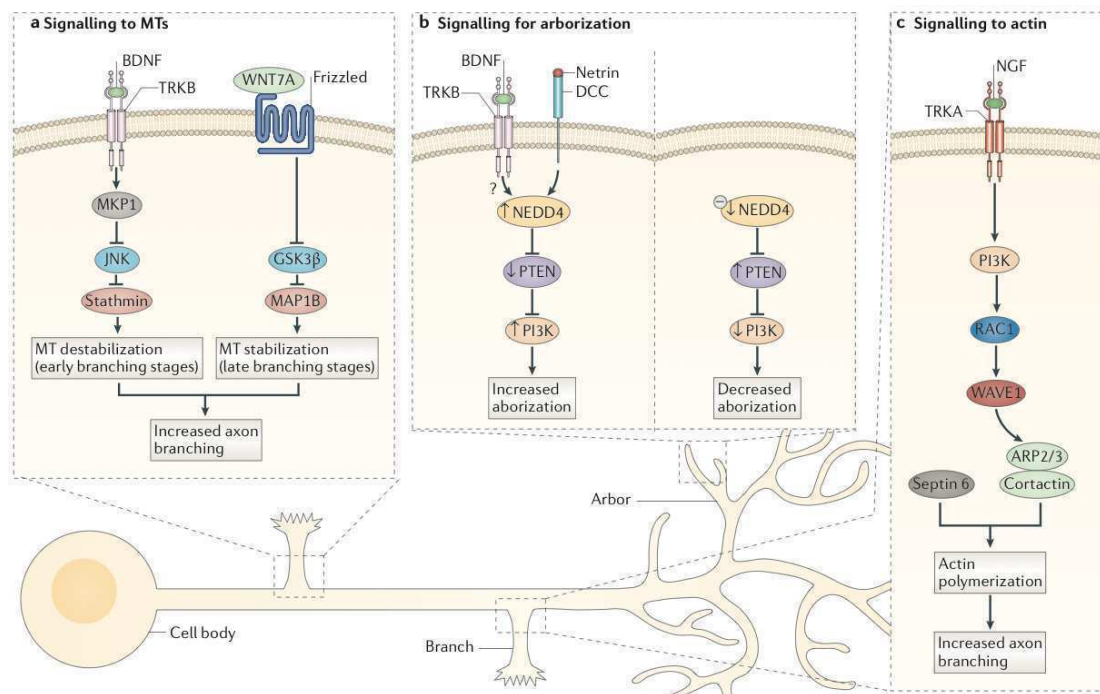


Figure 18 : Les différentes signalisations impliquées dans l'arborisation axonale. Elles participent notamment à la dynamique des microtubules (a), à l'arborisation terminale des axones (b) ou encore à la dynamique du cytosquelette d'actine (c). D'après Kalil et Dent 2014.

1.4.2 Dendritogenèse

Une fois qu'un neurone est polarisé, les neurites restants vont s'allonger et se ramifier pour former l'arborisation dendritique. Comme durant l'axonogenèse, l'organisation du cytosquelette est primordiale. En effet, de nombreux régulateurs du cytosquelette d'actine et de microtubule ont été mis en évidence dans la régulation du développement des dendrites, notamment via la voie des RhoGTPases (Redmond et Ghosh, 2001) ou des protéines régulant le transport des microtubules par exemple CHO1/MKLP1).

1.5. Synaptogenèse

Pour qu'un réseau neuronal soit fonctionnel, il est nécessaire qu'il établisse des connexions synaptiques, c'est ce qu'on appelle la synaptogenèse. La synapse est une jonction asymétrique qui permet de transduire un signal d'un neurone pré-synaptique à un neurone post-synaptique. Au niveau de la terminaison pré-synaptique, ou zone active, le signal électrique est transformé en signal chimique par exocytose de neurotransmetteurs, tandis que la terminaison post-synaptique, ou densité post-synaptique réalise la conversion inverse (Garner et al., 2002).

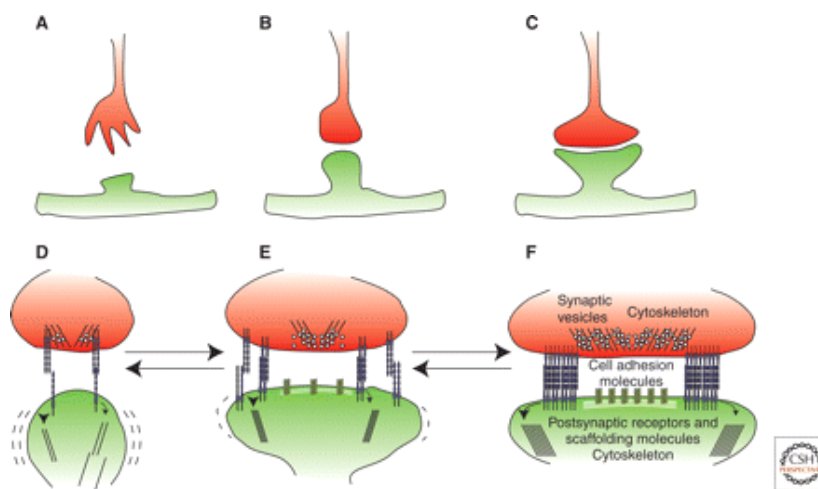


Figure 19 : Les différentes étapes de la formation d'une synapse. A-C : Les filopodes s'allongent grâce aux différents signaux attractifs-répulsifs et rencontrent un axone. D : Des molécules d'adhésion vont permettre de changer la morphologie des épines dendritiques. E : Les contacts entre les compartiments présynaptiques et postsynaptiques sont stabilisés par le recrutement de molécules d'adhésion cellulaire supplémentaires. F : La synapse est fonctionnelle. D'après Giagtzoglou, Ly, et Bellen 2009.

Les connexions entre les axones et leurs cellules cibles semblent régulées par les mêmes mécanismes que le processus de neuritogenèse, c'est à dire par des mécanismes d'attraction-répulsion par contact ou par gradient morphogénique (Figure 19). Au cours de ce processus, des protéines spécifiques sont triées dans les compartiments pré-synaptiques et post-synaptiques grâce notamment aux protéines d'adhésion cellulaire ou via la signalisation trans-synaptique.

L'efficacité de la transmission synaptique est modifiée au cours du temps, c'est ce qu'on appelle la plasticité synaptique. Elle peut être augmentée dans la potentialisation synaptique à long terme (PLT) ou diminuée dans la dépression synaptique à long terme (DLT). Ici on détaillera seulement les synapses excitatrices des neurones de projection. Au

niveau de la zone active, on retrouve des milliers de petites vésicules synaptiques contenant le neurotransmetteur glutamate, ces vésicules fusionnent avec la membrane plasmique sous l'effet d'un potentiel d'action. Une fois relarguées, les vésicules se lient aux récepteurs à glutamate de la densité post-synaptique. Parmi ces récepteurs, les récepteurs NMDA et AMPA (Hollmann et Heinemann, 1994) permettent une dépolarisation locale et une activation des canaux ioniques voltage-dépendants.

La PLT correspond à une intense activation pré-synaptique (en général courte <1s, mais de fréquence élevée >100Hz) qui conduit à une dépolarisation post-synaptique évacuant les ions magnésium qui vont bloquer le récepteur NMDA et faire entrer le calcium dans les dendrites (Figure 21). Ce calcium va se fixer sur la calmoduline et l'activer ce qui va conduire à l'activation d'autres enzymes comme la protéine kinase II calmoduline-dépendante (CaMKII) ou l'adénylate cyclase qui vont phosphoryler leurs protéines cibles. Parmi ces cibles on a la PKA qui va activer la CREB et favoriser ainsi la transcription de gènes dont le gène codant pour le récepteur AMPA ce qui augmente l'efficacité synaptique. A l'inverse de la PLT, la DLT correspond à une activation basse fréquence du neurone pré-synaptique ce qui n'induit pas de dépolarisation du neurone post-synaptique. Cette absence de dépolarisation a pour conséquence l'absence d'élévation de la concentration de calcium et donc l'absence d'activation des kinases citées précédemment, au contraire on a une activation des phosphatases qui vont conduire à la déphosphorylation des récepteurs AMPA.

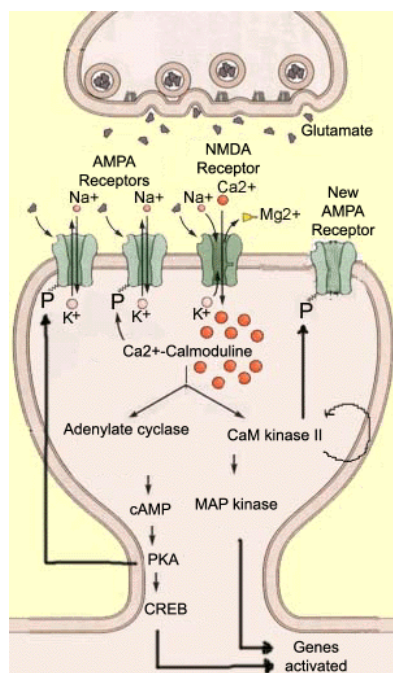


Figure 20 : Schéma de la potentialisation à long terme (PLT) (voir texte principal).

2. Ubiquitination

2.1. Généralités

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle des protéines. Elle consiste en la conjugaison d'une ou plusieurs molécules d'ubiquitine sur une ou plusieurs lysines acceptrices de la protéine substrat. L'ubiquitination a plusieurs fonctions au sein de la cellule, son rôle le plus connu et étudié est la dégradation des protéines par le protéasome. Néanmoins, elle participe aussi au remodelage de la chromatine, à la réparation de l'ADN et aux régulations de localisation, de trafic et de signalisation intracellulaire.

Le processus d'ubiquitination se déroule généralement en trois étapes qui font intervenir trois classes d'enzymes : les enzymes E1 d'activation, les enzymes E2 de conjugaison et les enzymes E3 de ligation (Figure 21). Dans la suite de cette introduction nous verrons qu'il existe une autre classe d'enzymes, les E4, mais le rôle de ces dernières est encore à clarifier.

L'ubiquitination est essentielle pour les cellules et est très finement régulée, d'une part par les différentes enzymes nécessaires à son déroulement mais aussi par le processus inverse appelé déubiquitination réalisé par des déubiquitinases (DUB) (Figure 21).

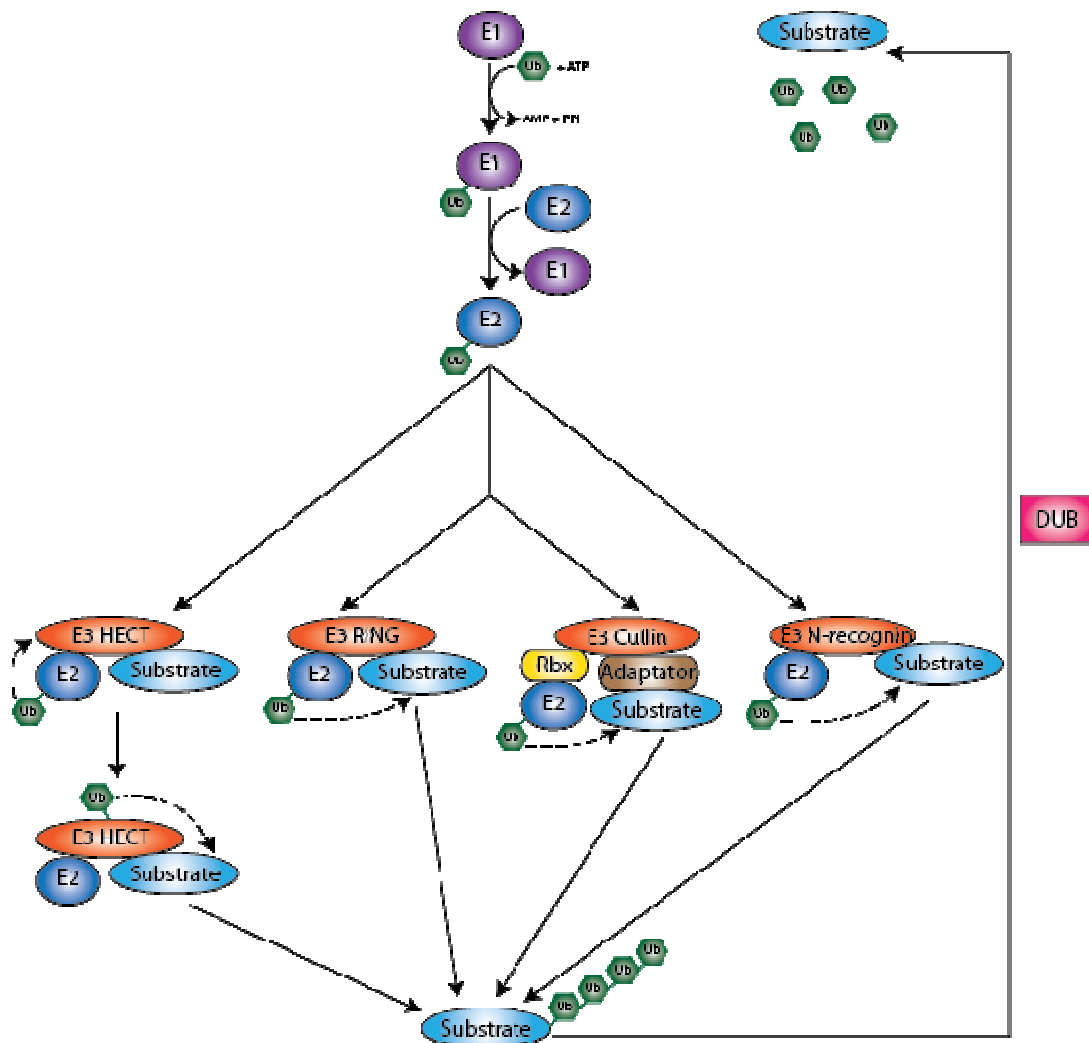


Figure 21 : Schéma récapitulatif du processus d'ubiquitination.

2.2. L'ubiquitine

L'ubiquitine est un polypeptide de 76 acides aminés qui contient sept lysines (K6, 11, 27, 29, 33, 48, 63) et une méthionine M1 N-Terminale (Jackson, 2006; Pickart et Eddins, 2004) (Figure 22). Elle possède une glycine à son extrémité C-terminale permettant de former une liaison thioester avec une E1. Sa structure est extrêmement conservée parmi les différentes espèces d'eucaryotes. Comme son nom l'indique, elle est exprimée dans toutes les cellules de façon ubiquitaire. D'autres molécules très proches de l'ubiquitine, de par leur structure tridimensionnelle et leur repliement, ont été identifiées et sont appelées ULM (Ubiquitin-Like protein Modifiers) telles que SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier) ou NEDD8 (Neural precursor cell-expressed Developmentally Downregulated-8) par exemple. Ces molécules peuvent être conjuguées de la même façon que l'ubiquitine sur des substrats.

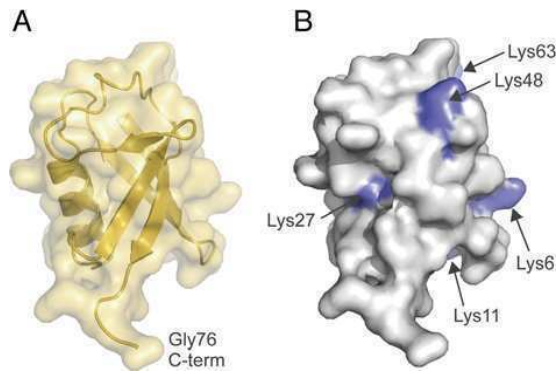


Figure 22 : Structure de l'ubiquitine. A- Représentation en surface et en ruban de l'ubiquitine (code PDB : 1UBQ) avec représentation de la glycine C-terminale. B- Localisation des résidus lysines (en bleu) sur le peptide ubiquitine représenté en surface. D'après Hurley et al., 2006.

Les protéines cibles peuvent être mono-ubiquitinées (addition d'une seule molécule d'ubiquitine), multi-mono-ubiquitinées (addition d'une molécule d'ubiquitine sur plusieurs résidus de la protéine) ou polyubiquitinées (addition d'une chaîne d'ubiquitine). Plus récemment, il a été montré que d'autres types d'ubiquitination existaient, les chaînes d'ubiquitination peuvent en effet être homotypiques ou hétérotypiques, elles peuvent être constituées en partie d'ULM mais aussi subir des modifications post-traductionnelles (Figure 23).

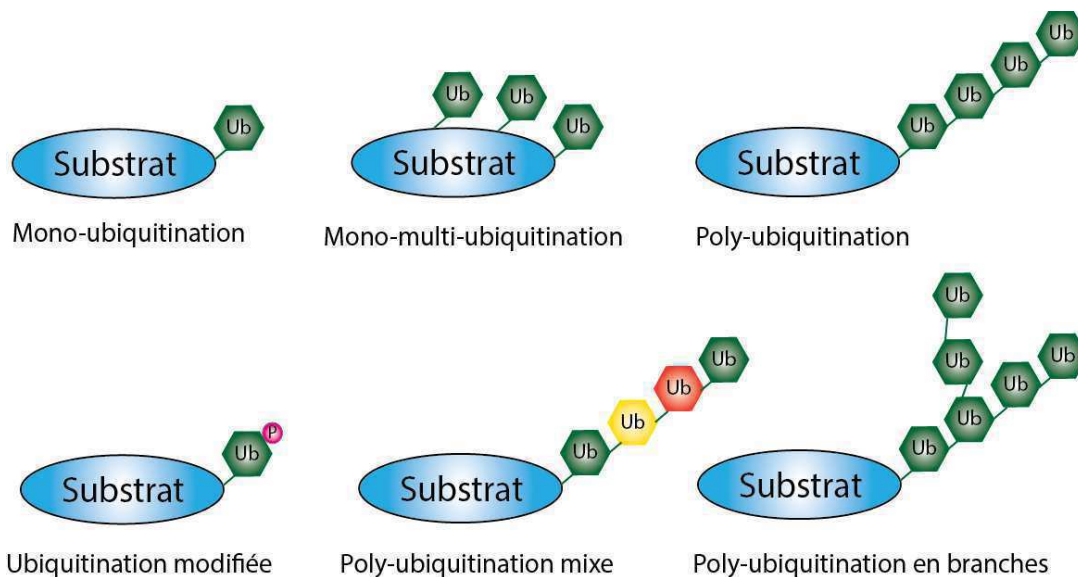


Figure 23 : Les différentes formes d'ubiquitination. A – Les modifications par l'ubiquitination peuvent se faire de trois façons : mono-ubiquitination, multi-mono-ubiquitination ou polyubiquitination. B – Les chaînes d'ubiquitine peuvent être homotypiques ou hétérotypiques, c'est à dire contenir soit exclusivement des peptides ubiquitine soit un mélange d'ubiquitine et d'ubiquitin-like modifiers (ULM). C – Les peptides ubiquitine ou ULM peuvent subir des modifications post-traductionnelles.

2.3. Les enzymes d'activation : E1

Les enzymes d'activation E1 permettent de catalyser la première étape de la réaction d'ubiquitination : l'activation de la molécule d'ubiquitine. Cette activation débute par la liaison d'une molécule d'ATP sur l'ubiquitine ce qui conduit à la formation d'un intermédiaire ubiquitine-adénylate qui va servir de donneur d'ubiquitine à l'E1. Parallèlement à cette liaison, l'enzyme E1 va se lier à une molécule d'ATP provoquant un changement de conformation de l'enzyme permettant une meilleure affinité pour l'ubiquitine. Ensuite, la glycine C-terminale de l'ubiquitine est activée de manière ATP-dépendante et subit une attaque nucléophile par l'atome soufre d'une cystéine située au niveau du site active de l'E1. Cette attaque conduit à la formation d'une liaison thiol-ester entre la glycine C-terminale de l'ubiquitine et la cystéine de l'enzyme E1. Chaque E1 est capable de porter deux molécules d'ubiquitine, l'une sous forme d'adénylate et l'autre sous forme de thiol ester. Dès qu'une molécule d'ubiquitine est activée, elle est transférée à une enzyme de conjugaison E2 tandis que l'intermédiaire ubiquitine-adénylate est transférée sur le site thiol afin de former lui aussi une liaison thiol-ester (Haas et al., 1982; Jin et al., 2007; Scheffner et al., 1995).

Depuis sa découverte en 1981, il a longtemps été considéré qu'il n'existait qu'une seule enzyme d'activation : UBE1 (Ubiquitin-activating enzyme 1). Néanmoins d'autres travaux ont permis de caractériser d'autres protéines ayant les mêmes propriétés qu'UBE1, il s'agit d'UBA6 (Ubiquitin-like modifier activating enzyme 6) et UBE1L2 (Ubiquitin-activating E1-like protein 2) (Groettrup et al., 2008; Pelzer et al., 2007).

2.4. Les enzymes de conjugaison : E2

La deuxième étape de l'ubiquitination est l'étape de conjugaison réalisée par des E2 ou enzyme de conjugaison. Pour le moment, on dénombre une quarantaine d'E2 chez l'homme (Michelle et al., 2009; Ye et Rape, 2009).

Les E2 sont constituées d'un domaine catalytique très conservé de 150 acides aminés appelé UBC Ubiquitin Conjugating domain). Néanmoins, des différences notables existent au niveau de leurs extrémités N-terminale et C-terminale ce qui leur permet d'interagir avec une certaine spécificité avec une E3 ubiquitine ligase. Cette spécificité peut être augmentée via

la liaison d'E2 avec des cofacteurs qui permettent aussi d'influencer la localisation de l'E2 et son activité (Plafker et al., 2004).

L'enzyme de conjugaison E2 va se lier à une molécule d'ubiquitine active via la cystéine du site actif UBC par une liaison thioester covalente (Markson et al., 2009; Ravid et Hochstrasser, 2007).

Des E2 liées à certaines E3 ubiquitine ligases peuvent directement transférer leur molécule d'ubiquitine à un substrat ou à un résidu lysine de l'ubiquitine permettant la polyubiquitination du substrat (Hochstrasser, 2006; Windheim et al., 2008; Ye et Rape, 2009).

Il a été montré que bien que le choix du substrat dépendait de l'E3 ubiquitine ligase, ce sont les E2 qui détermineraient le type d'ubiquitination et donc le devenir des protéines ubiquitinées (Christensen et al., 2007; Hofmann et Pickart, 1999; Ye et Rape, 2009). De plus, il a été montré que certaines E2 pouvaient transférer directement l'ubiquitine sur les substrats, néanmoins cette capacité est très minoritaire et le processus d'ubiquitination nécessite dans l'immense majorité des cas, une E3 ubiquitine ligase.

2.5. Les ubiquitine ligase : E3

La dernière étape du processus d'ubiquitination est la ligation des molécules d'ubiquitine activées à un substrat. Cette étape se déroule en deux temps, dans un premier temps, l'E3 ligase va interagir avec le substrat et dans un deuxième temps une ou plusieurs molécules d'ubiquitine vont être liées de façon covalente au substrat. Les E3 permettent donc la reconnaissance des substrats et le transfert des molécules d'ubiquitine des E2 au substrat. Il est donc nécessaire qu'elles soient très spécifiques, c'est pourquoi on dénombre pour le moment environ 700 E3 et certainement beaucoup d'autres ne sont pas encore identifiées (Avram Hershko et Ciechanover, 1998; Deshaies et Joazeiro, 2009; Hershko et al., 1983).

On peut classer les E3 ubiquitine ligases en trois catégories selon leur fonctionnement et leur structure : les RING (Really Interesting Gene) et les U-box, les HECT (Homologous to the E6-AP Carboxyl) et les N-Recognin.

2.5.1 Les E3 Really Interesting New Gene (RING) et U-box

Les E3 à domaine RING sont les plus nombreuses avec plus de 600 protéines identifiées et sont caractérisées par leurs domaines en doigts de zinc (Cys3HisCys4 qui se lie à deux Zn²⁺). Ces domaines contiennent 40 à 60 acides aminés qui permettent grâce aux liaisons avec les Zn²⁺ de stabiliser la structure globale. Les deux sites de liaison au zinc sont entrelacés et permettent de former une structure globulaire pour l'interaction protéine-protéine d'où leur nom RING. Trois autres familles peuvent être affiliées à cette catégorie d'enzyme à domaine RING : les PHD finger (Plant Homeo-Domain), les LIM (Lin-11/Isl-1/Mec-3) et les U-box. Les deux premières familles ne seront pas développées ici car elles ne participent pas à l'ubiquitination. Les E3 RING et les U-box, elles, participent au transfert de l'ubiquitine par orientation spatiale de l'enzyme de conjugaison.

Parmi les E3 à domaine RING, certaines nécessitent la formation d'un complexe pour l'ubiquitination de protéines où le substrat est reconnu par une autre protéine que l'E3 ubiquitine ligase. Ces E3 font partie de la sous-famille des Cullines et ont besoin d'adaptateurs pour reconnaître leur substrat. Ces adaptateurs contiennent donc des domaines F-box, SOCS-box, ou BTB par exemple qui permettent la reconnaissance et la spécificité des substrats. Ces complexes sont appelés Cullin-RING ligase ou CRL (Deshaies et Joazeiro, 2009).

2.5.2 Les E3 Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus (HECT)

Les E3 ubiquitine ligases à domaine HECT (Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus) contiennent toutes un domaine catalytique HECT d'environ 350 acides aminés localisé au niveau C-terminal. De plus, les protéines contiennent toutes un ou plusieurs domaines d'interaction protéine-protéine ou protéine-lipide permettant la reconnaissance des substrats du côté N-terminal. Basé sur l'architecture des domaine N-terminaux, les 28 E3 à domaine HECT sont divisées en trois sous-classes : la famille des Nedd4 (Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4) qui comprend 9 membres : NEDD4L, ITCH, SMURF1, SMURF2, WWP1, WWP2, NEDL1 (HECW1), NEDDL2 (HECW2) ; la famille des HERC avec 6 membres : HERC1-6 qui possède un domaine RLD, un domaine SPRY et un WD40 ; et la famille des autres HECT, sans domaine RLD ni WW, incluant des protéines aux domaines variés (13 membres), pouvant être des domaines WWE, ankyrine, UBA, doigt de zinc, PABP, PHD ou RING.

A l'inverse des E3 à domaine RING, l'ubiquitination via les E3 à domaine HECT se déroule en 2 étapes. Dans un premier temps, les molécules d'ubiquitine sont liées à l'E3 via une liaison thioester intermédiaire puis dans un deuxième temps elles sont transférées au substrat.

2.5.3 Les N-Recognins

La règle du N-terminal (ou "*N-end rule*"), est un système protéolytique qui permet grâce à la déstabilisation de certains résidus N-terminaux de signaler une protéine à la destruction (Figure 24). Les acides aminés concernés, se combinent avec une lysine située légèrement en aval pour former une cassette appelée N-degron. Le N-degron est reconnu par un complexe protéique E2-E3, appelé N-recognin, qui ajoute des ubiquitines à la lysine.

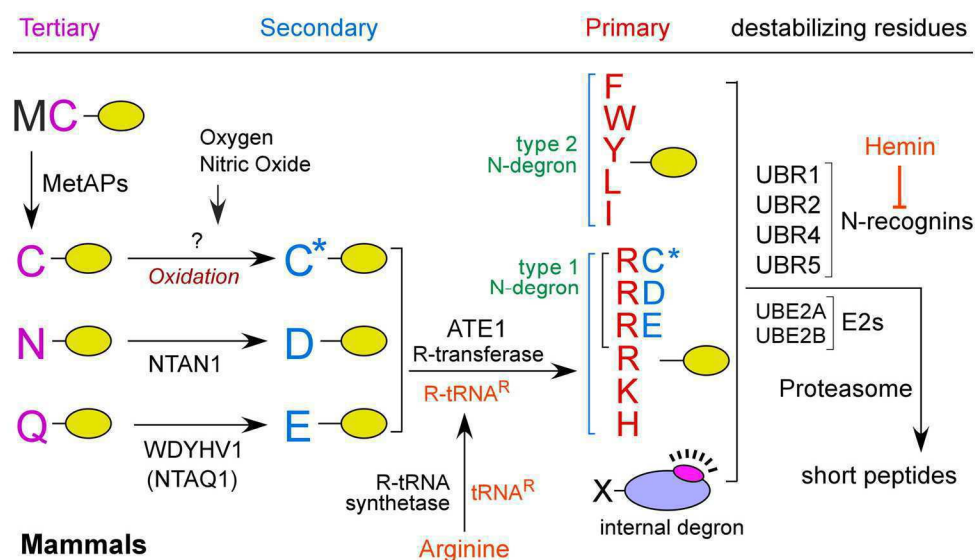


Figure 24 : La voie N-end rule est un système protéolytique reposant sur l'instabilité de certains résidus N-terminaux qui vont envoyer un signal de destruction de la protéine au protéasome. D'après S. T. Kim et al. 2013.

2.6. Les E4

Un quatrième facteur interviendrait dans certains cas pour allonger les chaînes de polyubiquitination, il s'agit de l'enzyme E4 (Hoppe, 2005). Néanmoins son rôle exact et les mécanismes utilisés restent encore à élucider.

2.7. Les déubiquitines (DUB)

L'ubiquitination est un phénomène réversible grâce à l'action d'enzyme appelées déubiquitines ligases ou déubiquitines (DUB). Ces enzymes sont capables d'hydrolyser les liaisons isopeptidiques entre les molécules d'ubiquitine au niveau des chaînes de polyubiquitine ou entre l'ubiquitine et le substrat. Il existe une centaine de DUB qui peuvent être divisées en cinq classes : les USP (Ubiquitin Specific Proteases), les UCH (Ubiquitin C-terminal Hydrolases), les OTU (Ovarian Tumor proteases), les MJD (Machado-Josephin Domain proteases) les JAMM (JAB1/MPN/MOV34) (Figure 25). Les quatre premières sont des protéases à cystéine alors que les JAMM sont des métalloprotéases à zinc.

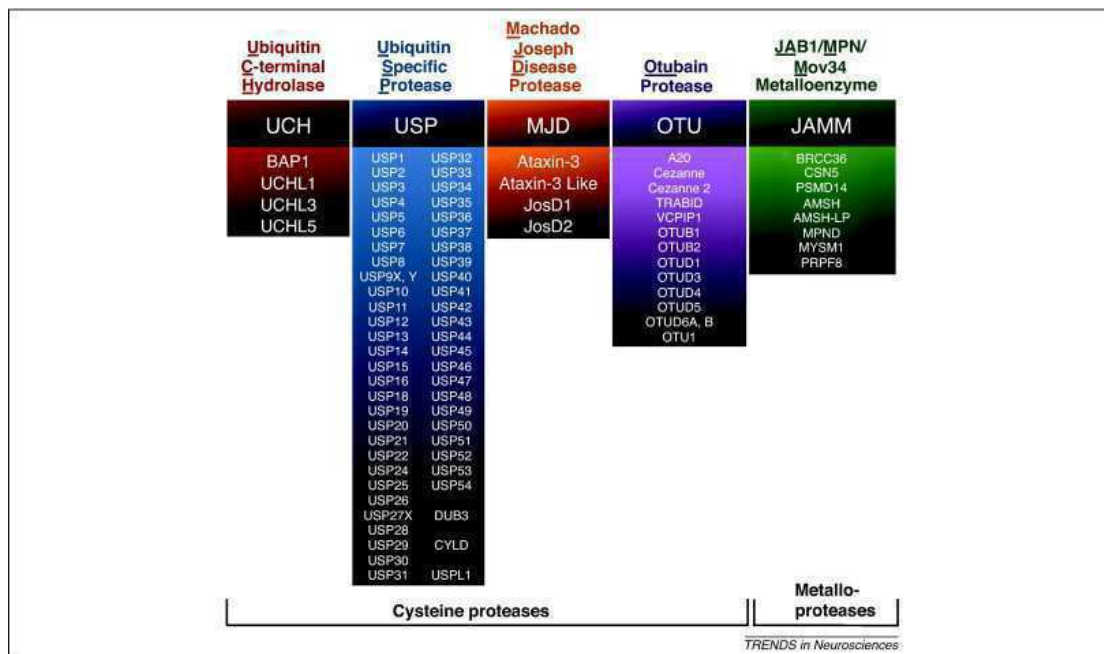


Figure 25 : Les cinq classes de déubiquitines basées sur l'homologie de leur domaine catalytique. D'après Todi et Paulson 2011.

Les DUB contiennent de nombreux domaines d'interaction protéine-protéine (Komander et al., 2009), mais aussi de nombreux domaines UBD (Ubiquitin-Binding Domain) tels que les UBA (UBiquitin Associated), les UIM (Ubiquitin-Interacting Motif), les ZnF, UBP (UBiquitin-specific processing Protease), etc ...

Certaines DUB contiennent des domaines UBL (Ubiquitin-Like fold) qui permettent le recrutement au protéasome, l'inhibition catalytique ou encore l'activation catalytique (Faesen et al., 2012).

Tous ces domaines permettent la reconnaissance du type de chaînes d'ubiquitine que les DUB peuvent cliver mais aussi définissent leur localisation influant ainsi leur activité.

L'activité catalytique des DUB est finement régulée soit par des changements conformationnels ou par la régulation transcriptionnelle. Elles peuvent agir de façon complète ou incomplète sur des substrats mono ou polyubiquitinés et les chaînes peuvent être clivées soit à l'intérieur (endoactivité) ou à partir des extrémités (exoactivité) suivant la DUB.

Il a été montré que les DUB avaient plusieurs fonctions (Figure 26). La première est d'activer les précurseurs d'ubiquitine. La deuxième est de vérifier que les protéines ubiquitinées sont bien destinées à être dégradées (activité « *proofreading* »), dans le cas contraire, elles sont déubiquitinées. Enfin, la troisième fonction est de débarrasser le protéasome 26S des chaînes de polyubiquitine libres qui pourraient gêner le processus de dégradation en entrant en compétition avec les protéines ubiquitinées.

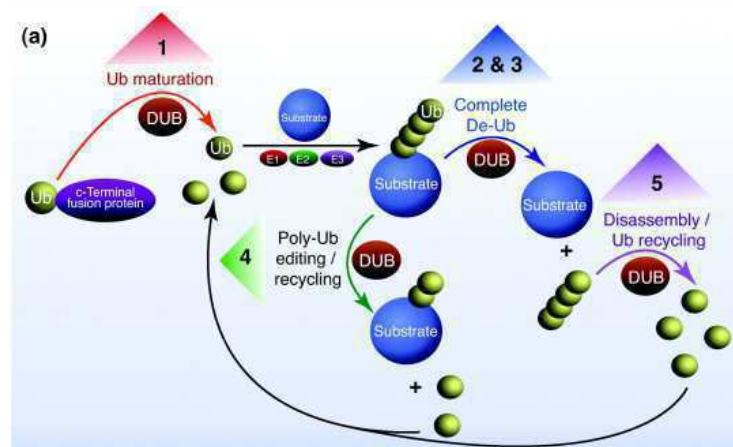


Figure 26 : Le processus de déubiquitination. Les DUB peuvent agir dans la maturation des ubiquitines (1), dans la déubiquitination des substrats (complète ou incomplète) (2 et 3) ou encore le recyclage (4) et dans le désassemblage des ubiquitines (5). D'après Todi et Paulson 2011.

2.8. Devenir des protéines ubiquitinées

L'ubiquitination permet de modifier la stabilité ou l'activité d'une protéine cible. En fonction du type d'ubiquitination, de la longueur des chaînes et de la lysine utilisée, le destin de la protéine cible sera différent. Il a été montré que des protéines ubiquitinées sur des domaines UBD particuliers permettaient de former des interactions protéine-protéine spécifiques qui permettaient d'influencer l'adressage des protéines ubiquitinées dans différentes voies.

Les sept lysines de l'ubiquitine peuvent être utilisées pour le marquage (Figure 27). L'ubiquitination la plus connue et la plus étudiée est la polyubiquitination des K48 permettant l'envoi des protéines cibles au protéasome où elles seront dégradées. La découverte de ce rôle de l'ubiquitination a valu à Ciechanover, Hershko et Rose le prix Nobel de Chimie en 2004 (Avram Hershko et Ciechanover, 1998). Ensuite il a été montré que la polyubiquitination en K48 nécessitait la présence d'au moins quatre molécules d'ubiquitine pour que la protéine soit adressée au protéasome (Thrower et al., 2000).

L'ubiquitination a aussi un rôle dans les interactions entre protéines, en effet une protéine ubiquitinée peut interagir avec des protéines possédant des domaines de liaison à l'ubiquitine (UBD) (Hurley et al., 2006). Par exemple, il a été montré que RIP1, une protéine kinase était polyubiquitinée par TRAF2, une E3 ubiquitine ligase. Cette ubiquitination conduit au recrutement de la kinase TAK1 et du complexe IKK (I κ B Kinase) qui sont cruciaux pour l'activation de la voie NF- κ B (Israël, 2010). Par la suite, d'autres études ont montré que les protéines monoubiquitinées ou multi-monoubiquitinées ne sont pas adressées au protéasome mais participent notamment au trafic membranaire, à la réparation de l'ADN, à la régulation de la transcription (via des modifications des histones H2B) ou encore à l'inactivation du chromosome X (via des modifications des histone H2A) (Hicke, 2001; Hoeller et al., 2006; Katzmann et al., 2002; Kirkin et Dikic, 2007; Muratani et Tansey, 2003; Woelk et al., 2006; Zhu et Wani, 2010) (Figure 28). Quant aux protéines polyubiquitinées avec une courte chaîne de molécules d'ubiquitine liées entre elles par K6 ou K63, elles participent en général à la réparation de l'ADN, à la réponse inflammatoire ou à la signalisation cellulaire (Komander, 2009).

Les fonctions biologiques de l'ubiquitination sont nombreuses notamment au niveau des voies de signalisation cellulaires. En effet, de nombreuses voies sont régulées par un ou plusieurs processus d'ubiquitination, à différents niveaux et via une ou plusieurs E3 ubiquitine ligases.

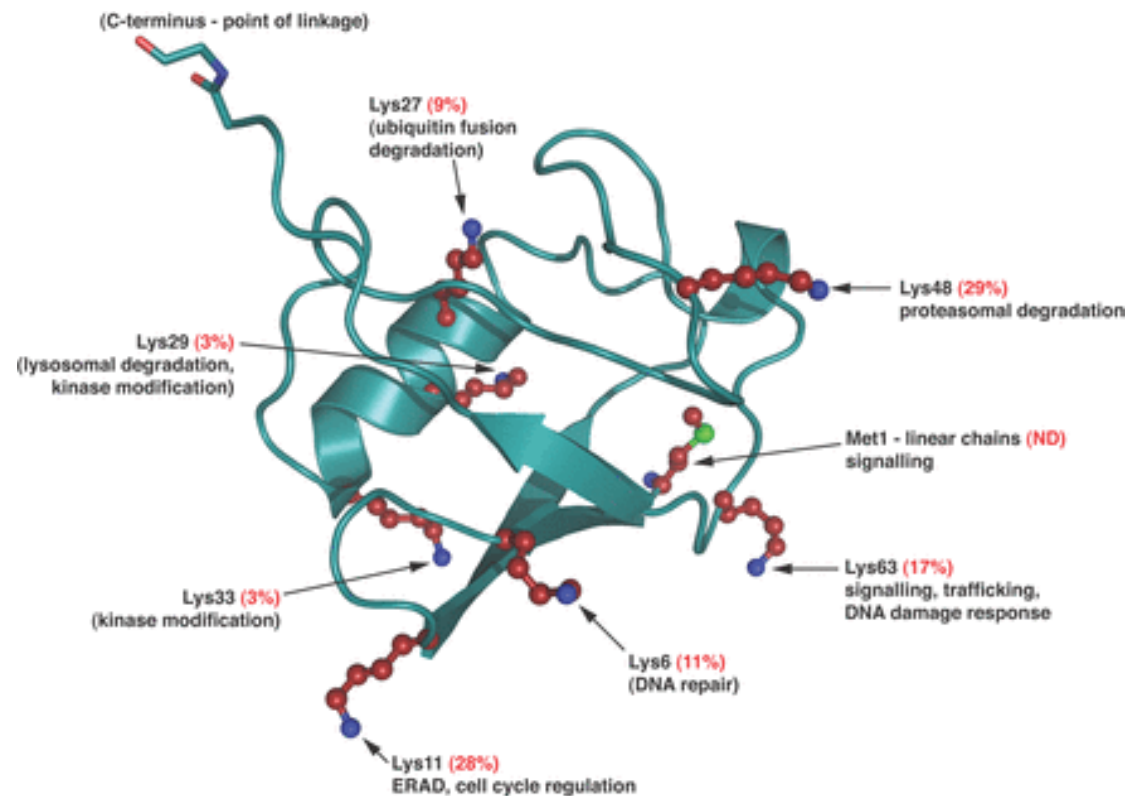


Figure 27 : Devenir des protéines ubiquitinées. Suivant la localisation de la conjugaison avec l'ubiquitine, les protéines s'engagent dans différents processus cellulaires. D'après Komander 2009.

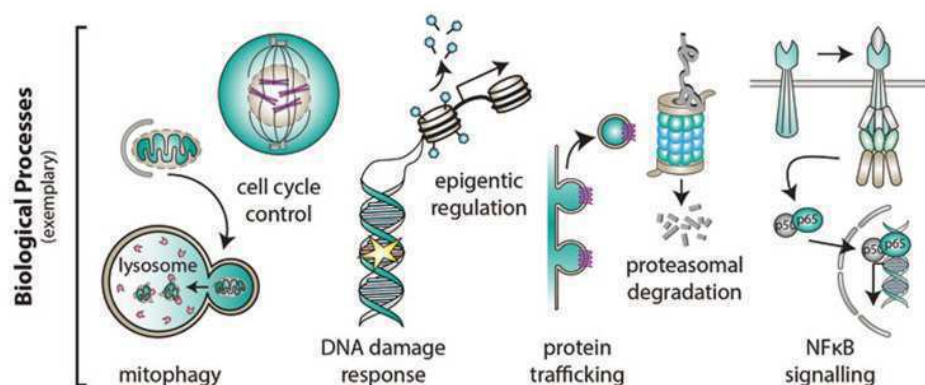


Figure 28 : Les différents processus cellulaires régulés par l'ubiquitination des protéines. D'après Swatek et Komander 2016.

2.9. Protéasome

Le système ubiquitine protéasome (ou UPS) est un système protéolytique très conservé chez les eucaryotes. La dégradation par l'UPS a lieu dans le cytoplasme ou dans le noyau et est ATP-dépendante. Le protéasome 26S est composé de deux sous-complexes : le sous-complexe 20S Core Particle (20S CP) qui est responsable de l'activité protéolytique et deux sous-complexe 19S Regulatory Particle (19S RP) qui entourent le 20S CP et le régule (Figure 29). Le 20S CP est constitué de 28 sous-unités assemblées en quatre anneaux de 7 sous-unités chacun. Ces quatre anneaux sont superposés formant ainsi un cylindre. Les deux anneaux externes sont formés par les sous-unités α tandis que les anneaux internes sont, eux, constitués de sous-unités β . L'activité catalytique de la protéase 20 CP est localisée au niveau des anneaux α avec une activité de type caspase (clivage après un résidu acide), une activité de type chymotrypsine (clivage après un résidu hydrophobe) et enfin une activité de type trypsine (clivage après un résidu basique). Le protéasome 19S est responsable de la reconnaissance des protéines ubiquitinées, il est capable de reconnaître les marqueurs de l'ubiquitine et de déplier les protéines afin de pouvoir les faire entrer dans le protéasome 20S. Une fois que la protéine pénètre dans la chambre protéolytique du protéasome 20S CP, les sous-unités catalytiques vont procéder à l'hydrolyse des liaisons peptidiques jusqu'à obtenir des peptides suffisamment petits (2 à 22 acides aminés) pour sortir.

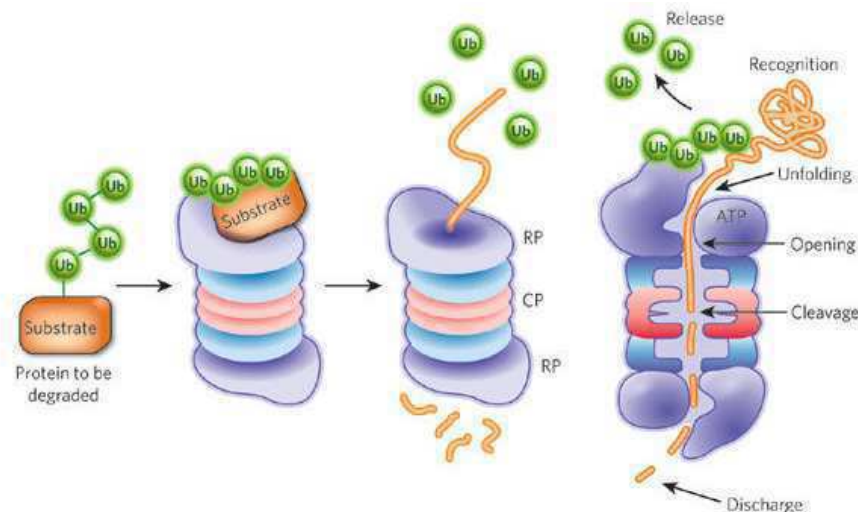


Figure 29 : Le système ubiquitine protéasome. Le protéasome 20S est un cylindre creux formé par 4 anneaux définissant une cavité interne composée de trois chambres. La chambre centrale est la plus grande et constitue le site d'hydrolyse des substrats. Les anneaux extérieurs sont composés de sous-unités 19S régulatrices (RP) dites de type α et sont identiques. Ils assurent l'association du 20S CP avec ses complexes régulateurs et contrôlent la pénétration des substrats dans la chambre de protéolyse par des mécanismes allostériques. Les deux anneaux internes sont eux aussi identiques entre eux et sont composés de sous-unités 20S CP dites de type β présentant de fortes homologies structurales. Ils portent les activités protéolytiques du protéasome. D'après Hochstrasser 2009.

3. Régulation du développement cortical par l'ubiquitination

3.1. Régulation de la neurogenèse par l'ubiquitination

Plusieurs études ont mis en lumière les différentes voies de signalisation et les différents mécanismes transcriptionnels et épigénétiques impliqués dans la régulation des progéniteurs et la neurogenèse telles que les voies Notch ou Wnt par exemple.

3.1.1 Signalisation Notch et ubiquitination

La voie la mieux caractérisée dans la neurogenèse est la voie Notch, cette signalisation a un rôle clé durant la neurogenèse du cerveau, de *C. elegans* aux vertébrés supérieurs.

Le gène *NOTCH* code pour un récepteur à domaine transmembranaire, qui est initialement synthétisé comme une seule protéine. Il est clivé en deux et se localise à la membrane plasmique sous forme d'hétérodimère. La signalisation Notch est activée lorsque le ligand Notch (Delta-like1, 3 ou 4 ou Jagged 1 ou 2 chez les mammifères) d'une cellule interagit avec le récepteur NOTCH (NOTCH1 à 4) d'une cellule adjacente. Cette interaction induit deux coupures protéolytiques successives, dans son domaine extracellulaire, médiée par les protéines ADAM (A Disintegrin et Metalloprotease) et au sein de son domaine transmembranaire par la γ -sécrétase. Ces clivages conduisent à un relargage du domaine intracellulaire (NICD : Notch IntraCellular Domain) au noyau. Ce domaine interagit alors avec la protéine CSL (CBF1, aussi appelé RBP-Jk chez les vertébrés) et forme un complexe avec des récepteurs transcriptionnels et des histones déacétylases (HDACs) favorisant ainsi l'inhibition de gènes cibles. Le NICD en se liant à ce complexe va détacher les co-répresseurs et recruter l'activateur transcriptionnel MAM. Cette activation va induire l'expression des gènes cibles tels que *HES* (Hairy Enhancer of Split) et *HERP/HEY* (Hes Related Protein) de la famille bHLH (basic helix-loop-helix) qui vont inhiber la neurogenèse en codant pour des répresseurs transcriptionnels. Ces gènes sont considérés comme anti-neuraux car leur inactivation entraîne une différenciation accélérée des cellules. Les protéines HES/HEY vont en effet inhiber la transcription de gènes pro-neuraux tels que *MASH1*, *ASC1* ou les Neurogénines (Dhanesh et al., 2016) empêchant ainsi les cellules d'initier leur processus de différenciation. Ce mécanisme d'action est appelé inhibition latérale et est essentiel au cours de la neurogenèse.

Deux types d'interaction ligand récepteur ont été décrits, l'un présente une interaction en trans entre deux cellules voisines et conduit à l'activation du récepteur ; l'autre quant à lui est une interaction en cis entre un récepteur et un ligand de la même cellule. Cette interaction en cis ne déclenche aucun signal Notch et on parle alors de cis-inhibition.

Le point de départ de la neurogenèse et la transition de CNE en CGR coïncide avec le début de l'expression de la signalisation Notch dans le télencéphale dorsal (avec l'expression de *DLL1* puis *HES1* et *HES5*) (Hatakeyama, 2004). Pour supporter l'idée que la voie Notch participait à la transition CNE/CGR, Gaiano et al ont montré qu'une activation prématurée de la voie entraînait une transition prématurée des CNE en CGR (Gaiano et al., 2000). A l'inverse une perturbation de la voie (via la délétion de *HES1*, *HES5* ou *RBPJ*) conduit à une apparition de neurones prématurée à E8.5.

La voie Notch a aussi été impliquée dans l'inhibition de la différenciation des CGR en PB (Mizutani et al., 2007; Ohata et al., 2011). Les cellules exprimant le ligand NOTCH suppriment l'activité pro-neurogénique des gènes tels que *ASC1* et les neurogénines dont *NGN2* et on retrouve une oscillation de l'expression de *HES1* et de *NGN2* qui s'autorégulent négativement et permettent ainsi la prolifération des CGR, tout en empêchant le maintien d'un haut niveau de *NGN2* et un faible niveau de *HES1* nécessaire à la différenciation (Shimojo et al., 2008). Les cellules gliales radiaires maintiennent donc leur potentiel prolifératif et ne se divisent pas en neurones ou progéniteurs intermédiaires.

La faculté de la voie Notch à exercer des fonctions opposées est possible par la régulation très fine qui existe dans les cellules via des mécanismes moléculaires et notamment grâce au système de dégradation des protéines via l'ubiquitination (Figure 30).

On peut séparer en deux groupes les E3 ubiquitine ligases impliquées dans la régulation de la voie Notch : d'une part celles qui ciblent le récepteur Notch et d'autre part celles qui ciblent le ligand de Notch.

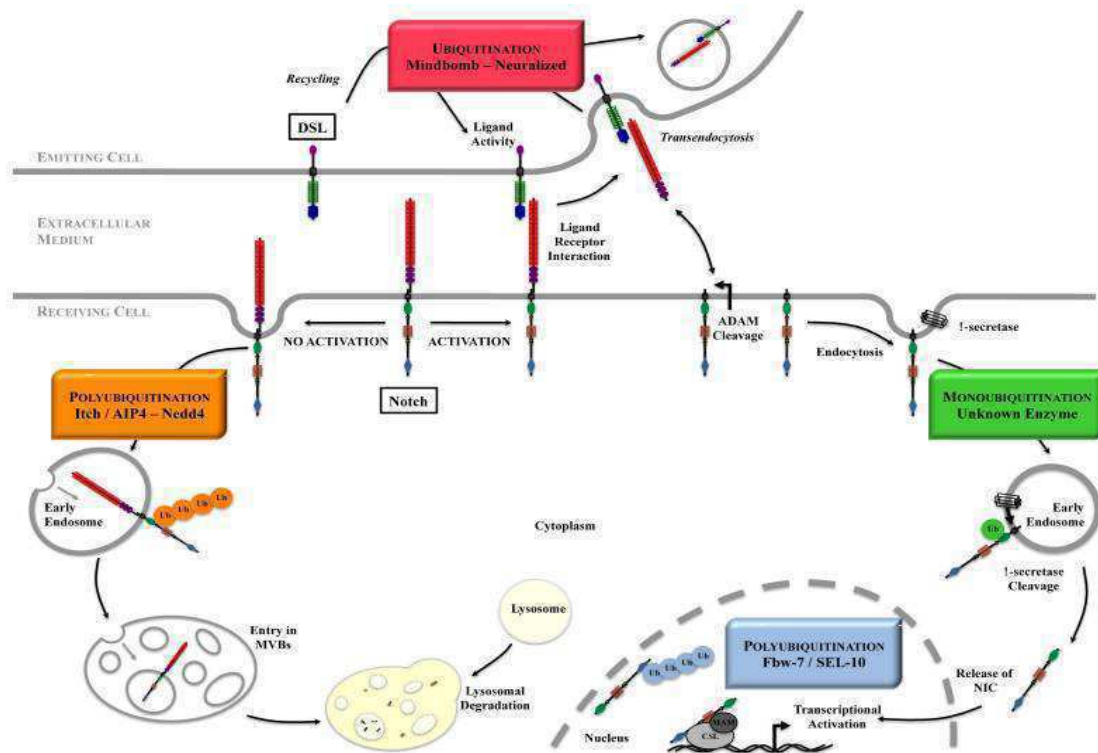


Figure 30 : La régulation de la voie de signalisation Notch par l'ubiquitination. D'après Moretti et Brou 2013.

3.1.1.1 Ubiquitination du récepteur NOTCH inactivé

3.1.1.1.1 *ITCH et Neural precursor cell Expressed Developmentally Down-regulated protein 4-1 (NEDD4-1)*

La protéine Itch et son orthologue humain AIP4 (Atrophin-1-Interacting Protein 4) ainsi que Nedd4-1 sont des E3 ubiquitine ligase à domaine HECT et font partie de la sous-famille des Nedd4 (Rotin et Kumar, 2009). Plusieurs études ont montré que ces protéines étaient impliquées dans la régulation de la voie Notch en polyubiquitinant le récepteur NOTCH inactif régulant ainsi son endocytose puis sa dégradation par le lysosome (Chastagner et al., 2008; Wilkin et al., 2004).

3.1.1.1.2 *Deltex (DX) et Suppressor of Deltex (SU(DX))*

D'autres E3 ligases ont été identifiées comme responsables de l'ubiquitination de Notch, régulant sa localisation et sa signalisation via l'endocytose du récepteur, il s'agit de l'E3 à domaine RING Deltex (Dx) (Matsuno et al., 1995) et de l'E3 à domaine HECT, Suppressor of Deltex (Su(Dx)). Elles ont principalement été impliquées dans le triage et la dégradation lysosomale des récepteurs NOTCH inactifs (Yamada et al., 2011).

3.1.1.1.3 Ubiquitin Specific Peptidase 12 (USP12)

Moretti et al (2012) ont mis en évidence une DUB dans la régulation de la voie Notch (Moretti et Brou, 2013). Cette protéine est recrutée par ITCH au récepteur NOTCH non activé et permet de déubiquitiner le récepteur avant son endocytose. L'inhibition d'USP12 conduit à une augmentation du récepteur NOTCH à la surface et donc à une augmentation de la signalisation Notch (Moretti et Brou, 2013).

3.1.1.2 Ubiquitination du récepteur Notch activé

3.1.1.2.1 F-box/WD repeat-containing protein 7 (FBW7)

La première étape d'ubiquitination lorsque la voie Notch est activée concerne la régulation de la stabilité du NICD, la forme nucléaire transcriptionnellement active de NOTCH, par FBW-7. Cette enzyme appartient à la famille des E3 ubiquitine ligases SCF (Skip1, Cul1, F-box). FBW-7 interagit avec la machinerie d'ubiquitination via son domaine F-box et reconnaît ses substrats via ses domaines répétés WD40. Le NICD contient des domaines PEST (riches en résidus proline, acide aspartique, sérine et thréonine) qui sont associés à des molécules à courte durée de vie. Il a été montré que le NICD est rapidement polyubiquitiné par l'E3 ubiquitine ligase FBW-7 (F-box et WD repeat domain-containing 7) et dégradé par le protéasome (Öberg et al., 2001; Wu et al., 2001). Des expériences cellulaires ont montré qu'une forme dominante négative de FBW-7 ne pouvait recruter le complexe SCF et ubiquitiner le NICD qui était alors stabilisé dans le noyau (Gupta-Rossi et al., 2001; Wu et al., 2001). Le KO conditionnel de *Fbw-7* chez les souris entraîne une prolifération excessive des cellules gliales et une augmentation de la différenciation en astrocyte au détriment des neurones (Matsumoto et al., 2011). La régulation du NICD est une étape critique de la régulation de la signalisation Notch, ce processus a déjà été impliqué dans plusieurs pathologies comme des leucémies ou différents types de cancers. Par ailleurs des études d'interactome ont montré que le NICD pouvaient interagir avec un nombre limité de DUB que sont USP7, 11 et 15, ce qui conduit à une régulation du NICD via sa stabilité ou son transport et donc à une régulation de la signalisation Notch (Zhang et al., 2012).

3.1.1.2.2 *Casitas B-lineage Lymphoma (C-CBL)*

c-Cbl est une E3 ubiquitine ligase à domaine RING qui est capable d'interagir avec le récepteur Notch activé, clivé par la métalloprotéase ADAM mais pas encore par la γ -sécrétase et donc encore ancrée à la membrane. C-Cbl est connue pour son rôle dans la multi-ubiquitination de l'EGFR activé, à son endocytose puis à sa dégradation par le lysosome (Shtiegman et Yarden, 2003; Sorkin et Goh, 2008). Jehn et al (2002) proposent un mécanisme similaire pour le récepteur Notch (Jehn et al., 2002).

3.1.1.2.3 *Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 Subunit F (EIF3F)*

EIF3F est une DUB qui cible le récepteur activé Notch avant le clivage par la γ -sécrétase. Des expériences de shRNA ciblant Eif3f montrent une accumulation de récepteurs NOTCH mono-ubiquitinés. EIF3F serait recruté par Deltex et participerait donc à la régulation positive de la voie Notch (Moretti et al., 2010).

3.1.1.3 Ubiquitination des ligands DSL

La liaison des ligands Notch aux récepteurs Notch permet d'initier la signalisation Notch. Néanmoins, de précédentes études ont montré que celle-ci n'était pas suffisante et qu'une étape d'endocytose des ligands était nécessaire à l'activation de la voie dans les cellules voisines (Hansson et al., 2010; Nichols et al., 2007; Overstreet et al., 2004; Parks et al., 2000; Wang, 2004). Deux mécanismes sont proposés pour expliquer le lien entre l'endocytose des ligands dans la cellule signalisatrice et l'activation du récepteur dans la cellule réceptrice. Le premier mécanisme est un modèle de mécanotransduction : l'endocytose du ligand serait nécessaire lors de l'interaction avec le récepteur NOTCH pour tirer sur celui-ci et induire son changement de conformation. Le deuxième modèle est un modèle de maturation : l'endocytose des ligands serait nécessaire en amont de l'interaction ligand-récepteur pour induire leur activation.

Tous les ligands DSL contiennent plusieurs lysines (à l'exception de Delta-like 3), ce qui fait d'eux de potentielles cibles des E3 ubiquitine ligases. Des études génétiques menées initialement chez la drosophile et le poisson-zèbre ont permis d'identifier deux E3 ubiquitines ligases, Neuralized (NEUR1) et Mind Bomb (MIB1), régulant la voie Notch en

ubiquitinant les ligands DELTA et JAGGED au niveau du système nerveux central (Itoh et al., 2003; Yeh et al., 2001) ce qui induit leur endocytose.

3.1.1.3.1 *Neuralized (NEUR1)*

Neuralized1 (NEUR1) est une E3 ubiquitine ligase à domaine RING. Elle est responsable de la mono-ubiquitination du ligand DELTA *in vitro* (Deblandre et al., 2001) ce qui conduit à son endocytose (Lai et Rubin, 2001; Pavlopoulos et al., 2001). Chez la drosophile cette protéine est nécessaire pour l'émission du signal et intervient donc dans le processus d'inhibition latérale (Lehmann et al., 1983). Elle intervient aussi dans le contrôle des divisions asymétriques en favorisant l'endocytose de DELTA dans les cellules pIIb ce qui conduit à l'activation de Notch dans les cellules pIIa (Le Borgne et Schweisguth, 2003). Néanmoins il a été montré chez les souris que la délétion de Neuralized1 et/ou Neuralized2 n'entraînent pas de létalité embryonnaire ni de phénotype neurogénique.

3.1.1.3.2 *Mind-bomb 1 (MIB1)*

Mind-bomb 1 (MIB1) est également une E3 ubiquitine ligase régulant la voie Notch en ubiquitinant le ligand DELTA entraînant son endocytose (Itoh et al., 2003).

Chez le poisson zèbre et chez la souris, l'élimination de Mib1 conduit à une différenciation prématurée en neurones et en progéniteurs intermédiaires (Yoon et al., 2008) comme chez les mutants où la voie Notch est défectueuse (Itoh et al., 2003) ce qui n'est pas le cas en l'absence de Neur1 (Koo et al., 2005). Kang et al ont, eux, montré qu'en plus d'une différenciation prématurée, les souris déficientes en Mib1 avaient une mauvaise spécification des neurones, une perturbation du développement des cellules gliales radiaires, des astrocytes et des oligodendrocytes comme chez les mutants défectifs pour la voie Notch (Kang et al., 2012). De plus l'introduction d'une forme mono-ubiquitinée du ligand DELTA a été montrée comme suffisante pour sauver le phénotype des souris KO pour *Mib1*. Le mécanisme d'inhibition latérale de la voie Notch est régulé par plusieurs cascades d'ubiquitination. Dans les cellules exprimant le ligand DELTA, la queue cytoplasmique du ligand est ubiquitinée par MIB1 qui déclenche l'endocytose du complexe DELTA/domaine extracellulaire du récepteur NOTCH. Suite à cela, NEUR1 va ubiquitiner le ligand DELTA endocyté et conduire à un endosome tardif.

De façon intéressante il a été montré que MIB1 était phosphorylé par la protéine kinase PAR1 et qu'elle entraînait sa dégradation (Ossipova et al., 2009). La protéine PAR1 est nécessaire pour la formation de la polarité apico-basale et est impliquée lors de la régulation division symétrique/asymétrique.

3.1.1.4 Ubiquitination des facteurs de transcription

3.1.1.4.1 *Tripartite Motif Containing 11 (TRIM11)*

Un large nombre de facteurs de transcription a été impliqué dans la prolifération des cellules progénitrices et donc le contrôle du nombre de cellules neuronales dans le cerveau en développement. Des défauts de division des progéniteurs ont par exemple été mis en évidence chez les souris mutantes pour Pax6 (Maekawa et al., 2005). PAX6 semble contrôler le cycle cellulaire dans les CGR et il a été montré que TRIM11, une E3 ubiquitine ligase intervenait dans les cellules progénitrices et participait à l'ubiquitination puis la dégradation de PAX6 (Tuoc et Stoykova, 2008). Il existe une boucle de régulation entre les deux protéines et une anomalie dans l'équilibre PAX6-TRIM11, comme une surexpression de PAX6 ou une diminution de TRIM11 par exemple conduit à une augmentation de l'apoptose (Tuoc et Stoykova, 2008). La diminution de PAX6 quant à elle, entraîne une inhibition de la neurogenèse. En effet, l'augmentation de TrIM11 conduit à une diminution de PAX6 qui va entraîner une sous-expression de NGN2 qui est aussi régulée par la voie Notch (Tuoc et Stoykova, 2008).

3.1.1.4.2 *BTB Domain Containing 6 (BTBD6)*

BTBD6 est membre de la famille PHR, cette protéine agit comme adaptateur de l'E3 ubiquitine ligase CUL3^{SCF} et cible le répresseur transcriptionnel PLZF (Sobieszczuk et al., 2010). BTBD6A bloque l'inhibition de la neurogenèse via PLZFA en induisant sa dégradation et donc en permettant l'expression de *NGN1*. Par ailleurs, il a été montré que l'expression de *BTBD6A* est induite par *NGN1*. Il existe donc une boucle de régulation permettant l'expression de *NGN1* ce qui permet de réguler la voie Notch. En effet, elle pourrait permettre l'oscillation des gènes tels que *HES1* et *HES5* dans les CGR qui sont des répresseurs des gènes neurogéniques (incluant les gènes de la famille NGN) (Sobieszczuk et al., 2010).

3.1.1.4.3 *HECT, UBA et WWE Domain Containing 1 (HUWE1)*

L'E3 ubiquitine ligase HUWE1 a elle aussi été impliquée dans la régulation négative de Notch via l'ubiquitination et la dégradation du facteur de transcription NMYC (Zhao et al., 2008). La famille Myc est composée de trois facteurs de transcription que sont LMYC, CMYC et NMYC, les deux derniers sont exprimés dans le cerveau en développement. Il a été montré que la perte de fonction de *NMYC* conduit à une sous-expression de ces gènes cibles dont la cycline D2 (*CCND2*) ainsi qu'une microcéphalie. Il a été montré que cette microcéphalie était due à une diminution de la mitose des progéniteurs neuronaux durant la neurogenèse associée à une différenciation neuronale précoce (Knoepfler et al., 2002).

Par ailleurs il a été montré que l'inhibition par ARN interférence de *HUWE1* conduisait à une augmentation de la prolifération des progéniteurs et à un blocage de la différenciation neuronale (Zhao et al., 2009). La même étude a montré que la perte de *HUWE1* permettait d'activer la voie Notch. En effet, les auteurs ont montré que NMYC induisait l'expression de *DLL3* et donc l'activation de Notch.

HUWE1 semble donc agir à deux niveaux sur la neurogenèse. D'un côté il permet le contrôle du cycle cellulaire via la régulation de *CCND2* et de l'autre participe à la régulation négative de la voie Notch via la régulation de NMYC.

3.1.1.4.4 *Tripartite Motif Containing 32 (TRIM32)*

Une étude a montré l'importance de l'E3 ubiquitine ligase Trim32 dans la neurogenèse. TRIM32 est une protéine exprimée dans les progéniteurs neuronaux qui est distribuée de façon asymétrique lors de la mitose (Schwamborn et al., 2009). Les cellules filles exprimant le moins TRIM32 se différencient davantage en neurones que les autres. Il a été montré que TRIM32 permettait l'ubiquitination puis la destruction du facteur CMYC. Il a été montré que CMYC était comme NMYC lui aussi très exprimé au cours du développement du cerveau et qu'il jouait un rôle important dans la prolifération des CNE. En effet, un haut niveau d'expression de CMYC est nécessaire pour le renouvellement des CNE et il a été montré qu'une surexpression de CMYC augmentait la prolifération des progéniteurs neuronaux dans le cortex (Schwamborn et al., 2009).

Par ailleurs, Schwamborn et al ont montré que TRIM32 était capable de se lier au complexe Argonaute et d'ainsi augmenter l'activité du microARN Let-7 permettant de promouvoir la différenciation (Schwamborn et al., 2009).

3.1.1.5 Ubiquitination de régulateurs de la voie Notch

3.1.1.5.1 *Mouse double minute 2 homolog (MDM2)*

Une autre E3 ubiquitine ligase de la famille RING est impliquée dans la régulation de la voie Notch, il s'agit de MDM2. Cette protéine conduit à l'ubiquitination et la dégradation de NUMB ce qui induit indirectement une augmentation de la signalisation Notch (Sczaniecka et al., 2012). En effet, NUMB agirait sur le récepteur NOTCH en provoquant son endocytose. Il a été montré que NUMB participait à la polarité apico-basale des progéniteurs neuronaux en se localisant au niveau du pôle apical. La protéine NUMB serait donc davantage présente dans la cellule fille apicale et agirait comme inhibiteur de la voie Notch ce qui favoriserait la différenciation des cellules. MDM2 agirait aussi de façon directe en ciblant le récepteur NOTCH1 ce qui permet d'activer la voie (Pettersson et al., 2013).

3.1.2 *Bone Morphogenetic Protein (BMP)*

La voie de signalisation BMP (Bone Morphogenetic Protein) a elle aussi été impliquée dans la neurogenèse. Par exemple, il a été montré que la perte de *Bmp7* conduisait à une diminution de la prolifération et de la survie des CGR (Segkilia et al., 2012) alors que sa surexpression conduisait à une différenciation prématurée des CGR (Ortega et Alcántara, 2010). De même, d'autres études ont montré que des progéniteurs corticaux en culture, traités avec du BMP, permettait d'induire la neurogenèse (Li et al., 1998; Mabie et al., 1999). Par ailleurs, il a été montré que les récepteurs et effecteurs de la voie, les protéines SMAD, sont finement régulées par l'ubiquitination et la dégradation (Inoue et Imamura, 2008). En effet, au cours de la neurogenèse, l'expression des facteurs de transcription proneuraux bHLH tel que MASH1 est diminuée par la signalisation BMP, ce qui conduit à une différenciation en progéniteurs neuronaux prématurée (Shou et al., 1999). De façon intéressante, l'équipe de Shou et al a montré qu'une inhibition pharmacologique du protéasome diminuait la dégradation induite par la voie BMP de MASH1. Néanmoins pour le moment l'E3 ubiquitine ligase impliquée dans la dégradation de ce facteur de transcription n'est pas connue.

3.1.3 *Modifications épigénétiques régulées par l'ubiquitination*

Des modifications épigénétiques peuvent aussi jouer un rôle clé dans la neurogenèse et la gliogenèse via la méthylation de l'ADN ou de modifications des histones via l'acétylation, la

méthylation ou l'ubiquitination. La méthylation de l'ADN ou des histones dans les régions promotrices inhibe la transcription des gènes proneuraux et gliaux et inversement la méthylation de régions non promotrices de gènes neurogéniques promeut la transcription des gènes (Wu et al., 2010). Les régions promotrices de la plupart des gènes gliaux sont hyperméthylés dans les CGR et associés à la protéine MECP2 avant l'entrée dans la phase de gliogenèse puis ils sont déméthylés pour la dissociation de MECP2 et la différenciation en astrocytes. Deux E3 ubiquitine ligases ont été impliquées dans le contrôle épigénétique de la neurogenèse et de la gliogenèse : le complexe SCF associé au β -TRCP qui cible REST (Westbrook et al., 2008) et RING2 qui ubiquitine l'histone H2A (Wang et al., 2004). En effet, REST est une protéine impliquée durant la neurogenèse et régulée par l'ubiquitination. Il a été montré que celle-ci était susceptible de réguler la prolifération en inhibant l'expression prématurée des gènes neuronaux dans les CGR (Gao et al., 2011). REST est très exprimée dans les progéniteurs neuronaux (Armisen et al., 2002; Olguin, 2006; Palm et al., 1998). Une fois différenciées en neurones, l'expression est diminuée (Ballas et al., 2005) et la protéine est dégradée par l'ubiquitine ligase RING SCF^{TRCP} qui ont une expression augmentée durant la transition CGR en neurones (Westbrook et al., 2008). De plus, il a été montré qu'une diminution de FBXW1, qui participe à la dégradation de REST, conduit à une diminution du nombre de neurones (Westbrook et al., 2008).

Dans le cas de RING2, il y a formation d'un complexe Polycomb (PcG) qui permet la répression de l'expression de gènes en modifiant les histones, soit en les triméthylant, soit en les ubiquitinant. Parmi les trois classes de complexes PcG (PhoRC, PRC1 et PRC2) seul le complexe PRC1 peut interagir avec RING2 et permettre la monoubiquitination de l'histone H2A et inhiber l'expression des gènes cibles pro-neuronaux. Dans des cellules neuronales, l'absence de RING2 provoque une surexpression de NGN1 ce qui conduit à un allongement de la phase neurogénique ainsi qu'un retard de la gliogenèse (Cao et al., 2011; Matthew Corley et Kroll, 2015). Le même phénotype est observable chez des souris déficientes en *Ring2* (Román-Trufero et al., 2009).

3.2. Régulation de la migration neuronale par l'ubiquitination

Le niveau d'expression de DAB1 est contrôlé par le système ubiquitine-protéasome. En effet, après phosphorylation par FYN et SRC, DAB1 peut être ubiquitiné par un complexe E3 ubiquitine ligase contenant CUL5. Des expériences d'ARN interférence contre *Cul5*

conduisent à une surexpression de DAB1 et à un mauvais positionnement des neurones dû à un excès de migration (Feng et al., 2007). Le même phénotype est observé chez les mutants où DAB1 est surexprimé ce qui indique bien que la dégradation de DAB1 est nécessaire durant la migration dépendante de la Reelin (Simo et al., 2010). Les mêmes auteurs ont ensuite montré que chez les souris KO conditionnelle pour *Rbx2* (une sous unité du complexe Cul5 E3) présentent un défaut de positionnement de neurones qui est partiellement sauvé par une diminution de l'expression de DAB1 ce qui suggère que la seule phosphorylation de DAB1 ne permet pas de réprimer la signalisation Reelin (Simó et Cooper, 2013). La protéine CUL5 a aussi été impliquée dans les scléroses tubéreuses complexes associées à des mutations dans *TSC2*. En effet, cette anomalie neurodéveloppementale est associée à des défauts de positionnement neuronal dus à une sous-expression de *TSC2* dans les neurones. Cette sous-expression est associée, chez le modèle souris, à une surexpression de CUL5. Des traitements à la rapamycine, un inhibiteur de la voie mTORC1, conduit à une diminution de l'expression de CUL5 associée à un sauvetage du défaut de positionnement des neurones. (Moon et al., 2015). CUL5 serait donc un acteur de la régulation Reelin-Dab1 mais aussi de la voie mTOR.

3.3. Régulation de la neuritogenèse par l'ubiquitination

La neuritogenèse est d'une importance cruciale lors de la formation d'un réseau neuronal fonctionnel, elle est notamment dépendante des protéines du cytosquelette et des protéines d'adhésion.

Les axones des neurones commissuraux, par exemple, doivent traverser la ligne médiane pour interagir avec les neurones de l'autre hémisphère. Ce guidage se fait par des mécanismes d'attraction et répulsion. Le récepteur DCC à la netrin-1 attire les axones au niveau de la ligne médiane, tandis que les récepteurs UNC5, SLIT, ROBO et SEMA3A-PLEXA permettent de repousser l'axone. L'inhibition du système ubiquitine-protéasome conduit à l'effondrement du cône de croissance axonale induite par la netrin-1 ce qui montre que la stimulation des cônes de croissance par la netrin-1 augmente l'ubiquitination et la dégradation des protéines, notamment celle de DCC, le récepteur à la netrin-1 (Kim et al., 2005).

Il a aussi été montré que la localisation de ROBO, un récepteur participant aux mécanismes de répulsion, était notamment dépendante de NEDD4. En effet, NEDD4 se lierait et

ubiquitinerait Commissureless, et cette ubiquitination servirait de signal d'endocytose pour ROBO (Myat et al., 2002).

Une autre étude montre l'implication d'USP33 (ubiquitin carboxyl terminal hydrolase 33) dans la régulation de ROBO. L'expression de ROBO est diminuée en l'absence d'USP33 ce qui empêche les axones de traverser la ligne médiane. USP33 permettrait la déubiquitination de ROBO ce qui empêcherait son endocytose et sa dégradation (Yuasa-Kawada et al., 2009).

3.3.1 Neural precursor cell Expressed Developmentally Down-regulated protein 4-1 (NEDD4-1), SMAD Specific E3 Ubiquitin Protein Ligase 1 (SMURF1) et SMAD Specific E3 Ubiquitin Protein Ligase 2 (SMURF2)

Comme mentionné précédemment, la voie des RhoGTPases est importante dans la formation des axones et des dendrites. RHOA permet la rétractation des neurites en agissant sur les fibres de stress et en régulant la protéine CDC42 qui est cruciale dans le développement de l'axone (Schwamborn et Püschel, 2004). RAP1B (RAS-subfamily GTPase RAS-related protein 1B) participe, elle, à la sélection du neurite qui deviendra axone en recrutant CDC42 au niveau du neurite, tandis que RAP2 permet la rétractation des autres neurites (Bryan et al., 2005). De nombreuses études ont montré que l'ubiquitination régulait l'expression des RhoGTPases (Bryan et al., 2005; Wang et al., 2003). Les formes inactives liées au GDP de RHOA et RAP1B sont notamment polyubiquitinées respectivement par SMURF1 et SMURF2 et ensuite dégradées par le protéasome (Figure 31) (Bryan et al., 2005; Wang et al., 2003). Cette dégradation conduit à une sous-expression du niveau total de GTPase. Il a été montré que RAP2 était mono-ubiquitiné ou di-ubiquitiné sur la Lys63 par NEDD4-1 (Kawabe et al., 2010). Cette ubiquitination n'entraîne pas de dégradation mais affecte la capacité de RAP2 à interagir avec ses protéines cibles, notamment TRAF2 et TNIK qui promeuvent la rétractation des neurites. La perte de NEDD4-1 entraîne donc une diminution de la croissance des neurites, due à une augmentation de RAP2 (Kawabe et al., 2010). Par ailleurs, des expériences de morpholinos chez le xénope a montré que NEDD4-1 contrôlerait davantage l'arborisation axonale via la dégradation de PTEN que la croissance des dendrites ce qui n'a pas été observé chez la souris (Drinjakovic et al., 2010). Il semble que la localisation et l'activité des trois E3 ubiquitine ligase, SMURF1, SMURF2 et Nedd4-1, soient régulées par la phosphorylation dépendante de BDNF et PKA (Cheng et al., 2011). Par exemple, il a été montré que SMURF1 était enrichi au niveau de l'extrémité axonale, conduisant ainsi à une dégradation de RHOA localement ce qui serait essentiel au

développement de l'axone (Bryan et al., 2005). Il semble qu'en plus de réguler la croissance axonale l'expression de SMURF1 soit elle aussi régulée par l'ubiquitination par le complexe APC-CDH1 (Wan et al., 2011).

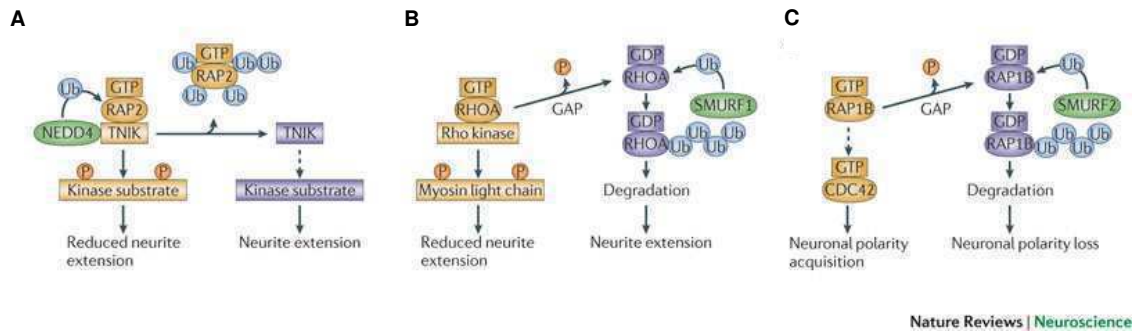


Figure 31 : Plusieurs petites RhoGTPases sont ubiquitinées durant la neuritogenèse par Nedd4, SMURF1 ou SMURF2, ce qui régule la neuritogenèse. A- Fonctionnement de Nedd4-1 durant le développement des neurites. Nedd4-1 mono-ubiquitine la forme active de RAP2. Lorsqu'il y a formation du complexe RAP2/TNIK (NCK-interacting protein kinase) on observe une diminution de la croissance des neurites alors qu'en présence de NEDD4-1, la mono-ubiquitination de RAP2 inhibe la formation du complexe ce qui conduit à une augmentation de la croissance des neurites. B- Fonctionnement de SMURF1 durant le développement des neurites. RHOA-GTP active un membre de la famille des RHO-kinases qui permet de réduire l'extension des neurites via la phosphorylation des chaînes légères de myosine. Après inactivation de RHOA par la protéine GAP, RHOA peut être polyubiquitiné par SMURF1 puis dégradé par le protéasome ce qui conduit à l'extension des neurites. C- Fonctionnement de SMURF2 durant le développement des neurites. Les protéines RAP1B actives sont enrichies au niveau de l'extrémité du neurite où elles activent indirectement d'autres RHO-GTPases comme CDC42 (cell division cycle 42) ce qui leur permet de polariser la cellule. Les protéines RAP1B sont inactivées par la polyubiquitination de SMURF2 puis dégradées ce qui induit une perte de la polarité du neurone (ce qui peut conduire à un échec de génération d'un axone). D'après Kawabe et Brose 2011.

3.3.2 Adenomatous Polyposis Coli (APC)

Une autre E3 ubiquitine ligase est impliquée dans la croissance des neurites, il s'agit d'APC, une E3 à domaine RING. APC fait partie d'un complexe formé d'au moins treize protéines et utilisant notamment CDH1 ou CDC20 pour reconnaître les substrats, les substrats dépendant des protéines adaptatrices du complexe.

Il a été montré notamment qu'une sous-expression de CDH1 ou une inhibition d'APC conduisent à une croissance axonale augmentée (Konishi et al., 2004). En effet, il a été montré qu'APC (Adenomatous Polyposis coli) se lie à l'extrémité + des microtubules et les stabilise. APC est un effecteur de la glycogène Synthétase kinase 3 β (GSK-3 β) qui est très enrichi dans le futur axone (Shi et al., 2004). La phosphorylation d'APC par GSK-3 β l'empêche de se lier aux microtubules et l'inhibition de GSK-3 β conduit à une accumulation d'APC dans les neurites (Shi et al., 2004). De plus, l'expression de formes tronquées d'APC

est suffisante à l'inhibition de la formation d'axones et à leur élongation (Purro et al., 2008; Shi et al., 2004; Zhou et al., 2004). Par ailleurs, APC et GSK-3 β permettent aussi la régulation de Par3, protéine essentielle à la polarité cellulaire et de protéines associées aux microtubules que sont MAP1B (Gonzalez-Billault et al., 2004) et Tau (Sperber et al., 1995).

Le complexe APC-CDH1 participe à l'ubiquitination et la dégradation d'au moins deux facteurs de transcription que sont ID2 et SNON (Lasorella et al., 2006). ID2 semble réprimer les facteurs de transcription bHLH comme E47 qui permet d'arrêter la croissance axonale. SNON de son côté augmente la transcription de CDH1, un régulateur positif de la croissance axonale agissant dans la signalisation JNK (Puram et al., 2010). CDH1 agirait donc en tant qu'inhibiteur de l'allongement des axones, tandis que CDC20 participerait à l'extension des dendrites bien que les facteurs mis en jeu ne soient pas encore identifiés.

3.3.3 HECT, UBA et WWE Domain Containing 1 (HUWE1)

En plus de son action durant la neurogenèse avec la régulation de Notch, HUWE1 agit sur la voie Wnt durant la neuritogenèse et a été montré comme régulateur de la morphologie de l'arborisation axonale. En effet, la surexpression de HUWE1 conduit à une augmentation du nombre de terminaison axonale et une diminution de DSH, une molécule requise dans la voie de signalisation Wnt. HUWE1 ciblerait directement DSH et conduirait à la polyubiquitination sur Lys63 qui serait indispensable à la transduction du signal (Vandewalle et al., 2013).

Par ailleurs, il a été montré que NEDD41 et ITCH pouvaient polyubiquitiner DSH et conduire à sa dégradation par le protéasome (Wei et al., 2012).

3.3.4 Autres E3 ubiquitine ligases impliquées dans la croissance axonale

D'autres E3 ubiquitine ligases permettent la régulation de la croissance axonale, parmi elles, KLHL20, qui fait partie du complexe SKP-Cullin-F-Box et qui permet la dégradation de RhoGEF (Kawabe et Brose, 2011) ou encore RNF6 qui dégrade LIMK1, un régulateur positif de la croissance axonale (Kawabe et Brose, 2011).

3.4. Régulation de la synaptogenèse par l'ubiquitination

Il a été montré que chez la drosophile, la déubiquitinase fat facets (Faf) permet la régulation de la taille et l'efficacité des synapses (Diantonio et al., 2001). La surexpression de Faf conduit à une augmentation du nombre de synapses et à une transmission synaptique altérée. Afin d'identifier les autres molécules de cette voie, DiAntonio et al ont mis en évidence que la protéine Highwire, une E3 ubiquitine ligase à domaine RING était impliquée dans la régulation négative de la croissance synaptique (Diantonio et al., 2001). De plus, le phénotype de perte de fonction de Highwire est identique au phénotype gain de fonction de Faf.

Par ailleurs, l'inhibition du protéasome (qu'elle soit génétique ou grâce à des inhibiteurs pharmacologiques) conduit à une augmentation de l'expression de DUNC-13, une protéine qui contrôle les synapses en régulant la formation des vésicules (DiAntonio et Hicke, 2004).

Il a aussi été montré que la syntaxine, qui a un rôle clé dans la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique, était ubiquitinée par une E3 ubiquitine ligase à domaine RING : Staring, entraînant sa dégradation (Chin et al., 2002).

4. Malformations du développement cortical

Le développement du cortex est un processus complexe et finement régulé. La moindre altération d'une des étapes moléculaires ou cellulaires du processus peut conduire à des malformations variées souvent détectables par imagerie par résonance magnétique cérébrale (IRM). Ces malformations du développement cortical (MDC) sont une cause majeure de déficience intellectuelle (DI), d'un retard des acquisitions et d'épilepsie pharmaco-résistante. Différentes classifications ont été proposées, suivant les caractéristiques génétiques, neuro-anatomiques ou encore physiopathologiques (suivant l'étape du développement du cerveau altérée). Néanmoins, aucune de ces classifications n'est en réalité idéale car il existe une très grande hétérogénéité des MDC. Certains gènes sont en effet responsables de différentes malformations comme WDR62 qui a été montré comme responsable de microcéphalie, de pachygyrie ou encore d'une hypoplasie du corps calleux (Bilgüvar et al., 2010) (Tableau 1).

Les avancées technologiques et notamment le développement des techniques de séquençage haut-débit (NGS ou Next Generation Sequencing) de ces vingt dernières années ont permis d'accélérer de façon exponentielle la découverte des gènes responsables des MDC. Parmi les gènes identifiés mon laboratoire a participé à l'identification de nombreux gènes et parmi eux de nombreux gènes codant pour des tubulines ou des protéines associées. Dans cette introduction, nous allons aborder les différentes MDC selon la caractéristique principale de la malformation : des anomalies de la prolifération ou de l'apoptose ; ou des anomalies de la migration neuronale (Figure 32).

Malformation								
Microcephaly ¹	ASPM ²	CDK5RAP2	MCPH1	CENPJ	WDR62 ²	STIL	CEP152	CEP63
MSGP ¹	WDR62 ²	NDE1	TUBB3 ²	ASPM ²	KIF5C ²			
Syndrome including microcephaly (e.g., complex MCD ³ or associated with PMG ⁴)	TBR2	CENPE	DYNC1H1	TUBG1	KIF2A	KIF5C ²	PLK4	
Periventricular heterotopia	FLNA	ARFGEF2	C6orf70	FAT4	DCHS1			
Lissencephaly (type I)	LIS1	DCX	TUBA1A	TUBB3 ²	RELN			
PMG ⁴	TUBB2B	GPR56	TUBA8	TUBB3 ²	TUBA1 ² A	WDR62 ²	NHEJ1	KBP
Lissencephaly (type II)	FKTN	POMT1	POMT2	POMGNT1	FKRP	LARGE	LAMB1	
Atypical heterotopia ⁵	EML1							

¹All genes code for proteins with centrosomal-related activities, MSGP, microcephaly with simplified gyral pattern; ²Some genes appear in multiple categories depending on the patient and gene mutation; ³Complex malformation of cortical development (MCD) associated with microcephaly; ⁴PMG, Polymicrogyria; ⁵Associated with macrocephaly and sometimes hydrocephaly.

Tableau 1 : Les principaux gènes impliqués dans les malformations corticales. D'après Bizzotto et Francis, 2015.

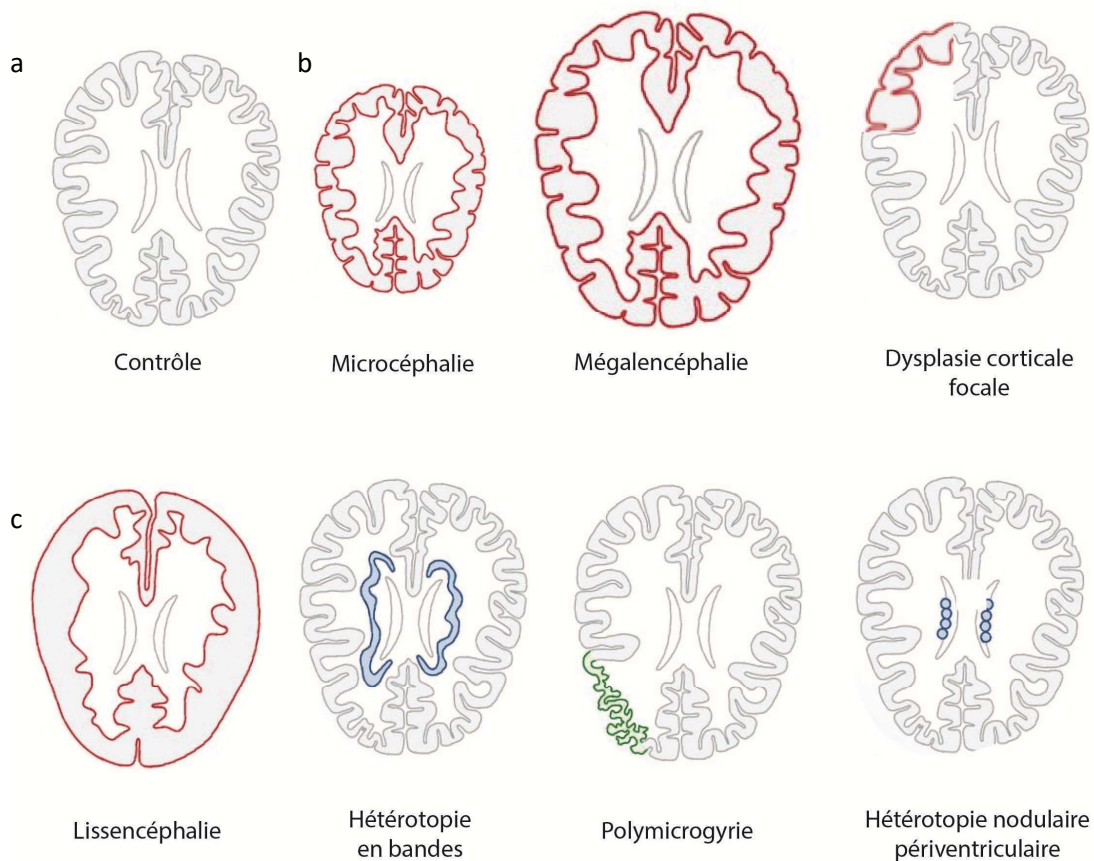


Figure 32 : Les différentes malformations du développement cortical comparé à un cerveau contrôle (a), elles sont associées soit à des anomalies de la prolifération ou de l'apoptose (b), soit à un défaut de la migration neuronale (c). Adapté de Fernández et al., 2016.

4.1. Phénotypes associés aux malformations du développement corticales

La plupart de ses malformations corticales sont associées à différents symptômes, notamment une déficience intellectuelle (DI) qui peut être plus ou moins sévère, une épilepsie et/ou un retard des acquisitions. La DI se définit par un quotient intellectuel inférieur à 70. Elle constitue un enjeu de santé publique majeure par sa complexité mais aussi son incidence (on l'estime entre 2% et 3% de la population). On estime que les causes génétiques sont responsables d'environ 25% cas. Les différentes malformations peuvent aussi causer une épilepsie qui est très souvent pharmaco-résistante et dont le seul traitement est chirurgical (si c'est possible). Un retard des acquisitions peut aussi être observé (langage et marche par exemple).

4.2. Malformations liées à des anomalies de la prolifération ou de l'apoptose

4.2.1 Microcéphalies

La microcéphalie congénitale est une malformation définie par un périmètre crânien réduit d'au moins 2 écart-types par rapport à la mesure moyenne. La plupart des gènes responsables de microcéphalies affectent des processus intervenant durant la neurogenèse (Tableau 2).

Processus mis en jeu	Gènes impliqués	Références
Régulation de la transcription	<i>MCPH1, CENPJ, CDK5RAP2</i>	Thornton et Woods, 2009
Régulation du cycle cellulaire	<i>MCPH1, CENPJ, CDK5RAP2</i>	Thornton et Woods, 2009
Maturation du centrosome	<i>CDK5RAP2, CENPJ</i>	Thornton et Woods, 2009
Liaison à la dynéine et duplication du centrosome	<i>NDE1</i>	Alkuraya et al., 2011; Bakircioglu et al., 2011
Réparation de l'ADN	<i>MCPH1</i>	Thornton et Woods, 2009
Prolifération des progéniteurs	<i>ASPM, STIL</i>	Desir et al., 2008; Kumar et al., 2008; Passemard et al., 2009
Formation du fuseau mitotique	<i>WDR62, NDE1</i>	Bilgüvar et al., 2010; Feng et Walsh, 2004; Yu et al., 2010
Déficit de la réparation de l'ADN	<i>PNKP, PCNT</i>	Griffith et al., 2008; Shen et al., 2010

Tableau 2 : Les principaux gènes impliqués dans les microcéphalies affectent des processus intervenant dans la neurogenèse.

Les mutations dans ces gènes provoquent souvent des anomalies de durée du cycle cellulaire, d'orientation du fuseau mitotique ou de réparation de l'ADN. Ces anomalies conduisent à une diminution de la prolifération et de la production de neurones matures (Alcantara et O'Driscoll, 2014; Thornton et Woods, 2009). Par ailleurs, d'autres gènes seraient davantage responsables d'une augmentation de la mort cellulaire par apoptose durant la neurogenèse ce qui conduit à une diminution du pool de progéniteurs et donc là encore à une diminution du nombre de neurones matures.

4.2.2 *Mégalencéphalies*

La mégalencéphalie est définie par une augmentation de la taille du cerveau d'au moins 2 écart-types. A l'inverse de la microcéphalie, on retrouve en général une apoptose diminuée et une production excessive de progéniteurs. Les bases moléculaires sont encore assez peu connues car les mégalencéphalies sont fréquemment associées à d'autres malformations. Par exemple, une mégalencéphalie est retrouvée chez plus de 6% de patients atteints de polymicrogyrie (Leventer et al., 2010). Ce syndrome est appelé macrocéphalie, polymicrogyrie, polydactylie, hydrocéphalie (ou MPPH) (Mirzaa et al., 2004). De même, il existe la macrocéphalie-cutis marmorata telangiectatica congenita (M-CMTC) ou encore le syndrome mégalencéphalie –malformation capillaire-polymicrogyrie (MCAP). La mégalencéphalie peut aussi toucher un seul hémisphère du cerveau, on parle alors d'hémimégalencéphalie. Les mécanismes conduisant à une hémimégalencéphalie sont encore mal connus et on suppose un excès de prolifération neuronale associé à des troubles de migration ou de différenciation.

4.2.3 *Dysplasies corticales focales*

Les dysplasies corticales focales (DCF) sont caractérisées par une perte de la lamination corticale avec une présence de neurones géants dysmorphiques et de cellules ballonisées dans le cortex et la substance blanche. Certains patients atteints de DCF présentent une augmentation des récepteurs du glutamate et une diminution des récepteurs du GABA (Aronica et al., 2003; Cepeda et al., 2011; Crino et al., 2001). La Sclérose Tubéreuse de Bourneville est l'une des formes de DCF principales, dont la principale cause moléculaire identifiée à ce jour est liée à une activation de la voie mTOR avec des mutations dans TSC1/TSC2 conduisant à une augmentation de la prolifération cellulaire ainsi qu'une production de cellules anormales (Mizuguchi et al., 2000).

4.3. *Malformations liées à des anomalies de la migration*

4.3.1 *Lissencéphalies et hétérotopies en bandes*

La lissencéphalie se caractérise par une diminution ou une absence de gyrus à la surface du cortex associée à une désorganisation des couches du cortex. Il existe différents types de lissencéphalies, on distingue les lissencéphalies dites classiques (ou de type I) aux lissencéphalies Cobblestone (ou de type II). Dans le cas des lissencéphalies classiques, il

existe un large spectre allant de l'agyrie (absence complète de circonvolutions) ou la pachygyrie (diminution du nombre de gyri), jusqu'à l'hétérotopie sous-corticale en bande. L'origine de ces malformations serait liée à un retard de la migration neuronale.

Plusieurs gènes ont d'ores et déjà été impliqués dans les lissencéphalies classiques, les principaux étant *LIS1* qui seraient responsables de 60% des cas (Pilz et al., 1999; Reiner et al., 1993). Par ailleurs, d'autres gènes ont été impliqués dans des lissencéphalies associées notamment à une agénésie du corps calleux parmi eux *TUBA1A* (Poirier et al., 2007) qui serait responsable de 1 à 4% des cas de lissencéphalie ou encore *DCX*, *KIF2A*, *TUBG1* et *DYNC1H1* (Poirier et al., 2013). Ces derniers gènes tendent à montrer l'importance des microtubules au cours du développement notamment durant la migration neuronale.

Les lissencéphalies de type II se caractérisent par une surface cérébrale bosselée ou granuleuse avec un effacement des sillons plus ou moins important. Elle est associée à des troubles de la myélinisation de la substance blanche, une dilatation des ventricules cérébraux ainsi qu'à une hypoplasie du vermis cérébelleux et du tronc cérébral. Parmi les principaux gènes impliqués, on retrouve *POMT1*, *FKTN* et *RELN*.

Les hétérotopies sous-corticales en bandes (aussi appelées double cortex) sont, elles, caractérisées par une bande de substance grise au sein de la substance blanche. Les mutations dans le gène *DCX* sont la principale cause de cette malformation (Pilz et al., 1999).

4.3.2 Polymicrogyries

Les polymicrogyries (ou PMG) sont caractérisées par un nombre excessif de circonvolutions à la surface du cortex associé à une anomalie de la lamination corticale. Il existe plusieurs types de PMG, les PMG diffuses, focales ou multifocales. Ces dernières peuvent être unilatérales, bilatérales symétriques ou asymétriques. Les causes génétiques sont encore difficiles à mettre en évidence car les PMG sont, en général, associées à d'autres malformations en particulier une microcéphalie. Des études histologiques ont montré que les patients atteints de PMG présentaient une perte de neurones dans les couches profondes du cortex, ces anomalies de positionnement résulteraient d'un défaut de migration neuronale (Jaglin et Chelly, 2009). La plus fréquente des PMG est péri-sylvienne et il a été montré que des mutations dans le gène *PIK3R2*, un composant de la voie PI3K-AKT-mTOR serait responsable d'environ 15% des cas (Mirzaa et al., 2015).

Quelquefois les PMG peuvent être associées à des fentes linéaires qui peuvent s'étendre dans les deux hémisphères du cerveau (schizencéphalie). C'est le cas de mutations dans *GPR56* chez des patients atteints d'une PMG bilatérale fronto-pariétale (Piao et al., 2004). Une mutation dans le gène *EMX2* codant pour un facteur de transcription à homéodomaine intervenant dans la migration neuronale a été mise en évidence dans des formes familiales et sporadiques de schizencéphalie (Brunelli et al., 1996; Granata et al., 1997), mais des travaux récents remettent en cause ce diagnostic (Merello et al., 2008; Tietjen et al., 2005).

4.3.3 Hétérotopies

Il existe trois types d'hétérotopies : les hétérotopies nodulaires périventriculaires (HNP), sous-corticales et leptoméningiale. La forme la plus fréquente est l'HNP qui est caractérisée par la présence de neurones localisés le long des ventricules latéraux au sein de la substance blanche. Elle est due à un défaut de migration neuronale (Barkovich et al., 2012; Guerrini et Dobyns, 2014) et le cortex peut aussi présenter une organisation anormale. Les hétérotopies sont souvent associées à d'autres malformations ce qui complexifie l'identification des bases moléculaires mises en jeu (Parrini et al., 2006). Néanmoins un gène a été identifié dans les HNP, il s'agit de la filamine A (*FLNA*) (Fox et al., 1998). *FLNA* code pour une protéine se liant à l'actine qui permet la stabilisation du cytosquelette d'actine et contribue à l'adhésion cellulaire le long de l'épithélium ventriculaire (Fox et al., 1998). *FLNA* semble nécessaire à l'attachement des neurones aux cellules gliales avant leur migration à partir de la zone ventriculaire (Lu et al., 2006). *FLNA* a aussi été montré comme régulateur du trafic endosomal en s'associant à l'appareil de Golgi (Ikonen et al., 1997). A partir de ces observations, Ferland et al ont émis l'hypothèse qu'une dérégulation du trafic vésiculaire pourrait être à l'origine des HNP en jouant sur l'adhésion cellulaire au niveau du neuroépithélium (Ferland et al., 2009). Cette hypothèse a été étayée par une autre étude montrant que la sous expression de la *FLNA* dans le cerveau du rat en développement conduisait à une anomalie de l'organisation de la glie radiaire ainsi qu'à une mauvaise orientation des neurones dans la zone intermédiaire (Carabalona et al., 2012). Deux autres causes génétiques ont été impliquées dans les HNP, il s'agit de mutations dans le gène *ARFGEF2* (ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 2) qui participe au trafic vésiculaire et membranaire (Sheen et al., 2004); ou encore d'un réarrangement chromosomique avec une délétion en 6q27 (incluant notamment le gène *C6orf70*) (Conti et al., 2013).

5. Ubiquitination et malformations neurodéveloppementales

Depuis quelques années et grâce aux différentes techniques de séquençage haut-débit (NGS), de plus en plus de mutations dans des gènes codant pour des protéines associées au processus d'ubiquitination ont été identifiées dans des maladies neurodéveloppementales. Parmi elles, de nombreuses E3 ubiquitine ligases, quelques déubiquitinases et une enzyme de conjugaison (E2).

5.1. Les E3 ubiquitine ligases à domaine RING

5.1.1 *Midline-1 (MID1)*

MID1 (Midline) est un gène localisé sur le chromosome Xp22.2, des mutations dans ce gène ont été mises en évidence chez des patients atteints du syndrome d'Opitz G/BBB. Ce syndrome est caractérisé par des malformations de la ligne médiane dont un hypertélorisme, un hypospadias et des malformations laryngo-trachéo-oesophagiennes (ou LTO) (Quaderi et al., 1997; Trockenbacher et al., 2001). En plus de ces malformations, les patients souffrent généralement d'anomalies uro-génitales, d'une déficience cardiaque et de malformations au niveau du cerveau (agénésie du corps calleux, agénésie du vermis cérébelleux ou encore hypoplasie). Par ailleurs, environ 30% des patients présentent une déficience intellectuelle et/ou un retard développemental. *MID1* code pour une E3 ubiquitine ligase qui fait partie de la famille des protéines TRIM (Tripartite motif) qui présentent toutes un domaine RING-finger, deux domaines B-box et un domaine Coiled-coil.

MID1 est une protéine qui se lie aux microtubules et ubiquitine la sous-unité catalytique associée aux microtubules PP2Ac (protéine phosphatase 2Ac) (Trockenbacher et al., 2001). Dans la majorité des cas, la protéine est mutée au niveau du domaine C-terminal qui est le domaine de liaison aux microtubules. Lorsqu'elle est mutée, la protéine a donc une affinité amoindrie pour les microtubules et est localisée dans le cytosol. PP2Ac fait partie de la signalisation mTOR et conduit à la déphosphorylation de S6K1 et 4E-BP1. La signalisation mTOR est l'une des principales voies impliquées dans la croissance cellulaire et la prolifération des cellules. Dans les cellules où le gène *MID1* est désactivé, il y a une accumulation de PP2Ac conduisant à des défauts de la croissance axonale *in vitro* (Lu et al., 2013).

Par ailleurs, dans les souris KO on observe des anomalies au niveau du corps calleux avec une élongation anormale de l'axone (Lu et al., 2013).

La protéine MID1 a aussi été impliquée dans la maladie d'Alzheimer et d'Huntington. La maladie d'Alzheimer est caractérisée par l'accumulation de plaques amyloïdes entre les neurones, ces plaques contiennent des peptides amyloïdes $\alpha\beta$. Il a été montré dans des cerveaux atteints d'Alzheimer une diminution de l'activité et de l'expression de PP2A qui conduirait à une production excessive et une accumulation de peptides amyloïdes (Sontag et Sontag, 2014).

La maladie de Huntington est quant à elle causée par une répétition du tri nucléotide CAG dans le gène codant la protéine huntingtine. Le complexe MID1 se lierait aux motifs CAG de l'ARNm de HTT et induit sa traduction. MID1 participerait donc à la traduction de la protéine mutante en recrutant S6K au niveau de l'ARNm de HTT et en participant aussi à l'inhibition de PP2A (Krauss et al., 2013).

5.1.2 Cullin-4B (CUL4B)

CUL4B (Cullin-4B) localisée sur le chromosome Xq24 est responsable de déficience intellectuelle liée à l'X (DILX) chez les hommes atteints du syndrome de Cabezas et de malformations corticales (Cabezas et al., 2000; Tarpey et al., 2007; Vulto-van Silfhout et al., 2015; Zou et al., 2007). Des mutations génétiques dans le gène *CUL4B* serait responsable de 3% des patients DILX, ce qui en fait le premier gène impliqué dans la DILX. Des mutations dans *CUL4B* sont associées à une déficience intellectuelle, une épilepsie, des tremblements, une agressivité, une macrocéphalie, un hypogonadisme, de l'obésité et des caractéristiques dysmorphiques variables. Ces mutations peuvent être des délétions, des mutations non-sens, des variations d'épissage ou encore des mutations silencieuses dans le domaine C-Terminal ou à proximité de ce domaine ou au niveau du domaine Cullin, le domaine portant l'activité ubiquitine ligase de la protéine. *CUL4B* fait en effet partie de la famille des Cullins et est au cœur du complexe CRL4 (Cullin4-RING E3 Ligase), elle se lie à une E3 ubiquitine ligase à domaine RING (Rbx1) et à DDB1 (Damaged DNA Binding protein 1) un adaptateur du substrat (Bernhardt et al., 2006). La liaison à l'E3 ubiquitine ligase Rbx1 se fait via l'extrémité C-terminale de Cul4b. Rbx1 va aussi recruter une enzyme de conjugaison E2 portant l'ubiquitine activée. Afin de reconnaître et ubiquitiner le substrat, le complexe CRL (Cullin-RING-ligase) doit être activée par une neddylation effectuée par Nedd8 ce qui induit un changement conformationnel du complexe rendant ainsi l'ubiquitination du substrat possible (Siergiejuk et al., 2009). En N-terminal cul4b se lie à DDB1 via le domaine WD40, ces protéines font partie des protéines DWD (DDB1-binding WD40) (Hu et al., 2008). D'autres

protéines DWD ont été impliquées dans les malformations corticales comme LIS1 responsable de lissencéphalies ou encore WDR62 responsable de microcéphalies, ce dernier étant aussi connu pour interagir avec Cul4b (Jin et al., 2006). Cul4b semble avoir un rôle important dans le développement neuronal, en effet les souris Cul4b $-/-$ ne sont pas viables et meurent à E9,5 avec des défauts cardiaques et du système nerveux (Chen et al., 2012). Chen et al ont réussi à sauver les souris mutantes et montrent qu'il n'y a pas de protéines Cul4b dans le cerveau, ils montrent aussi qu'il n'y a pas de différences de substrats entre les souris WT ou mutantes ni en quantité ni en qualité ce qui suggère qu'il existe un mécanisme de compensation par une autre E3 ubiquitine ligase. Les mêmes auteurs montrent une diminution des interneurons GABAergiques paravalbumine positifs au niveau du gyrus denté de plus des anomalies dans l'arborisation dendritique QUI ont été observées. Ces anomalies pourraient expliquer les défauts de transmission et d'intégration du signal synaptique. Par ailleurs, les souris mutantes ont des défauts d'apprentissage spatial, des défauts de mémoire et elles développent une susceptibilité à l'épilepsie, ce qui est similaire au phénotype des patients atteints de DLX.

Une autre étude montre que les mutations dans Cul4b peuvent affecter le remodelage de la chromatine, en effet, une augmentation de WDR5 qui est un substrat de Cul4bet conduit à une augmentation de H3K4me3 au niveau des promoteurs des gènes neuronaux induisant leur expression (Nakagawa et Xiong, 2011). Plusieurs études ont aussi montré que TSC2 et la cycline E étaient ubiquitinés par Cul4b puis dégradés (Higa et al., 2006; Wang et al., 2013). Dans les cellules mutantes, il y a une perte partielle ou totale de fonction de la protéine ce qui conduit à une accumulation de cycline E et de TSC2. L'accumulation de cycline E suggère que Cul4b diminue la prolifération des cellules en prolongeant la phase S. De plus, la cycline E a déjà été impliquée notamment dans la régulation des processus de mémoire et dans la plasticité synaptique (en régulant le nombre de synapses et d'épines dendritiques) (Odajima et al., 2011; Padmanabhan et al., 1999; Staropoli et al., 2003). De plus, il y a une accumulation de TSC2 ce qui suggère un rôle de l'activité de mTOR. En effet, TSC2 est un régulateur négatif de mTORC1 et les protéines Cul4b mutantes semblent donc réguler négativement la signalisation mTORC1 (Wang et al., 2013). Par ailleurs, le complexe CUL4-DDB1-WDR interagit avec Raptor qui est présent dans le complexe mTORC1 et mLST8 qui est présent à la fois dans le complexe mTORC1 et mTORC2 (Ghosh et al., 2008). Il semble que Cul4b régule la voie mTORC1, en effet, une diminution de Cul4b conduit à la stabilisation de DDIT4 (DNA damage inducible transcript 4 protein) et de la tubérine ce qui conduit à la

diminution de la phosphorylation des protéines 4EBP1 et S6K (Hu et al., 2008; Katiyar et al., 2009). L'hétérogénéité du phénotype des patients peut être expliquée par l'implication de plusieurs voies de signalisation conduisant à des défauts du développement du cerveau.

5.2. Les N-recognins

5.2.1 Ubiquitin Protein Ligase E3 Component N-Recognin 1 (UBR1)

Le gène UBR1 code pour une E3 ubiquitine ligase qui est un composant de la voie des N-end rule. Ce gène se situe sur le chromosome 15q15.2 et des mutations dans ce gène ont été retrouvées chez des patients atteints du syndrome de Johanson Blizzard (JBS) (Sriram et al., 2011; Zenker et al., 2005). Ce syndrome se caractérise par une insuffisance pancréatique, une croissance diminuée, une dysmorphie variable et souvent une DI. Les souris KO pour ce gène sont viables mais ont un retard de croissance et des anomalies métaboliques (Kwon et al., 2001). La diminution d'UBR1 chez les souris semble dérégler les cellules de l'acinus pancréatique comme chez les patients atteints de JBS. Néanmoins, différentes expériences tendent à montrer que la déficience d'UBR1 semble compenser par UBR2. Le double mutant est léthal avec des défauts du développement cardio-vasculaire et de la neurogenèse associés à une déformation du tube neural (Kwon et al., 2003). Néanmoins, la létalité n'apparaît qu'à la moitié de la gestation et les embryons ont alors une prolifération réduite ainsi qu'une migration et une différenciation trop précoce des cellules progénitrices. An et al ont montré une diminution des cyclines-D (en particulier la cycline D3) chez les doubles mutants, ce qui est critique lors de la transition G1-S, ainsi qu'une diminution de la signalisation Notch et une augmentation de p38 MAPK impliqué dans la sortie du cycle cellulaire (An et al., 2006). Durant la neurogenèse, la croissance des neurites est caractérisée par un faible taux d'ubiquitine libres et un haut taux d'ubiquitine conjugués.

Dans les cellules PC12, Kavakebi et al ont montré que la diminution d'UBR1 conduisait à une diminution de la croissance des neurites, à une réduction de la longueur de l'axone et à une réduction de l'arborisation (Kavakebi et al., 2005). Ces données tendent à prouver le rôle d'UBR1 dans la régulation de la neurogenèse et leur contribution dans le JBS.

5.3. Les E3 ubiquitine ligases à domaine HECT

5.3.1 Ubiquitin-protein ligase E3A (UBE3A)

Le gène UBE3A localisé sur le chromosome 15q11.2 code pour une E3 ubiquitine ligase appelée aussi E6-AP. Des mutations, des délétions ou des duplications de ce gène sont responsables de maladies neurodéveloppementales comme le syndrome d'Angelman ou encore le syndrome Dup15q (Finucane et al., 2016; Kishino et al., 1997; LaSalle et al., 2015). Ce gène est soumis à l'empreinte parentale, la copie paternelle n'est normalement pas exprimée et seule la copie maternelle est active dans le cerveau (Figure 33). Lorsque cette dernière est mutée ou déletée, le gène n'est plus exprimé ce qui est la cause principale du syndrome d'Angelman. Ce syndrome est caractérisé par une sévère DI, des difficultés de langage, une épilepsie, une ataxie et très souvent de l'autisme.

Par ailleurs, il a été montré qu'une duplication de cet allèle maternel était la cause d'un autre syndrome appelé syndrome Dup15q, ce syndrome est causé quand il y a au moins une copie de l'allèle maternel en plus des deux allèles parentaux (Finucane et al., 2016).

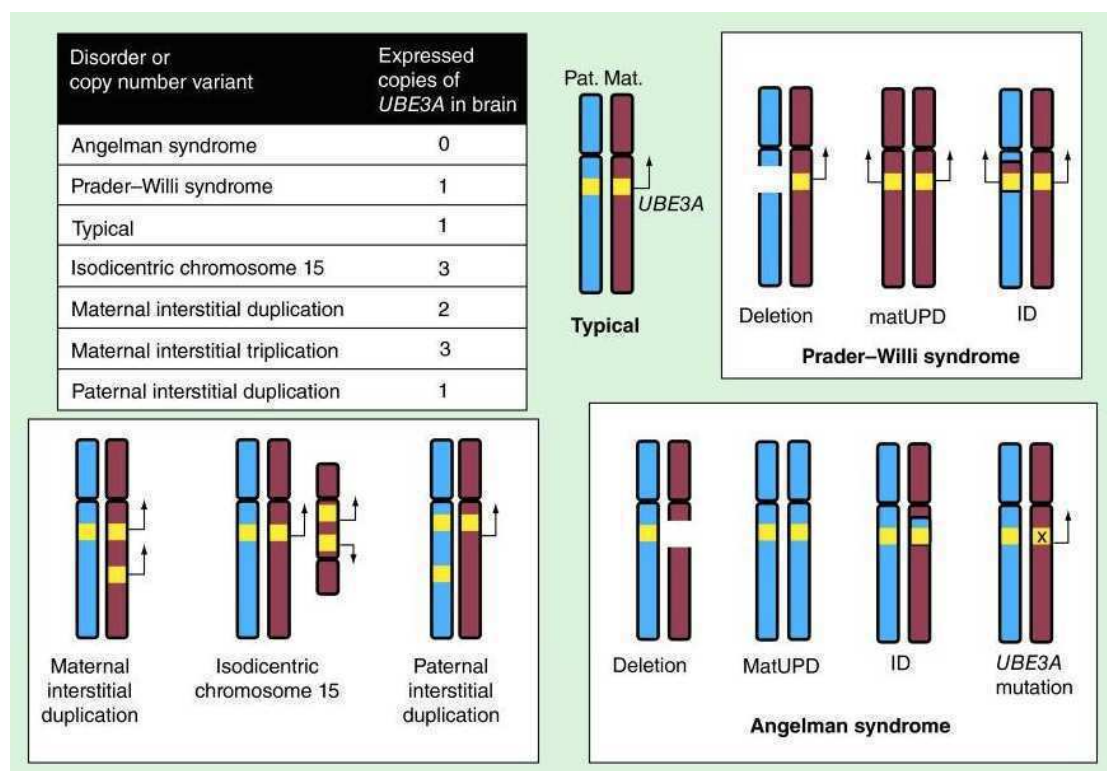


Figure 33 : Les différentes maladies neurodéveloppementales associées à l'expression d'UBE3A. D'après LaSalle et al., 2015.

Chez la souris où l'allèle maternelle d'*ube3a* est absente, on observe des défauts de la plasticité synaptique (avec des défauts de PLT dans l'hippocampe), des difficultés d'apprentissage, une coordination motrice anormale et une susceptibilité aux épilepsies audiogéniques (Jiang et al., 1998). Ces phénotypes sont très similaires à ceux observés chez les patients atteints du syndrome d'Angelman. Récemment, Tonazzini et al ont montré que les souris présentent aussi des défauts neurodéveloppementaux avec des anomalies dans l'arborisation des neurites et leur guidage (Tonazzini et al., 2016). Il semble que les défauts de PLT soient dus à une inhibition de la phosphorylation de CAMKII. En effet, *ube3a* régule CAMKII qui est très enrichi au niveau des synapses et très important pour la PLT. CAMKII phosphoryle en effet les récepteurs AMPA (AMPA) et conduit à une augmentation de leur expression au niveau des synapses et à une augmentation de la conductance des récepteurs (He et al., 2011; Jenkins et Traynelis, 2012). La diminution de la phosphorylation de CAMKII permet de sauver le phénotype moléculaire et cellulaire dans le modèle souris du syndrome d'Angelman (Weeber et al., 2003). *Ube3A* pourrait réguler positivement l'activité CAMKII en diminuant l'activité de la phosphatase de CAMKII. Ces hypothèses sont concordantes avec la localisation d'*Ube3a* au niveau du noyau et des synapses.

De plus, il a été montré qu'*Ube3a* régule la dégradation de la protéine Arc, une protéine synaptique impliquée dans l'internalisation d'une sous-population d'AMPA (Tai et Schuman, 2010). Dans les souris KO il y a un niveau élevé d'ARC qui conduit à un excès d'AMPA internalisé. Il y a donc des défauts de la transmission synaptique ce qui pourrait expliquer les défauts d'induction et de maintenance de la PLT (via l'interruption de la signalisation BDNF) observés chez les mutants. Une autre équipe a montré qu'*Ube3a* intervient aussi dans la régulation positive de l'activité mTORC1 (avec une augmentation de S6K1 et de la phosphorylation de S6) et dans la régulation négative de l'activité mTORC2 (avec la diminution de PKCa) (Sun et al., 2015).

Par ailleurs, l'Ephexin-5, un substrat d'*Ube3a* est surexprimé dans le modèle souris, l'Ephexin-5 permet l'activation de RhoA, une GTPase impliquée dans la croissance des épines dendritiques. Dans le syndrome d'Angelman, l'absence d'*Ube3a* conduit à un excès de RhoA-GTP et donc des perturbations dans la croissance et la maturation des épines dendritiques (Margolis et al., 2010; Sell et Margolis, 2015).

De façon intéressante, il y a des similitudes entre le syndrome d'Angelman et le syndrome de Rett. Ce dernier atteint principalement des femmes et est dû à des mutations dans le

gène *MECP2* sur le chromosome X. Des études suggèrent qu'Ube3a pourrait interagir avec Mecp2 et réguler l'expression de gènes cibles communs (Kim et al., 2013a). De plus, il a été montré chez la drosophile que la diminution de l'expression d'Ube3a conduirait à l'augmentation du niveau de Mecp2 (Hitchins et al., 2004).

5.3.2 *HECT domain et ankyrin repeat containing, E3 ubiquitin protein ligase 1 (HACE1)*

Des mutations homozygotes dans *HACE1* (HECT domain et Ankyrin repeat-containing E3 ubiquitin protein ligase 1) ont été retrouvées chez des patients atteints de DI, de paraplégie spastique et de retard psychomoteur avec ou sans épilepsie (Hollstein et al., 2015). *HACE1* est une E3 ubiquitine ligase qui cible notamment Rac1, une Rho GTPase impliquée dans le contrôle de la morphologie cellulaire, la migration et la foliation des hémisphères cérébelleux (Torrino et al., 2011). En utilisant des morpholinos anti-sens contre *HACE1* chez le xénope, Imura et al ont mis en évidence un retard de la fermeture du tube neural ainsi qu'une inhibition de l'extension convergente (Imura et al., 2016). Ces deux observations sont partiellement sauvées par une diminution de Rac1. De plus, les embryons où Rac1 est constitutivement actif ont un phénotype similaire. Par ailleurs, Castillo-Lluva et al ont montré qu'une délétion d'*HACE1* conduit à une migration plus rapide via Rac1 (Castillo-Lluva et al., 2012).

5.3.3 *HECT, UBA, WWE domains containing protein 1 (HUWE1)*

Le gène *HUWE1* (HECT, UBA, et WWE domains containing protein 1), localisé sur le chromosome Xp11.22, code pour une E3 ubiquitine ligase à domaine HECT. Des mutations génétiques dans *HUWE1* ont été retrouvées chez des patients atteints du syndrome Brooks-Wisniewski-Brown (Friez et al., 2016). Ces mutations peuvent être des mutations faux-sens ou des duplications et elles sont responsables d'une sévère DI et d'une hypotonie associée ou non à une microcéphalie.

Chez la souris KO pour *HUWE1* on observe une létalité embryonnaire associée à des anomalies de l'organisation laminaire, une microcéphalie, des anomalies du gyrus denté et une réduction de la taille du cervelet (D'Arca et al., 2010).

La diminution d'*HUWE1* sur des coupes de cerveau a montré que N-Myc était la cible d'*HUWE1*, N-Myc est une protéine impliquée dans la neurogenèse (Knoepfler et al., 2002).

La perte de N-Myc conduit à la diminution de la cycline D2 (CCND2) ce qui provoque une diminution du nombre de mitoses pendant le stade de prolifération. De façon intéressante il a été montré que DLL3, un ligand de Notch est surexprimé dans les cerveaux de souris KO pour HUWE1 et aussi chez les souris KO pour la signalisation Notch. Il a été montré que DLL3 régule la signalisation NMYC, la prolifération et la différenciation neuronale. HUWE1 est aussi impliqué dans la régulation du facteur de transcription Atoh1 qui est impliqué dans la prolifération et la différenciation des progéniteurs de neurones granulaires cérébelleux (Zhao et al., 2008). Il a aussi été montré que la dégradation de HUWE1 est requise pour la migration et la différenciation des cellules neuronales. Une augmentation de l'expression d'HUWE1 chez la drosophile conduit à des défauts d'apprentissage et de mémoire et augmente le nombre de branches au niveau de l'axone terminal. Vandewalle et al suggèrent que ce phénotype est causé par une diminution de dsh (un composant essentiel de la voie Wnt qui est impliqué dans la régulation de l'arborisation de l'axone (Vandewalle et al., 2013). Il est intéressant de noter qu'il y a des signes cliniques similaires entre les patients portant une mutation dans *HUWE1* et ceux ayant une mutation dans le gène codant pour la β -caténine (*CTNNB1*). Il a été montré qu'HUWE1 conduisait à la polyubiquitination de Dsh mais pas à sa dégradation (de Groot et al., 2014). En effet, HUWE1 permet la multimérisation de Dsh ce qui conduirait à l'inhibition de la voie Wnt/ β -caténine et renforce l'implication de la voie Wnt dans le phénotype des patients atteints du syndrome Brooks-Wisniewski-Brown.

5.3.4 *HECT et RLD Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase Family Member 1 (HERC1)*

HERC1 est un gène situé sur le chromosome 15q22.31, il code pour une E3 ubiquitine ligase à domaine HECT. Des mutations génétiques ont été retrouvées chez des patients atteints d'une sclérose tubéreuse caractérisée par une macrocéphalie, une surcroissance, un retard psychomoteur, une dysmorphie faciale, un affinement du corps calleux, une atrophie cérébelleuse et une déficience intellectuelle (DI) (Aggarwal et al., 2016; Nguyen et al., 2015; Ortega-Recalde et al., 2015). Cette protéine interagit avec le complexe TSC1-TSC2 et contribue ainsi à la régulation de la voie mTOR en déstabilisant TSC2 (Chong-Kopera et al., 2006). *HERC1* est une ubiquitine ligase et un facteur d'échange de nucléotide guanine pour ARF et des GTPases de la famille Rab (Ortega-Recalde et al., 2015). *HERC1* est impliqué dans l'homéostasie neuronale ainsi que dans le développement et la maintenance des synapses.

HERC1 a aussi été identifié chez des patients autistiques et son rôle a été mis en évidence dans le développement des neurites (Hashimoto et al., 2016).

5.3.5 HECT et RLD Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase Family Member 2 (HERC2)

Le gène *HERC2* (HECT domain et RCC1-like domain 2) est localisé sur le chromosome 15q13.1 à proximité du gène *UBE3A*. Il a été montré que *HERC2* stimulait l'activité d'*UBE3A* et il semble être un régulateur clé d'*UBE3A* (Kühnle et al., 2011). Une variation homozygote dans *HERC2* a été identifiée dans deux familles Amish dont les patients ont des difficultés comportementales, des anomalies du corps calleux (Harlalka et al., 2013; Puffenberger et al., 2007). Cette mutation est une substitution affectant une proline du domaine RCC1 de la protéine. Cette substitution pourrait induire un changement conformationnel qui pourrait affecter la stabilité de la protéine.

5.3.6 HECT, C2 et WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2 (HECW2)

Des mutations *de novo* dans le gène *HECW2* (aussi appelé *NEDL2* ou *NEDD4*), localisé sur le chromosome 2q32.3. ont été mises en évidence chez des patients atteints d'un retard neurodéveloppemental ou de DI (Berko et al., 2017). Il a été montré que *HECW2* régule la stabilité de p73 qui joue un rôle dans le neurodéveloppement. En effet, les souris déficientes pour p73 ont une hydrocéphalie et une dysgénésie hippocampique avec des anomalies dans les couches des cellules pyramidales CA1-CA3 et dans le gyrus denté (Killick et al., 2011). De plus, p73 joue un rôle essentiel durant la neurogenèse embryonnaire, la différenciation neuronale et la maintenance des cellules souches neuronales. Par ailleurs, des études ont montré que *HECW2* était capable de s'associer avec des tubulines α et participe ainsi à la mitose.

5.3.7 Thyroid Hormone Receptor Interactor 12 (TRIP12)

TRIP12 (thyroid hormone receptor interaction 12) sur le chromosome 2q36.3 code pour une E3 ubiquitine ligase à domaine HECT qui partage des similitudes avec *UBE3A*. Cinq CNV (Copy Number Variation) et quatre SNV (Single Nucleotide Variation) ont été identifiés chez des patients atteints d'une DI sévère avec ou sans troubles autistiques, retard de langage et une dysmorphie faciale variable. Une microcéphalie et une épilepsie peut être associée aux signes cliniques (Zhang et al., 2017).

TRIP12 est constitué d'un motif WWE, permettant les interactions protéine-protéine ainsi que la conjugaison d'ADP-ribose, et un domaine ARM (Armadillo/ β -catenin-like repeats). Plusieurs ligands potentiels ont été mis en évidence comme APP-BP1 (amyloid precursor protein-binding protein) (Jiang et al., 1998; Kajiro et al., 2011); ARF (ADP-ribosylation factor 1) (Kajiro et al., 2011); PTF1a (pancreas transcription factor 1a) (Hanoun et al., 2014); SOX6 (SRY (Sex determining region Y)-Box 6) (An et al., 2013), RNF168 (ring finger protein) ou encore HUWE1 (HECT, UBA et WWE domain containing 1) (Poulsen et al., 2012) ce qui suggère que TRIP12 joue un rôle dans plusieurs processus physiologiques. TRIP12 a aussi été impliqué dans la réparation de l'ADN et la croissance cellulaire. L'inactivation de TRIP12 conduit à une expression anormale de p16 (un inhibiteur de kinases dépendantes à la cycline) et induit une létalité embryonnaire des souris (Kajiro et al., 2011).

5.3.8 Ubiquitin protein ligase E3B (*UBE3B*)

Des mutations homozygotes ou hétérozygotes composites ont été identifiées dans le gène *UBE3B*, elles sont responsables du syndrome oculo-cérébro-facial de type Kaufmann. Le gène *UBE3B* se situe sur le chromosome 12q24 et code pour une E3 ubiquitine ligase avec un domaine HECT en C-terminal et un domaine IQ en N-terminal. Les patients présentant des mutations dans ce gène ont un syndrome de DI avec blépharophimose et ptose (SDIBP) caractérisé par un retard développemental, un retard de croissance avec une circonférence crânienne diminuée, une dysmorphie faciale et un niveau très bas de cholestérol (Basel-Vanagaite et al., 2012). Chez les souris *Ube3b*^{-/-}, une réduction de la viabilité, du poids et de la taille du cerveau a été observée (Basel-Vanagaite et al., 2012).

5.4. Les déubiquitinases

5.4.1 *STAM-binding protein (STAMBMP)*

Des mutations dans le gène *STAMBMP* (aussi appelé *AMSH*) localisé sur le chromosome 2p13.1 est responsable du syndrome microcéphalie malformation capillaire (MICCAP). Les patients présentent une microcéphalie avec une atrophie corticale progressive, une épilepsie, un retard développemental sévère et de multiples petites malformations capillaires sur le corps (McDonnell et al., 2013). *STAMBMP* est une DUB de la famille JAMM, elle est impliquée dans le trafic endosomal en régulant la machinerie via les protéines ESCRT et l'ubiquitination des récepteurs cargo. Les patients portant des mutations ont un niveau élevé d'agrégats de

protéines ubiquitinées et une apoptose également élevée. Le même résultat a été observé dans les cellules de lignées lymphoblastoïdes. Les souris KO présentent un retard de croissance et une mort post-natale précoce entre P19 et P23 (Ishii et al., 2001). Il a été montré que ces souris n'ont pas d'aire CA1 et présentent une augmentation de l'apoptose cellulaire. De plus, les patients semblent avoir une activation des voies RAS-MAPK et PI3K-AKT-mTOR, ces voies ayant déjà été impliquées dans des pathologies avec un retard de croissance et des défauts d'angiogenèse et de vascularisation (McDonnell et al., 2013).

5.4.2 Ubiquitin-specific-processing protease 7 (USP7)

USP7 (ubiquitin-specific protease 7 aussi connue comme herpes virus-associated ubiquitin-specific protease, HAUSP) et un gène localisé sur le chromosome 16p13.2 et code pour une DUB. Des mutations dans ce gène sont responsables de DI associées à des troubles autistiques, une hypotonie et des épilepsies (Hao et al., 2015). Cette DUB fait partie du complexe ubiquitine ligase MAGEL2/TRIM27 et régule l'ubiquitination de beaucoup de protéines incluant celles de la voie MDM2-p53 qui sont impliquées dans divers processus cellulaires et physiopathologiques (réparation de l'ADN, transcription, réponse immunitaire, réplication virale et cancer) (Sheng et al., 2006). MDM2 est en effet une E3 ubiquitine ligase qui cible p53 et conduit à sa dégradation. MAGEL2 et TRIM27 forment un complexe d'E3 ubiquitine ligases, ce complexe est régulé par USP7 et joue un rôle clé dans le transport rétrograde de l'endosome à l'appareil de Golgi ce qui permet le recyclage de nombreuses protéines (Hao et al., 2015).

5.4.3 Ubiquitin Specific Peptidase 9, X-Linked (USP9X)

Des mutations dans *USP9X* (ubiquitin-specific protease 9, X-linked) ont été retrouvées chez des hommes atteints de DI. Il est intéressant de noter que plusieurs cas ont été identifiés chez des femmes, mais le phénotype diffère entre les deux sexes, s'ils ont en commun la DI et une petite stature, il y a chez les femmes de multiples malformations congénitales. Ce gène situé sur le chromosome Xp11.4 code pour une DUB qui contient un domaine UBL (ubiquitin-like) et un domaine USP (ubiquitin specific protease). Les souris KO mâles sont embryonniques létales avec une atrophie du corps calleux, une réduction du volume hippocampique et une désorganisation de l'architecture du cortex. De plus, dans les neurones en culture, la déficience en *Usp9x* conduit à un défaut de l'élongation de l'axone et

un défaut du nombre de terminaisons axonales et dendritiques (Stegeman et al., 2013). Ces observations pourraient s'expliquer par des défauts dans la signalisation TGF- β , en effet il a été montré que la perte de fonction d'usp9x conduit à une interruption de la signalisation TGF- β dans les neurones hippocampiques. De plus, Usp9x permet la déubiquitination de Smad4, un composant essentiel de la signalisation TGF- β (Dupont et al., 2009; Stinchfield et al., 2012). Par ailleurs, il existe des similarités phénotypiques entre les souris KO USP9X et celles double KO DCX et DCXL. Dcx est un partenaire d'USP9X mais pas un substrat et ce complexe DCX/USP9X s'associe aux microtubules (Friocourt et al., 2005). Les mutations dans DCX conduisent à une abolition de l'interaction avec USP9X et aucune autre interaction ne semble être impactée. En plus de la voie TGF β , USP9X est impliqué dans plusieurs voies de signalisation comme la voie Wnt, où USP9X régule la β -catenin (Taya et al., 1999), et la voie Notch (Chastagner et al., 2008; Overstreet et al., 2004), où USP9X régule Itch. USP9X régule plusieurs protéines impliquées dans l'adhésion et la prolifération des progéniteurs neuronaux comme l'Afadin6 (jonction adhérentes), AGS3 (Activator of G protein Signaling 3)(orientation du fuseau mitotique) ou encore l'Epsin1 (endocytose dans le compartiment pré-synaptique).

5.5. Autres protéines impliquées dans les maladies neurodéveloppementales

5.5.1 Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 A (UBE2A)

Une seule enzyme de conjugaison a pour le moment été mise en cause dans des malformations neurodéveloppementales, il s'agit d'*Ube2a* qui est responsable de DI liée à l'X de type Nascimento chez les hommes (Nascimento et al., 2006). Le gène *Ube2a* est localisé sur le chromosome Xq24 et les patients portant des mutations de ce gène présentent un retard moteur, une épilepsie, des difficultés de langage et quelquefois une hypotonie. Chez la drosophile, la déficience d'*Ube2a* cause des défauts synaptiques dus à des défauts mitochondriaux. Par ailleurs, Haddad et al ont montré qu'*Ube2a* permet l'ubiquitination des protéines mitochondriales ce qui permettrait de décharger les mitochondries dysfonctionnelles (Haddad et al., 2013). Récemment, Bruinsma et al, ont montré que les souris KO pour *Ube2a* présentaient un déficit d'apprentissage spatial mais pas d'épilepsie ni de problèmes de coordination motrice (Bruinsma et al., 2016). De plus, ces souris n'ont pas de défaut de la transmission synaptique ou dans la PLT mais elles ont un déficit dans la DLT. Par ailleurs, il a été montré qu'*Ube2a* promeut l'expression de la cycline D1 (CCND1) qui est un régulateur de la transition G1-S et de la prolifération.

5.5.2 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12 (PSMD12)

Le gène *PSMD12* (proteasome 26S subunit non ATPase 12) code pour une sous-unité du protéasome 19S, une sous-unité régulatrice du 26S, qui est responsable de la dégradation d'une grande variété de protéines. Des mutations dans le gène *PSMD12* sont responsables du syndrome Stankiewicz-Isidor caractérisé par une DI, une épilepsie, une hypotonie, des troubles autistiques ou une hyperactivité, une dysmorphie faciale, un hypertélorisme ainsi qu'une hypo-acousie (Küry et al., 2017). Chez le poisson zèbre, la délétion de *PSMD12* conduit à la réduction des vésicules optiques ce qui suggère une microcéphalie, des défauts du tubule rénal et des anomalies cranio-faciales. De façon intéressante il a été montré que *PSMD12* interagissait avec de nombreuses protéines retrouvées mutantes dans plusieurs maladies neurodéveloppementales comme *UBE3A*, *UBE3B*, *HUWE1*, *USP7* et *USP9X* (Poulsen et al., 2012).

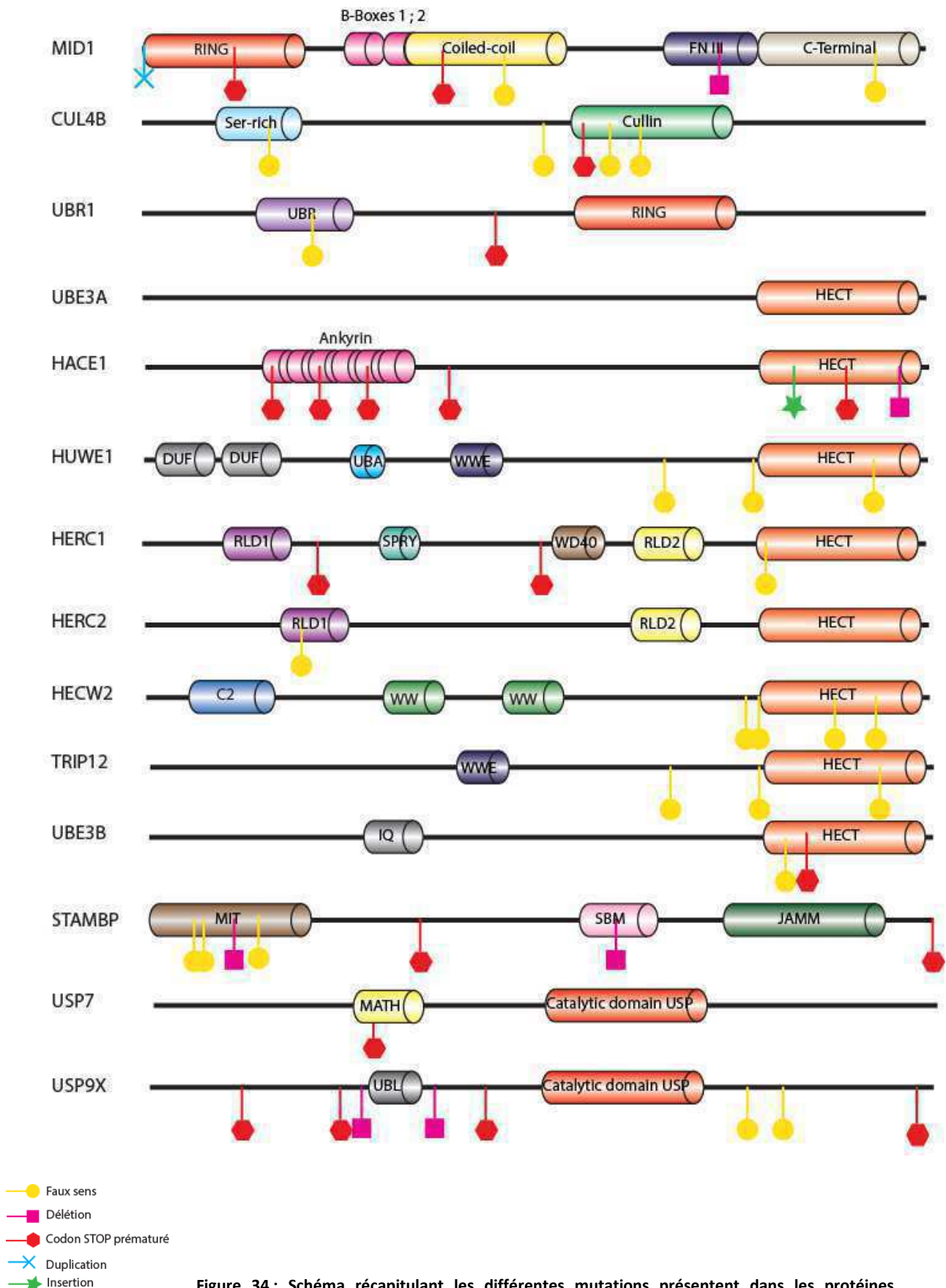


Figure 34 : Schéma récapitulant les différentes mutations présentes dans les protéines impliquées dans l'ubiquitination, responsables de pathologies du neurodéveloppement et répertoriées dans OMIM.

Gènes	Classe	Syndromes associés	Position sur le chromosome	Voies de signalisation dérégulées	Année de découverte	OMIM	Références
MID1	E3 à domaine RING	Syndrome d'Opitz G/BBB	Xp22.2	mTor	1997	300000	Quaderi et al, 1997 ; Cox et al, 2000 ; Winter et al, 2003 ; So et al, 2005 ; Ferrentino et al, 2007 ; Zhang et al, 2011
CUL4B	E3 à domaine RING	XLID, Syndrome de Cabezas et malformations du développement cortical	Xq24	PI3K-Akt-mTor	2007	300354	Tarpey et al, 2007 ; Cabezas et al, 2000 ; Wei et al, 1993 ; Zou et al, 2007 ; Vitale et al, 2001 ; Londin et al, 2014 ; Vulto-van Silfhout et al, 2015
UBR1	E3 voie N-end rule	Syndrome de Johanson Blizzard	15q15.2	Notch	2005	243800	Zenker et al, 2005 ; Elting et al, 2008 ; Al-Dosari et al, 2008
UBE3A	E3 à domaine HECT	Syndrome d'Angelman	15q11.2	RhoGTPase	1997	105830	Kishino et al, 1997 ; Matsuura et al, 1997 ; Fung et al, 1998 ; Tsai et al, 1998 ; Rapakko et al, 2004 ; Molfetta et al, 2004 ; Abaied et al, 2010
HACE1	E3 à domaine HECT	Syndrome de paraplégie spastique-retard psychomoteur-épilepsie ou déficience intellectuelle avec ou sans épilepsie	6q16.3	RhoGTPase	2015	616756	Hollstein et al, 2015 ; Akawi et al, 2015
HUWE1	E3 à domaine HECT	SyndrômeBrooks-Wisniewski-Brown, Juberg-Marsidi et Turner	Xp11.22	Notch, Wint	2016	300706	Turner et al, 1994 ; Froyen et al, 2008 ;
HERC1	E3 à domaine HECT	Macrocéphalies, dysmorphie faciale et retard psychomoteur	15q22.31	PI3K-Akt-mTor	2015	617011	Ortega-Recalde et al, 2015 ; Nguyen et al, 2016 ; Aggarwal et al, 2016
HERC2	E3 à domaine HECT	Retard développementaux avec des symptômes du syndrome d'Angelman	15q13.1	mTor	2012	615516	Puffenberger et al, 2012 ; Harlalka et al, 2013
HECW2	E3 à domaine HECT	Maladie neuro-développementale avec hypotonie et une absence de langage	2q32.3		2017	617268	Berko et al, 2017
TRIP12	E3 à domaine HECT	Déficience intellectuelle, retard de langage, dysmorphie faciale	2q36.3		2017	604506	Zhang et al, 2017
UBE3B	E3 à domaine HECT	Syndrôme occulo-cérébro-facial de Kaufman, syndrôme de déficience intellectuelle-blepharophimosis-ptosis	12q24		2012	244450	Pedurupillay et al, 2015 ; Basel-Vanagaite et al, 2012
STAMBP	DUB	Microcéphalie-capillaire	2p13.1	RasMapk, PI3K-Akt-mTor	2013	614261	Mirzaa et al, 2011 ; McDonell et al, 2013
USP7	DUB	Syndrome de Schaaf-Yang	16p13.2		2015	615547	Hao et al, 2015
USP9X	DUB	XLID	Xp11.4	TGFB, Wint, Notch	2014	300919	Homan et al, 2014 ; Reijnders et al, 2016
UBE2A	E2	XLID	Xq24		2006	300860	Nascimento et al, 2006 ; Budny et al, 2010
PSMD12	Protéasome	Syndrome Stankiewicz-Isidor	17q24.2		2017	617516	Kury et al., 2017

Tableau 3 : Les différents gènes intervenant dans l'ubiquitination des protéines et impliqués dans les malformations du neurodéveloppement.

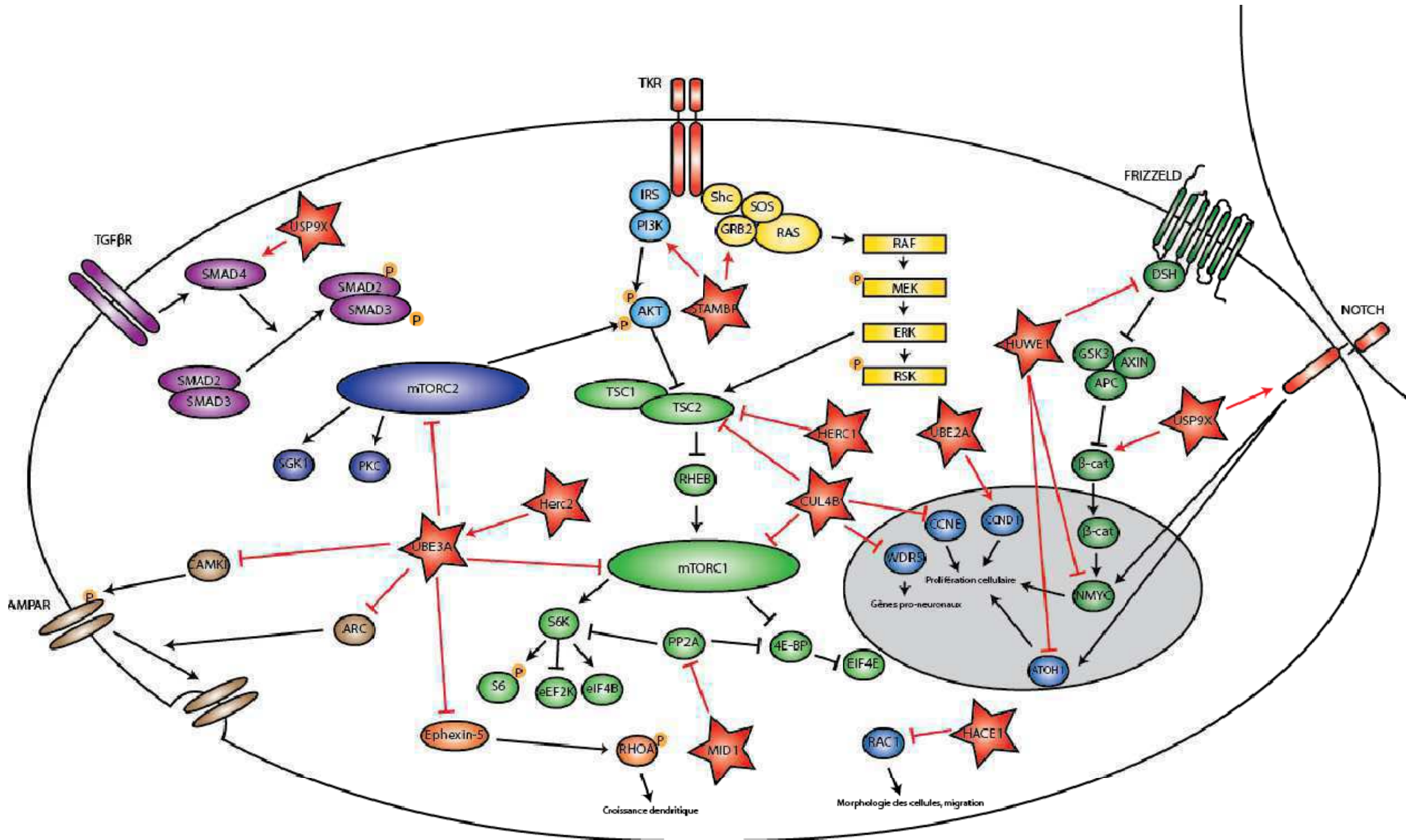


Figure 35 : Les différentes protéines impliquées dans les malformations du neurodéveloppement et les principales voies de signalisation impliquées qu'elles régulent .

Résultats

Article 1 :

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

Loïc Broix*, **Hélène Jagline***, Ekaterina L Ivanova, Stéphane Schmucker, Nathalie Drouot, Jill Clayton-Smith, Alistair T Pagnamenta, Kay A Metcalfe, Bertrand Isidor, Ulrike Walther Louvier, Annapurna Poduri, Jenny C Taylor, Peggy Tilly, Karine Poirier, Yoann Saillour, Nicolas Lebrun, Tristan Stemmelen, Gabrielle Rudolf, Giuseppe Muraca, Benjamin Saintpierre, Adrienne Elmorjani, Deciphering Developmental Disorders study, Martin Moïse, Nathalie Bednarek Weirauch, Renzo Guerrini, Anne Boland, Robert Olaso, Cecile Masson, Ratna Tripathy, David Keays, Cherif Beldjord, Laurent Nguyen, Juliette Godin, Usha Kini, Patrick Nischké, Jean-François Deleuze, Nadia Bahi-Buisson, Izabela Sumara, Maria-Victoria Hinckelmann et Jamel Chelly.

* : contribution à part égale des auteurs

Mon laboratoire de thèse s'intéresse aux gènes impliqués dans les MCD et dans cette optique, une approche de séquençage haut-débit chez des patients présentant des MCD a permis d'identifier des mutations *de novo* faux sens dans plusieurs gènes impliqués dans la régulation de l'ubiquitination des protéines, notamment NEDD4L, une E3 ubiquitine ligase. A la suite de cette découverte, de nouveaux criblages ont permis d'identifier trois nouvelles mutations dans ce gène. L'ensemble des données cliniques, d'imagerie cérébrale et génétiques ont ainsi permis de démontrer l'implication de NEDD4L dans une forme de MCD qui associe une hétérotopie neuronale nodulaire périventriculaire (HNP) et une anomalie du développement des extrémités appelée syndactylie. Les HNP sont des anomalies de la migration des neurones qui, au lieu de se situer dans le cortex, restent localisés le long des ventricules latéraux. Ces anomalies sont caractérisées cliniquement par une déficience intellectuelle et une épilepsie.

L'ubiquitination est au cœur de la plupart des processus biologiques, comme le cycle cellulaire, l'apoptose ou la réparation de l'ADN, notamment du fait de son rôle central dans la dégradation contrôlée des protéines régulatrices de ces processus. L'ubiquitination permet de contrôler les régulateurs de cycles cellulaires, les facteurs de transcription ou encore les protéines membranaires et requiert l'activité séquentielle de plusieurs types d'enzymes. L'ubiquitine est tout d'abord activée et se lie à une enzyme d'activation E1. Elle est ensuite transférée sur une enzyme de conjugaison E2. Puis un troisième composant, appelé E3 ubiquitine ligase va reconnaître le substrat et lui transférer l'ubiquitine.

Il est important de noter que les quatre mutations (p.Q679H, p.Q694H, p.E893K, p.R897Q) associées à des HNP sont situées dans le domaine catalytique HECT. Ces données contrastent avec les conséquences de la mutation (p.P294R) localisée dans la région N-terminale entre deux domaines tryptophane identifiée chez un patient atteint d'une épilepsie photosensible sans HNP (Epi4K Consortium et Epilepsy Phenome/Genome Project, 2013, Nature, 501).

Le principal objectif de ma thèse est de mieux caractériser les conséquences des mutations de *NEDD4L* sur la fonction de la protéine et les anomalies neurodéveloppementales entraînant des HNP. Pour cela deux approches sont utilisées, une approche *in cellulo* et une approche *in vivo* d'électroporation *in utero* (EIU) chez la souris.

Pour les études *in cellulo*, nous avons utilisé les lignées cellulaires Neuro-2A et les cultures primaires de cellules neuronales. Des expériences de transfection ont été réalisées afin d'étudier la localisation et le comportement de la protéine lorsque les cellules sont transfectées avec les ADNc *NEDD4L* WT et les ADNc *NEDD4L* Q694H, E893K et R897Q. Ces expériences ont montré de manière reproductible que la transfection des constructions *NEDD4L* entraîne une surexpression de la protéine WT et mutée, alors que les niveaux d'expression sont pratiquement indétectables dans les cellules transfectées avec les ADNc correspondant aux mutations du domaine HECT associées à des HNP. Comme le niveau d'expression des ARNm est comparable, nous avons formulé l'hypothèse que ces protéines mutantes étaient instables et sont dirigées au protéasome pour dégradation. Afin de valider cette hypothèse, les cellules ont été traitées au MG132, un inhibiteur du protéasome. Après traitement on observe une augmentation significative du taux de protéines. Ces différentes données indiquent que les protéines mutantes p.Q694H, p.E893K et p.R897Q sont instables et seraient après traduction adressées au protéasome. Afin d'être certain que cette instabilité est la cause du phénotype HNP chez les patients, nous avons étudié l'expression de trois variants contrôles répertoriés dans des bases de données (ClinVar et ExAC), S179T, S233L et G872S (localisé dans le domaine HECT). Le niveau d'expression et la localisation des protéines de ces trois ADNc contrôles sont similaires à la protéine WT.

En parallèle, des cultures primaires de neurones d'embryons de souris au stade E16 ont été réalisées afin d'étudier les conséquences des mutations dans le système nerveux central. Les résultats d'immunofluorescence sont concordants avec ce qui est observé dans les cellules Neuro-2A, à savoir une instabilité pour les protéines mutantes p.Q694H, p.E893K et p.R897Q.

Les mutations dans le domaine HECT conduisant à une instabilité, nous avons voulu savoir si l'activité enzymatique de ces protéines était modifiée. Pour cela des immunoprécipitations et des tests *in vitro* ont été réalisés. Il s'avère que les protéines mutantes sont davantage ubiquitinées que les protéines WT et qu'elles s'auto-ubiquitinent. L'activité enzymatique de *NEDD4L* serait donc préservée voire augmentée chez les mutants en dépit de leur instabilité.

Afin de déterminer les conséquences des mutations de *NEDD4L* sur le comportement des neurones, une approche d'électroporation *in utero* est réalisée sur des souris. L'électroporation *in utero* a montré qu'un knock-down (sh *Nedd4L*) ne provoquait aucun

défaut de migration des neurones, les cellules électroporées migrent correctement jusqu'à la plaque corticale, tandis que la surexpression de la forme sauvage de NEDD4L ainsi que celle des mutants dans le domaine HECT, p.E893K et p.R897Q, provoque un arrêt de la migration au niveau de la zone intermédiaire. Cette anomalie de migration persiste au moins jusqu'à P2. Les mutations localisées dans le domaine HECT ont donc un impact sur la migration des neurones. Il est important de mentionner que des anomalies de migration ont également été observées après électroporation de l'ADNc *NEDD4L* WT.

Nous avons ensuite comparé par EIU les conséquences du WT et des mutants sur la translocation terminale dépendant de la voie Reelin-Dab1. Il s'avère que chez le WT et les mutants, il y a une perturbation du processus de translocation terminale. De même des marquages immunofluorescents sur coupe avec des anticorps anti-PH3, Pax6, Tbr2 et Ki67 ont montré une augmentation de l'index mitotique des progéniteurs apicaux électroporés avec les constructions *NEDD4L* WT et mutants. Seule l'augmentation du nombre de progéniteurs intermédiaires et de cellules gliales radiaires semble spécifique des mutants.

Plusieurs études ayant montré le rôle crucial de NEDD4L au cours du développement, nous avons décidé d'étudier les conséquences de la surexpression des constructions WT et mutantes de *NEDD4L* sur la voie mTOR. NEDD4L a en effet été identifié comme acteur clé de la régulation du crosstalk entre PI3K/mTORC2 et TGF-B/activine. Des expériences basées sur un traitement à la rapamycine (inhibiteur de la voie mTORC1) ont été réalisées. Elles montrent une dérégulation des signalisations Dab1 et mTORC1 dans le cas d'une surexpression de la protéine NEDD4L WT, tandis que pour les protéines mutantes on observe une dérégulation des voies mTORC1 et AKT. Il a aussi été montré que NEDD4L régulait la voie TGF-B via Smad2/3, des expériences ont été réalisées en activant la voie avec de l'activine A et on a montré que le mutant conduit à une perturbation du crosstalk entre AKT et Smad2/3. Pour les mutants HNP, il semble donc y avoir une augmentation de l'activité de mTORC1, tandis que les signalisations AKT et Smad2/3 sont dérégulées. Ces dernières pourraient d'ailleurs indiquer un rôle clé de NEDD4L dans la régulation des processus neurodéveloppementaux et l'implication de la signalisation PI3K/AKT dans les MCD.

Les travaux réalisés lors de cette thèse ont donc permis de mettre en évidence pour la première fois que des mutations dans le domaine HECT du gène NEDD4L induisaient des

hétérotopies nodulaires périventriculaires chez les patients. De plus on a montré que des mutations faux-sens dans un gène tel que NEDD4L pourrait conduire à un état constitutivement actif de la protéine en même temps qu'une instabilité. Il a été montré par ailleurs, que ces mutations conduisaient à une dérégulation des voies de signalisation AKT-mTOR et TGF- β – Smad2/3.

Les résultats résumés ci-dessus ont été rapportés dans l'article « Mutations in the HECT domain of NEDD4L lead to AKT–mTOR pathway deregulation and cause periventricular nodular heterotopias » Broix L. ; Jagline H. et al ; Nature Genetics 2016, Nov ;48(11) : 1349-1358.

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

Loïc Broix^{1–5,22}, Hélène Jagline^{1–4,22}, Ekaterina L Ivanova^{1–4}, Stéphane Schmucker^{1–4}, Nathalie Drouot^{1–4}, Jill Clayton-Smith⁶, Alistair T Pagnamenta⁷, Kay A Metcalfe⁶, Bertrand Isidor⁸, Ulrike Walther Louvier⁹, Annapurna Poduri¹⁰, Jenny C Taylor⁷, Peggy Tilly^{1–4}, Karine Poirier⁵, Yoann Saillour⁵, Nicolas Lebrun⁵, Tristan Stemmelen^{1–4}, Gabrielle Rudolf^{1–4}, Giuseppe Muraca⁵, Benjamin Saintpierre⁵, Adrienne Elmorjani⁵, Deciphering Developmental Disorders study¹¹, Martin Moïse¹², Nathalie Bednarek Weirauch¹³, Renzo Guerrini¹⁴, Anne Boland¹⁵, Robert Olaso¹⁵, Cecile Masson¹⁶, Ratna Tripathy¹⁷, David Keays¹⁷, Cherif Beldjord¹⁸, Laurent Nguyen¹², Juliette Godin^{1–4}, Usha Kini¹⁹, Patrick Nischké¹⁶, Jean-François Deleuze¹⁵, Nadia Bahi-Buisson²⁰, Izabela Sumara^{1–4}, Maria-Victoria Hinckelmann^{1–4} & Jamel Chelly^{1–4,21}

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

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

the developmental process thought to be affected first in combination with the underlying disrupted genes and biological pathways³.

Within the group of MCD associated with neuronal migration abnormalities, PNH represents about 31% of MCD (R.G., unpublished data). Anatomically, PNH is characterized by bilateral ectopic nodules of gray matter lining the lateral ventricles. Clinical presentations in patients with PNH are heterogeneous, although seizures and learning difficulties are the most common clinical features⁵.

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

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

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

for about 50% of bilateral PNH and the associated Ehler–Danlos conditions affecting mostly females⁷. Compelling studies suggested that *FLNA*-related PNH results from the combination of defects affecting the polarized radial glia scaffold and its adhesion to the neuroependymal membrane, neural progenitor proliferation and neuronal migration^{8–10}. Other mechanisms contributing to PNH development were proposed following the identification of rare familial forms of PNH associated with recessive mutations in *ARFGEF2*, which encodes the ADP-ribosylation factor guanine exchange factor 2 (GEF2)¹¹. Finally, other genetic forms of PNH have been mapped through array comparative genomic hybridization (aCGH) studies, but only one potential causal gene, *C6orf70* (*ERMARD*) located at 6q27, has been identified¹².

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

RESULTS

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

We used clinical and brain magnetic resonance imaging (MRI) data from patients with MCD referred for genetic investigations and selected 15 patient–parent trios for analysis by whole-exome sequencing. All families had a single affected patient with bilateral PNH.

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

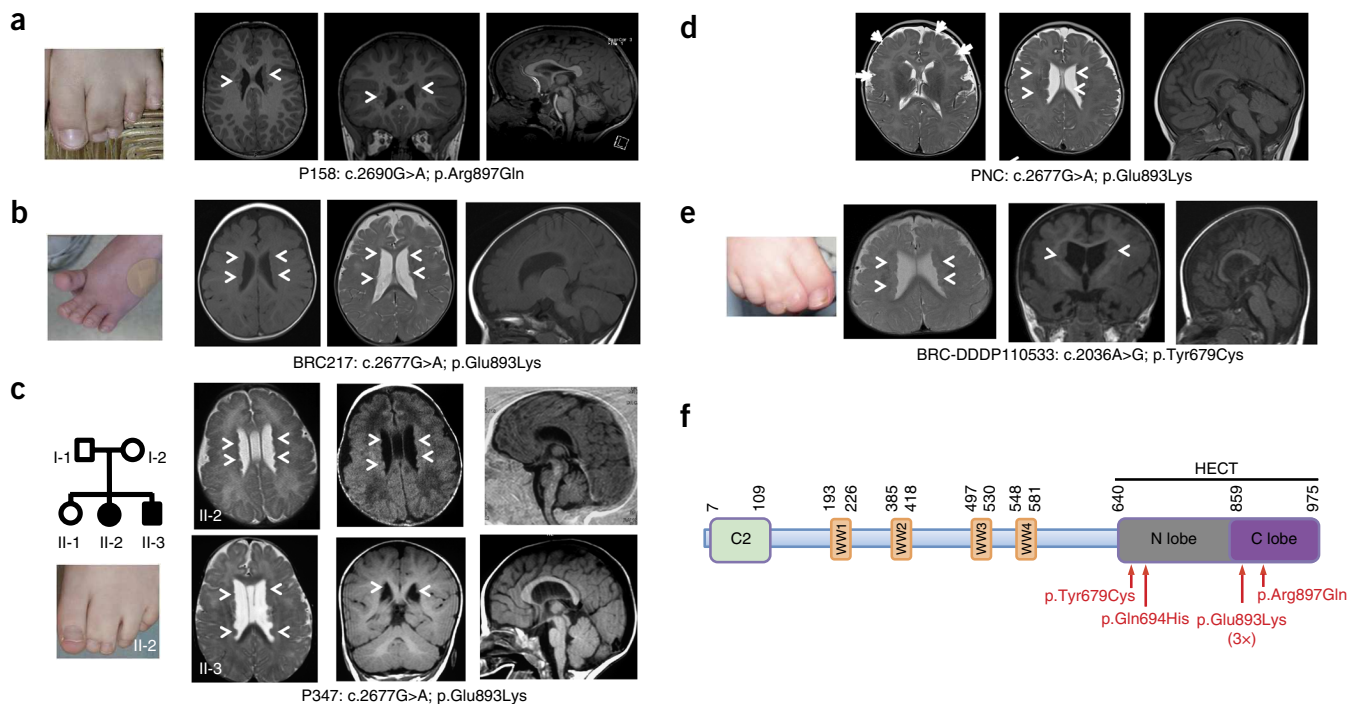


Figure 1 Mutations in *NEDD4L* cause PNH and syndactyly. (**a–e**) Photographs and representative sections of brain MRIs for affected individuals illustrating frequent toe syndactyly and constant PNH. For each patient, two axial sections, or one axial and one coronal section, show confluent nodules of heterotopia lining the lateral ventricles (arrowheads). Sagittal sections show thin (**c**) or dysmorphic (**a** and **c**, II-3) corpus callosum. In **d**, in addition to PNH (arrowheads), the MRI section shows frontal PMG (white arrows). MRIs were performed at the age of 8 years (**a**), 12 months (**b**), 9 and 12 months (**c**), 7 months (**d**) and 8 months (**e**). MRIs were not available for patient Pnh31124 with the c.2082G>T; p.Gln694His mutation. Written consent was obtained to publish patient photographs. (**f**) Linear representation of the *NEDD4L* polypeptide showing the positions in the HECT domain of the heterozygous PNH-associated mutations. *NEDD4L* protein is characterized by an N-terminal C2 domain known to bind Ca²⁺ and phospholipids¹⁷, two to four WW protein–protein interaction domains¹⁶ responsible for recognition of the substrate, and the C-terminal catalytic HECT domain¹⁸.

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

Patients with PNH	P158 c.2690G>A p. Arg897Gln	P347 c.2677G>A p.Glu893Lys	P347-II.2 P347-II.3	BRC217 c.2677G>A p.Glu893Lys	PNC c.2677G>A p.Glu893Lys	Phn31124 c.2082G>T p.Gln694His	DDDP110533 c.2036A>G Tyr679Cys
Inheritance	<i>De novo</i>	Maternal mosaicism	Maternal mosaicism	<i>De novo</i>	<i>De novo</i>	<i>De novo</i>	<i>De novo</i>
Sex	M	F	M	F	F	F	M
Birth (GW)	40	41	41	41	38	Full term	40
Birth weight	3,750	3,160	NA	3,120	3,360	NA	3,000
Syndactyly	+	+	+	+	–	+	+
Hypotonia	+ (at birth)	NA	NA	++ (at 2 months)	+ (axial hypotonia at 34 months)	+	+ (unable to sit or walk at 6 years)
Cleft palate	–	+	Bifid uvula	+	+	+	+ (with micrognathia)
Age at last examination	6 years	12 years	2 years	4 months	4 years	8 months	6.2 years
HC (cm)	54 (+1.5 s.d.)	50 (–2.4 s.d.)	49.8 (+0.7 s.d.)	39 (–1.2 s.d.)	48 (–1.2 s.d.)	43 (–1 s.d.)	49.7(–2.32 s.d.)
Height (cm)	1.08 (–1.5 s.d.)	125 (–3.5 s.d.)	88 (+0.8 s.d.)	61 (M)	100 (+2 s.d.)	68 (–0.5 s.d.)	NA
Weight (kg)	16.5 (–1.5 s.d.)	25 (–2.5 s.d.)	10.9 (+0.7 s.d.)	5.29 (–1.1 s.d.)	14 (–0.8 s.d.)	7.6 (–2 s.d.)	20 (–0.51 s.d.)
Developmental delay	+	+ (severe)	+ (severe)	+	+	+	+ (severe)
Seizures	–	+ (late onset)	+	–	–	+ (IS at 5 months)	+
Brain MRI findings	At 8 years	At 9 months	At 2 months	At 12 months	At 7 months	At 8 months	At 8 months
PNH	+ (bilateral)	+ (bilateral)	+ (bilateral)	+ (bilateral)	+ (bilateral)	+ (bilateral)	+ (bilateral)
CC anomalies	–	–	–	Dysmorphic	Dysmorphic	–	–
Cortex anomalies	–	Cerebral atrophy	–	Frontal cortical dysplasia	PMG	–	–
Cerebellum anomalies	–	–	–	–	–	–	–
Other	Myopia	Optic atrophy Hearing impairment	Convergent Strabismus cryptorchidism	Hearing impairment,	Dysmorphic features	Abnormal visual evoked potentials, optic nerve pallor	Arthrogyposis, cryptorchidism, ptosis, complex strabismus

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

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

Shortly after these initial findings, we reinforced the implication of *NEDD4L* by the identification of additional *de novo* mutations in three unrelated patients with PNH (**Table 1**). The first patient (PNC; **Fig. 1d**, **Table 1** and **Supplementary Fig. 1d**) was identified through targeted screening of an MCD-related panel of genes in which we included *NEDD4L*. The second and third patients—DDDP110533 (**Fig. 1e**, **Table 1** and **Supplementary Fig. 1e**) and Phn31124 (**Table 1** and **Supplementary Fig. 1f**)—were identified through data sharing of trios exome sequenced and analyzed as part of the Deciphering Developmental Disorders and Epi4K Consortium studies. For all three patients, brain MRI results also showed the presence of PNH associated with syndactyly and neurodevelopmental delay (**Fig. 1d,e**, **Table 1** and **Supplementary Note**).

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

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

We first analyzed the expression of *Nedd4l* during mouse brain development. As illustrated in **Supplementary Figure 3a** (*in situ* hybridization at embryonic day (E) 15), *Nedd4l* transcripts were homogeneously distributed in the cortical plate, ventricular zone and ganglionic eminences. Moreover, analysis of *Nedd4l* expression by real-time qPCR in

developing mouse cortex from E12.5 to E18.5 showed a peak of expression at E16.5 (**Supplementary Fig. 3b**), a developmental stage characterized by both proliferation and migration.

To assess the cellular consequences of PNH-related mutations, we transfected N2A cells with cDNA constructs for wild-type *NEDD4L* and three different mutants and compared expression levels and localization by immunofluorescence (**Fig. 2**). We found that wild-type *NEDD4L* was highly expressed (**Fig. 2a** and **Supplementary Fig. 4**), and its localization was in line with what was previously reported²⁰. In contrast, PNH-related mutant proteins were hardly detectable. Indeed, 48 h after transfection, we only detected a faint signal, comparable to the background signal of cells transfected with control empty vector (**Fig. 2a**). Similar results were observed upon transfection of primary cultured mouse neurons (**Supplementary Fig. 4**). We also confirmed the lack of mutant *NEDD4L* expression by immunoblotting using protein extracts from transfected N2A cells (**Fig. 2b**). In view of these results, we hypothesized that PNH-associated mutants are unstable and examined *NEDD4L* protein expression in transfected cells treated with the proteasome inhibitor MG132. We observed by immunofluorescence and immunoblot experiments high levels of expression of PNH-related *NEDD4L* mutants (**Fig. 2a,b**).

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

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

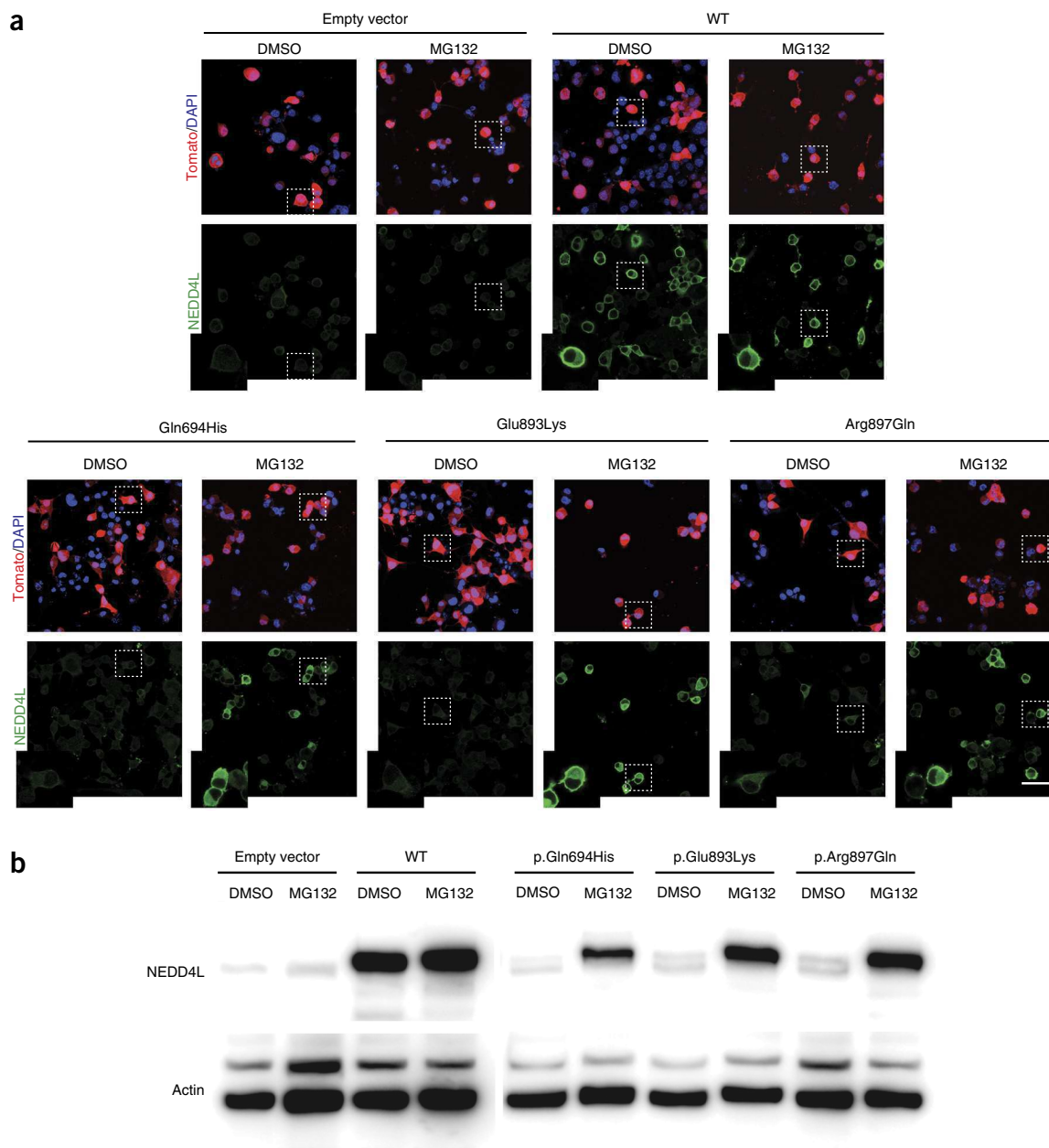


Figure 2 Expression and cellular localization of wild-type and mutant NEDD4L. **(a)** Tomato/DAPI and NEDD4L detection in N2A cells transfected with empty vector or cDNA constructs encoding wild-type (WT) or mutant NEDD4L. For each construct, cultured cells were treated with either DMSO or MG132. NEDD4L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

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

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

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

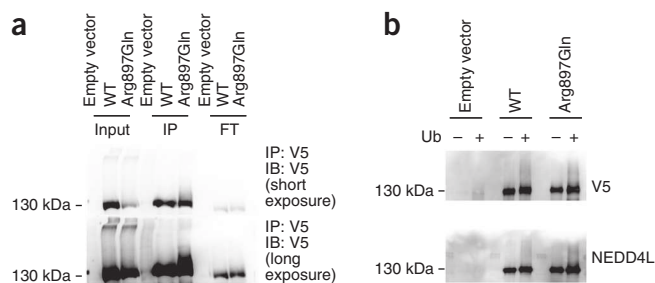


Figure 3 Ubiquitination activity of mutant NEDD4L. **(a)** Immunoprecipitation assay (IP; using antibody to V5 to precipitate tagged NEDD4L), with precipitates analyzed by immunoblot (IB) using antibodies to ubiquitin and V5 to detect ubiquitinated NEDD4L (FT, flow through). **(b)** Analysis of NEDD4L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

Second, we compared the ubiquitination ability of immunopurified V5-tagged NEDD4L (wild type and mutant) in an *in vitro* assay using recombinant E1 and E2 (UbcH7) enzymes with or without ubiquitin. In the presence of ubiquitin, both wild-type and mutant NEDD4L

exhibited ubiquitination activity as illustrated by the high-molecular-mass smear detected by antibody to NEDD4L (**Supplementary Fig. 7b**).

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

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

At first sight, the fact that PNH-related NEDD4L mutants are unstable led us to consider a haploinsufficiency mechanism. However, previously reported findings and our data made this hypothesis questionable. For instance, postmitotic neurons deficient for both *Nedd4-1* and *Nedd4l* (analyzed in conditional double-knockout mice) migrate properly to the cortical plate²¹. Also, neuronal migration disorders and PNH are not among the features associated with haploinsufficiency resulting from heterozygous copy number variations (CNVs) reported in DECIPHER databases. Moreover, one stop-gain and three frameshift mutations were reported in the ExAC data set from which individuals affected by severe pediatric disease have been excluded. Finally, we used an *in utero* RNA interference

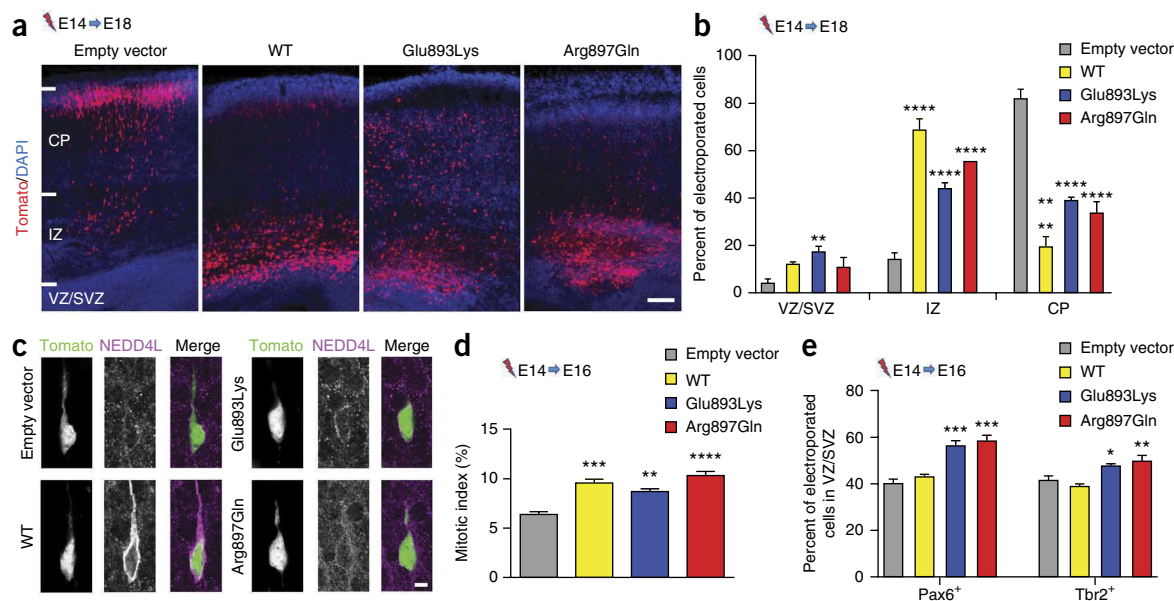


Figure 4 Effect of wild-type and mutant NEDD4L on neuronal position and progenitor proliferation. **(a)** Coronal sections of mouse brains at E18.5, 4 d after IUEP with empty vector, wild-type NEDD4L or mutant NEDD4L constructs in combination with a Tomato reporter construct. CP, cortical plate; IZ,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

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

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

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

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

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

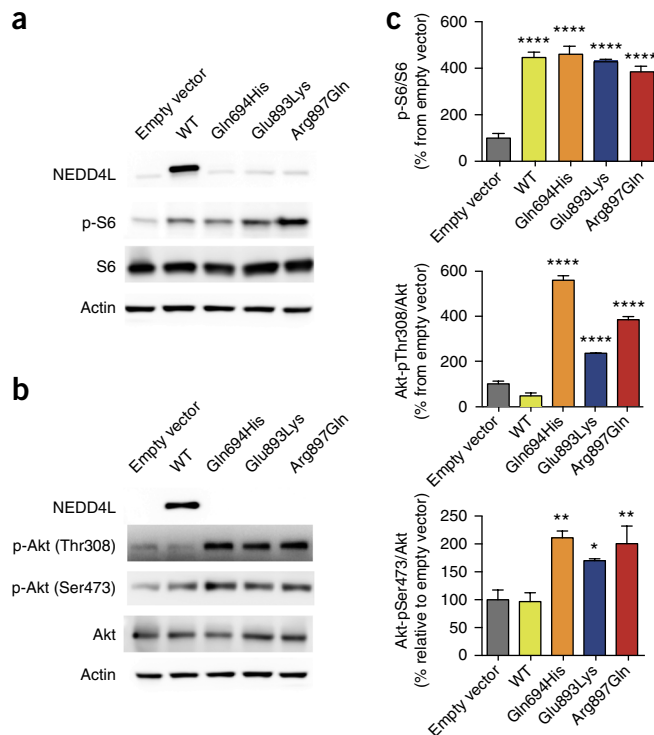


Figure 5 Wild-type NEDD4L and PNH-related mutants induce deregulation of mTORC1 and AKT activities. (a,b) Representative immunoblots using protein extracts from N2A cells transfected with empty vector or constructs for wild-type and mutant NEDD4L, showing the effect of wild-type and mutant NEDD4L on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

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

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

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

Pathways disrupted by wild-type and mutant NEDD4L causing PNH

Although the best known target of NEDD4L is the epithelial sodium channel (ENaC), shown to be involved in Liddle syndrome, a hereditary hypertension caused by elevated ENaC activity²⁶, compelling evidence demonstrating crucial regulatory roles of NEDD4L in developmental processes has recently emerged^{19,27}. In this study, we sought to investigate the consequences of wild-type and mutant NEDD4L on mTOR-dependent pathways for the following main reasons.

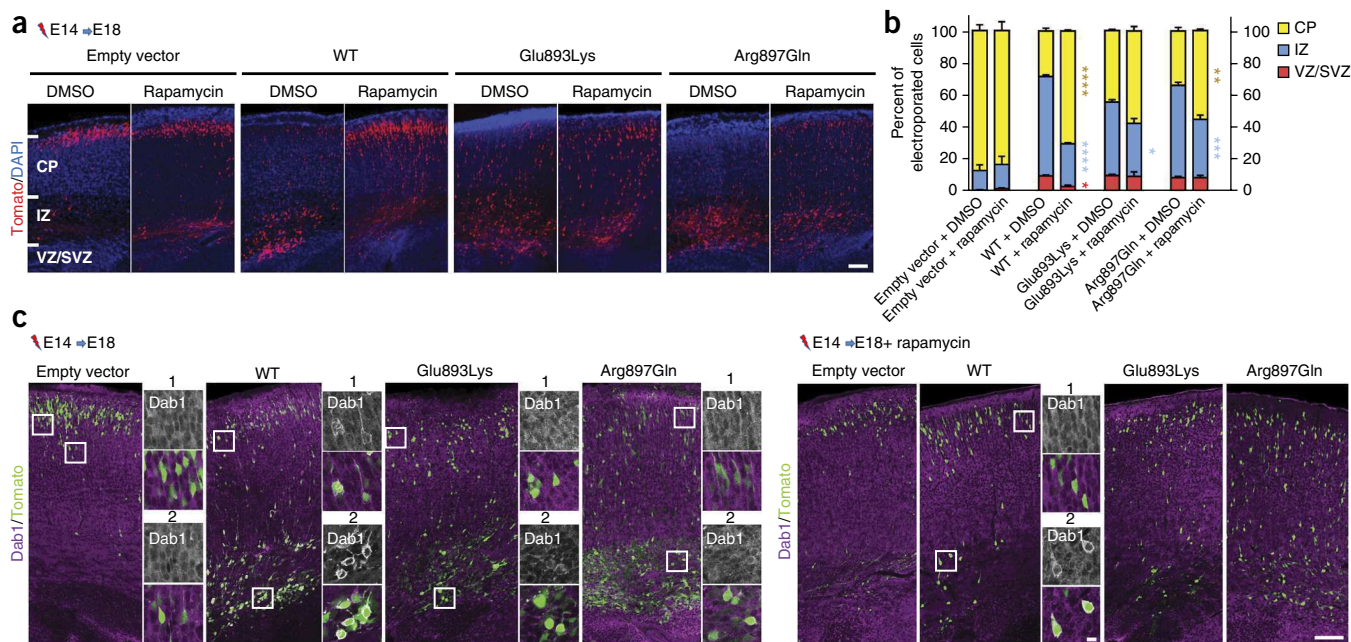


Figure 6 Effect of rapamycin treatment on neuronal positioning and Dab1 localization. **(a)** Confocal microscopy images of coronal sections from E18.5 brains electroporated at E14.5 with empty vector or constructs for wild-type and mutant NEDD4L together with a Tomato reporter vector. After IUEP, pregnant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

First, in view of the association of MCD and distal-limb abnormalities observed in patients described in this study, we wondered whether these developmental abnormalities represent a particular condition in the wide range of developmental brain and body disorders caused by dysfunctions of the interdependent phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)–AKT–mTOR pathways^{5,14}. Second, among the many identified signaling pathways that modulate neuronal migration, the recently reported insights linking neuronal migration deficit in tuberous sclerosis complex (TSC) pathology with a cascade involving mTOR signaling, E3 ubiquitin ligase Cul5 expression and Dab1 expression²⁸ also led us to consider a potential effect of NEDD4L on mTOR and Dab1 signaling pathways. Third, NEDD4L was recently identified as a critical player in regulation of the crosstalk between PI3K–mTORC2 and TGF- β –activin–Smad2–Smad3 (Smad2/3) signaling pathways^{29,30}.

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

To reinforce the relevance and specificity of NEDD4L mutant expression to the above highlighted findings, we tested the effect of the three control variants on S6 and Akt phosphorylation and found

that overexpression of the three NEDD4L variants was associated with a phosphorylation pattern that was similar to the one with wild-type NEDD4L (Supplementary Fig. 5b).

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

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

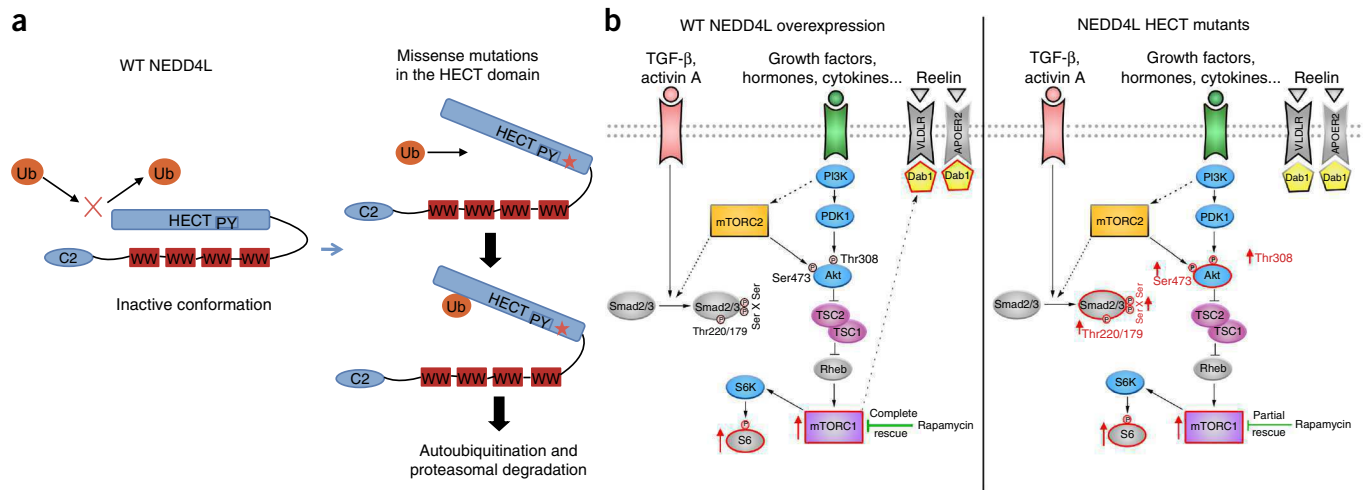


Figure 7 Models depicting the consequences of PNH-related mutations for NEDD4L stability and PI3K–Akt–mTOR and TGF- β –Smad pathways. (a) Wild-type NEDD4L (left) is shown in its closed and inactive conformation, and mutant NEDD4L (right) is shown with an alteration in the HECT domain predicted to lead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

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

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

DISCUSSION

Our findings demonstrate the critical role of NEDD4L in the regulation of processes involved in cortex development and implicate

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

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

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

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

effect on neuronal migration³⁵. In arrested neuronal cells electroporated with NEDD4L mutants, the unchanged distribution of Dab1 suggests that the neuronal migration defect caused by NEDD4L mutants could be mediated by a mechanism divergent from the one disrupted by overexpression of wild-type NEDD4L. In favor of this view is evidence suggesting that excess wild-type NEDD4L is associated with the disruption of signaling pathways regulated by mTORC1 and Dab1. In contrast, PNH-related mutants might act through deregulation of mTORC1, Akt, mTORC2 and TGF- β -Smad2/3 pathway activities (Fig. 7b). Although further investigations are required to define the exact mechanisms by which NEDD4L overexpression and variants affect these pathways, these hypotheses are supported by a recent study showing that NEDD4L catalyzes ubiquitination of PIK3CA and regulates PI3K-AKT signaling³⁵ and by our rapamycin-based experiments. Indeed, the consistent rescue of the neuronal position defect and restoration of the cellular distribution of Dab1 by rapamycin treatment suggest that the migration and positioning defects induced by overexpression of wild-type NEDD4L could be mediated by mTORC1 pathway deregulation.

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

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

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

METHODS

Methods and any associated references are available in the [online version of the paper](#).

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

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

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the patients and their families for their participation. We thank D. Rotin and C. Jiang (The Hospital for Sick Children) for kindly providing human V5-tagged *Nedd4-2* constructs (pcDNA3.1-nV5 wild type,

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

AUTHOR CONTRIBUTIONS

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

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

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

1. Caviness, V.S. Jr., Takahashi, T. & Nowakowski, R.S. Numbers, time and neocortical neurogenesis: a general developmental and evolutionary model. *Trends Neurosci.* **18**, 379–383 (1995).
2. Rakic, P. & Caviness, V.S. Jr. Cortical development: view from neurological mutants two decades later. *Neuron* **14**, 1101–1104 (1995).
3. Barkovich, A.J., Guerrini, R., Kuzniecky, R.I., Jackson, G.D. & Dobyns, W.B. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. *Brain* **135**, 1348–1369 (2012).
4. Francis, F. *et al.* Human disorders of cortical development: from past to present. *Eur. J. Neurosci.* **23**, 877–893 (2006).
5. Guerrini, R. & Dobyns, W.B. Malformations of cortical development: clinical features and genetic causes. *Lancet Neurol.* **13**, 710–726 (2014).
6. Fox, J.W. *et al.* Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron* **21**, 1315–1325 (1998).
7. Parrini, E. *et al.* Periventricular heterotopia: phenotypic heterogeneity and correlation with filamin A mutations. *Brain* **129**, 1892–1906 (2006).
8. Ferland, R.J. *et al.* Disruption of neural progenitors along the ventricular and subventricular zones in periventricular heterotopia. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 497–516 (2009).
9. Carabalona, A. *et al.* A glial origin for periventricular nodular heterotopia caused by impaired expression of filamin-A. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 1004–1017 (2012).
10. Lian, G. *et al.* Filamin A regulates neural progenitor proliferation and cortical size through Wee1-dependent Cdk1 phosphorylation. *J. Neurosci.* **32**, 7672–7684 (2012).
11. Sheen, V.L. *et al.* Mutations in *ARFGF2* implicate vesicle trafficking in neural progenitor proliferation and migration in the human cerebral cortex. *Nat. Genet.* **36**, 69–76 (2004).
12. Conti, V. *et al.* Periventricular heterotopia in 6q terminal deletion syndrome: role of the *C6orf70* gene. *Brain* **136**, 3378–3394 (2013).
13. Poirier, K. *et al.* Mutations in *TUBG1*, *DYNC1H1*, *KIF5C* and *KIF2A* cause malformations of cortical development and microcephaly. *Nat. Genet.* **45**, 639–647 (2013).

14. Mirzaa, G.M. *et al.* Characterisation of mutations of the phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit, *PIK3R2*, in perisylvian polymicrogyria: a next-generation sequencing study. *Lancet Neurol.* **14**, 1182–1195 (2015).
15. Kumar, S., Tomooka, Y. & Noda, M. Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**, 1155–1161 (1992).
16. Sudol, M., Chen, H.I., Bougeret, C., Einbond, A. & Bork, P. Characterization of a novel protein-binding module—the WW domain. *FEBS Lett.* **369**, 67–71 (1995).
17. Rizo, J. & Südhof, T.C. C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J. Biol. Chem.* **273**, 15879–15882 (1998).
18. Huang, L. *et al.* Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2–E3 enzyme cascade. *Science* **286**, 1321–1326 (1999).
19. Goel, P., Manning, J.A. & Kumar, S. NEDD4-2 (NEDD4L): the ubiquitin ligase for multiple membrane proteins. *Gene* **557**, 1–10 (2015).
20. Garrone, N.F., Blazer-Yost, B.L., Weiss, R.B., Lalouel, J.M. & Rohrwasser, A. A human polymorphism affects NEDD4L subcellular targeting by leading to two isoforms that contain or lack a C2 domain. *BMC Cell Biol.* **10**, 26 (2009).
21. Hsia, H.E. *et al.* Ubiquitin E3 ligase Nedd4-1 acts as a downstream target of PI3K/PTEN–mTORC1 signaling to promote neurite growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 13205–13210 (2014).
22. Franco, S.J., Martinez-Garay, I., Gil-Sanz, C., Harkins-Perry, S.R. & Müller, U. Reelin regulates cadherin function via Dab1/Rap1 to control neuronal migration and lamination in the neocortex. *Neuron* **69**, 482–497 (2011).
23. Olson, E.C., Kim, S. & Walsh, C.A. Impaired neuronal positioning and dendritogenesis in the neocortex after cell-autonomous Dab1 suppression. *J. Neurosci.* **26**, 1767–1775 (2006).
24. Sekine, K., Honda, T., Kawauchi, T., Kubo, K. & Nakajima, K. The outermost region of the developing cortical plate is crucial for both the switch of the radial migration mode and the Dab1-dependent “inside-out” lamination in the neocortex. *J. Neurosci.* **31**, 9426–9439 (2011).
25. Sekine, K. *et al.* Reelin controls neuronal positioning by promoting cell-matrix adhesion via inside-out activation of integrin $\alpha 5\beta 1$. *Neuron* **76**, 353–369 (2012).
26. Lifton, R.P., Gharavi, A.G. & Geller, D.S. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* **104**, 545–556 (2001).
27. Boase, N.A. & Kumar, S. NEDD4: the founding member of a family of ubiquitin–protein ligases. *Gene* **557**, 113–122 (2015).
28. Moon, U.Y. *et al.* Impaired reelin-Dab1 signaling contributes to neuronal migration deficits of tuberous sclerosis complex. *Cell Rep.* **12**, 965–978 (2015).
29. Gao, S. *et al.* Ubiquitin ligase Nedd4L targets activated Smad2/3 to limit TGF- β signaling. *Mol. Cell* **36**, 457–468 (2009).
30. Yu, J.S. *et al.* PI3K/mTORC2 regulates TGF- β /activin signalling by modulating Smad2/3 activity via linker phosphorylation. *Nat. Commun.* **6**, 7212 (2015).
31. Wiesner, S. *et al.* Autoinhibition of the HECT-type ubiquitin ligase Smurf2 through its C2 domain. *Cell* **130**, 651–662 (2007).
32. Bruce, M.C. *et al.* Regulation of Nedd4-2 self-ubiquitination and stability by a PY motif located within its HECT-domain. *Biochem. J.* **415**, 155–163 (2008).
33. Wang, J. *et al.* Calcium activates Nedd4 E3 ubiquitin ligases by releasing the C2 domain–mediated auto-inhibition. *J. Biol. Chem.* **285**, 12279–12288 (2010).
34. Escobedo, A. *et al.* Structural basis of the activation and degradation mechanisms of the E3 ubiquitin ligase Nedd4L. *Structure* **22**, 1446–1457 (2014).
35. Honda, T. & Nakajima, K. Proper level of cytosolic disabled-1, which is regulated by dual nuclear translocation pathways, is important for cortical neuronal migration. *Cereb. Cortex* **26**, 3219–3236 (2016).
36. Rivière, J.B. *et al.* *De novo* germline and postzygotic mutations in *AKT3*, *PIK3R2* and *PIK3CA* cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat. Genet.* **44**, 934–940 (2012).
37. Jansen, L.A. *et al.* PI3K/AKT pathway mutations cause a spectrum of brain malformations from megalencephaly to focal cortical dysplasia. *Brain* **138**, 1613–1628 (2015).

ONLINE METHODS

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

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

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

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

In situ hybridization. Mouse *Nedd4l* sense and antisense probes (nucleotides 462 to 1,470 of transcript NM_001114386) were synthesized using T7 RNA polymerase (Roche) from pJET2.1-*Nedd4l* (nucleotides 462 to 1,470) and pJET2.1-*Nedd4l* (nucleotides 1,470 to 462) plasmids. Non-radioactive RNA *in situ* hybridization on frozen brain sections was performed as previously described³⁹.

qRT-PCR. Total RNA was prepared from the brains of mouse embryos at different time points of development and from cultured transfected cells with TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific), and cDNA samples were synthesized with SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). qRT-PCR was performed in a LightCycler PCR instrument (Roche) using SYBR Green Master Mix (Roche). For transfection-based experiments, we used GFP as a normalizer (that is, systematically cotransfected as a reporter). For qRT-PCR

of transcripts expressed from transfected cDNA constructs, RNA samples were treated with Turbo DNase (Ambion, Life Technology) to avoid amplification from plasmid DNA. Also, to ensure that we amplified transcripts expressed from transfected constructs, for each sample real-time qPCR (in triplicate) was performed using the cDNA reaction products obtained with or without reverse transcriptase and primers specific to *NEDD4L* and *GFP*.

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

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

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

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

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

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

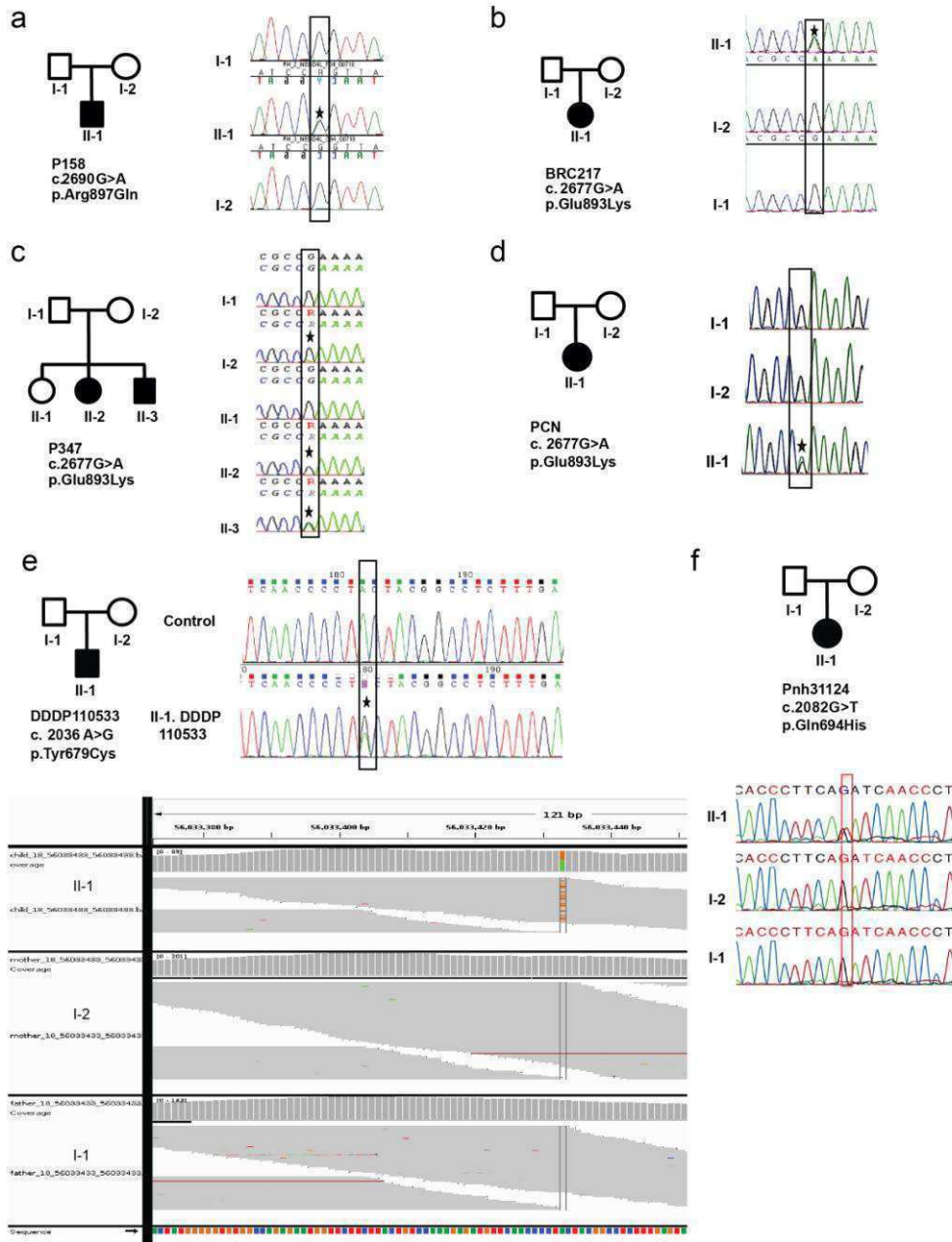
In utero electroporation. *In utero* electroporation was performed as described previously^{13,40} using Swiss mice (Janvier). Animal experimentations were performed at the IGBMC animal facilities. The study has Animal Experimentation Research Ethics Committee approval (2014-059). Briefly, timed pregnant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

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

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

Exome sequencing data deposition. Exome sequencing data have been deposited in the database of Genotypes and Phenotypes (dbGaP) under study accession [phs000653.v1.p1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=phs000653.v1.p1) for the Pnh31124 trio (proband EPGP012746) and the European Genome-phenome Archive (EGA) under accession [EGAD00001001848](https://www.ebi.ac.uk/ega/studies/EGAD00001001848) for the DDDP110533 trios. For the other patients analyzed by the whole-exome sequencing approach, no consent was obtained from the patients to deposit the data in a repository.

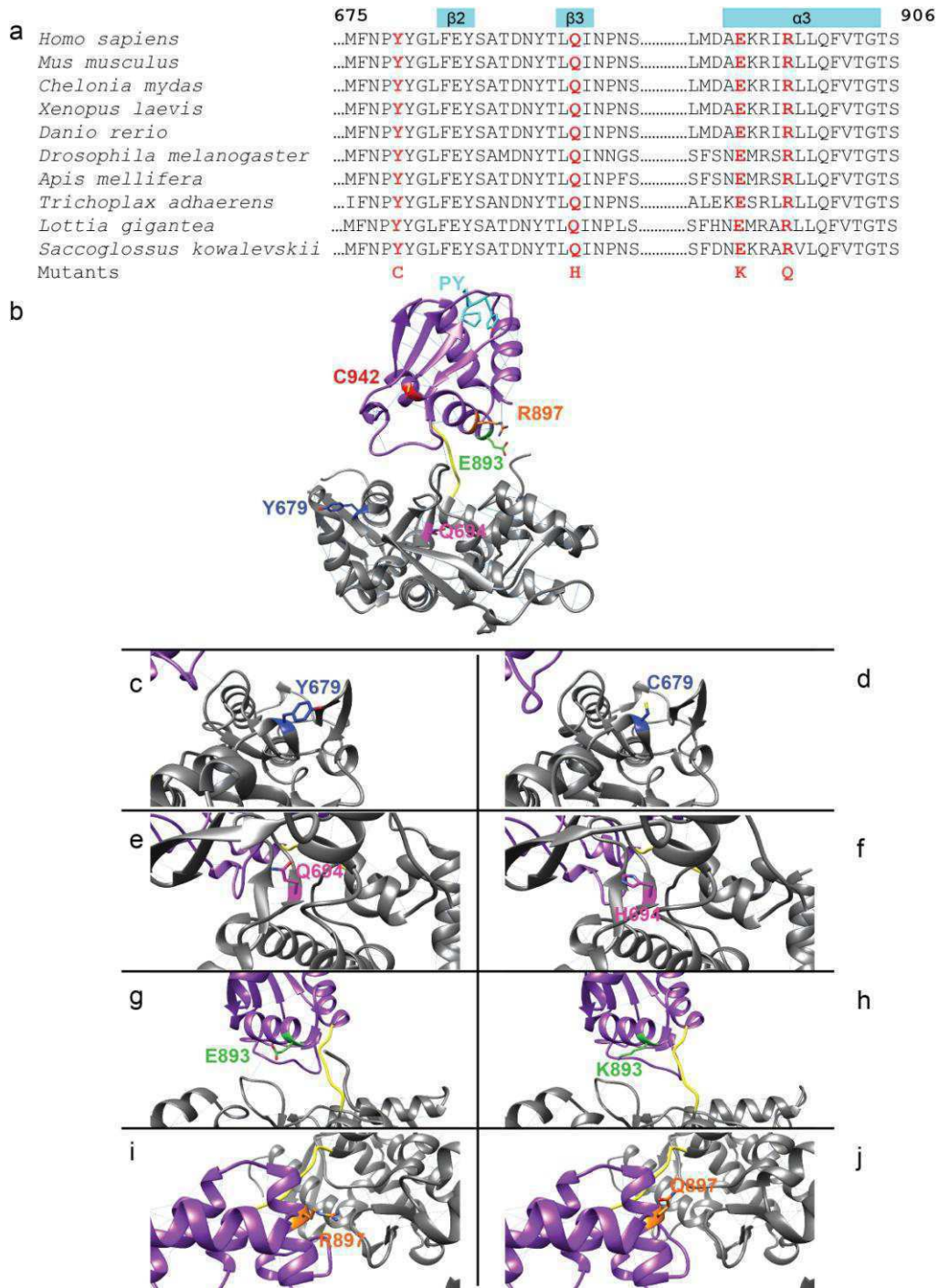
38. Wright, C.F. *et al.* Genetic diagnosis of developmental disorders in the DDD study: a scalable analysis of genome-wide research data. *Lancet* **385**, 1305–1314 (2015).
39. Cau, E., Gradwohl, G., Fode, C. & Guillemot, F. Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors.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



Supplementary Figure 1

Pedigrees and Sanger sequencing traces of *NEDD4L* mutations.

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



Supplementary Figure 2

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

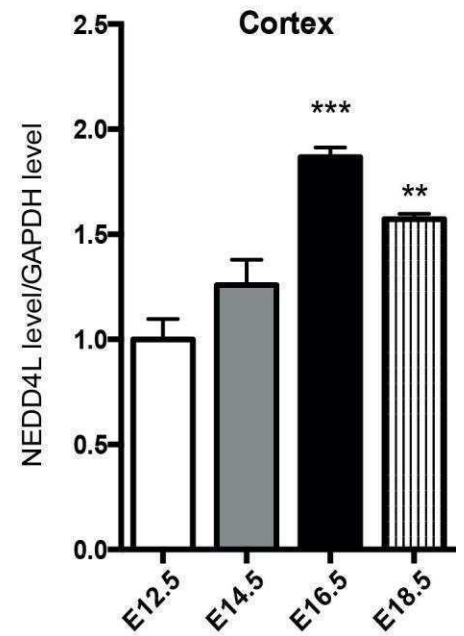
(a) Multiple-sequence alignment showing the high conservation of the HECT domain regions containing the Tyr679, Gln694, Glu893 and Arg897 residues. (b,c,e,g,i) Representation (visualized with Chimera) of the N-lobe and C-lobe of the HECT domain (PDB 2ONI) that are shown in gray and magenta, respectively,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

located on the surface of the $\alpha 3$ helix of the C-lobe that contains the active-site cysteine that forms the thioester with ubiquitin, the Tyr679 residue is located between the $\alpha 2$ helix and $\beta 2$ sheet of the N-lobe, and the Gln694 residue is located within the $\beta 3$ sheet of the N-lobe. Because of the physicochemical property changes (i.e., from acidic to basic for p.Glu893Lys or from basic to uncharged for p.Arg897Gln), NEDD4L function could be disrupted through the effects of the mutations on stability, interference with functional properties of the HECT domain or deregulation of interactions with substrates.

a



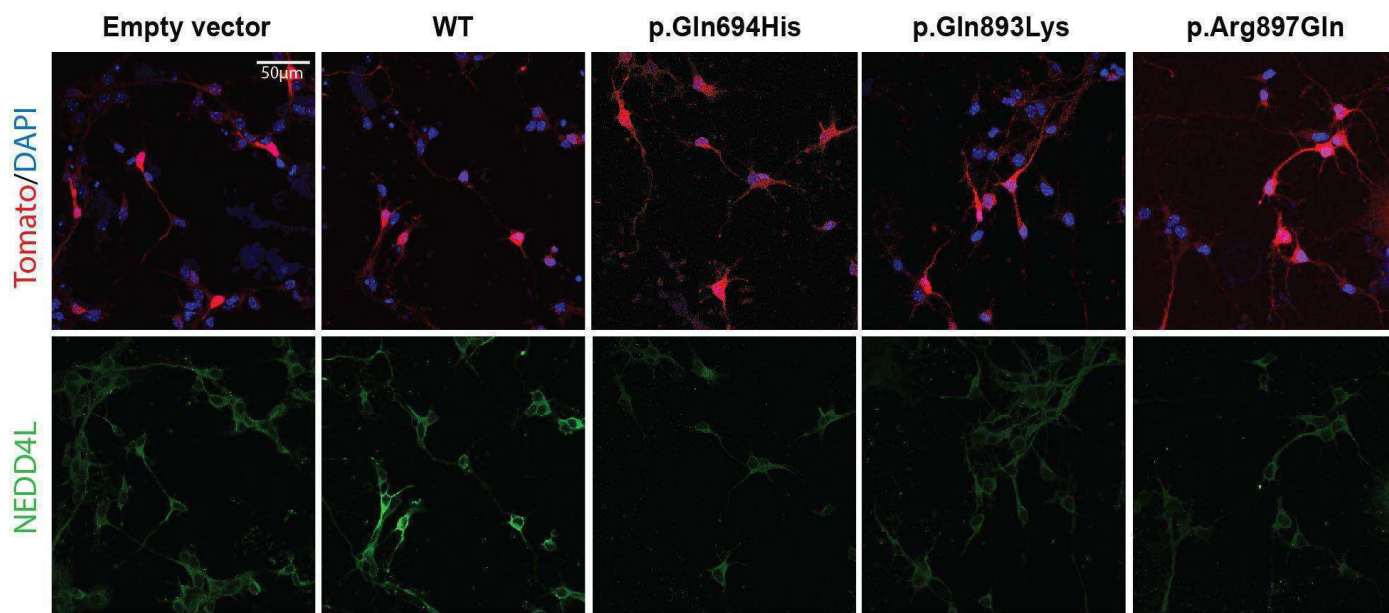
b



Supplementary Figure 3

NEDD4L expression in mouse developing cortex.

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

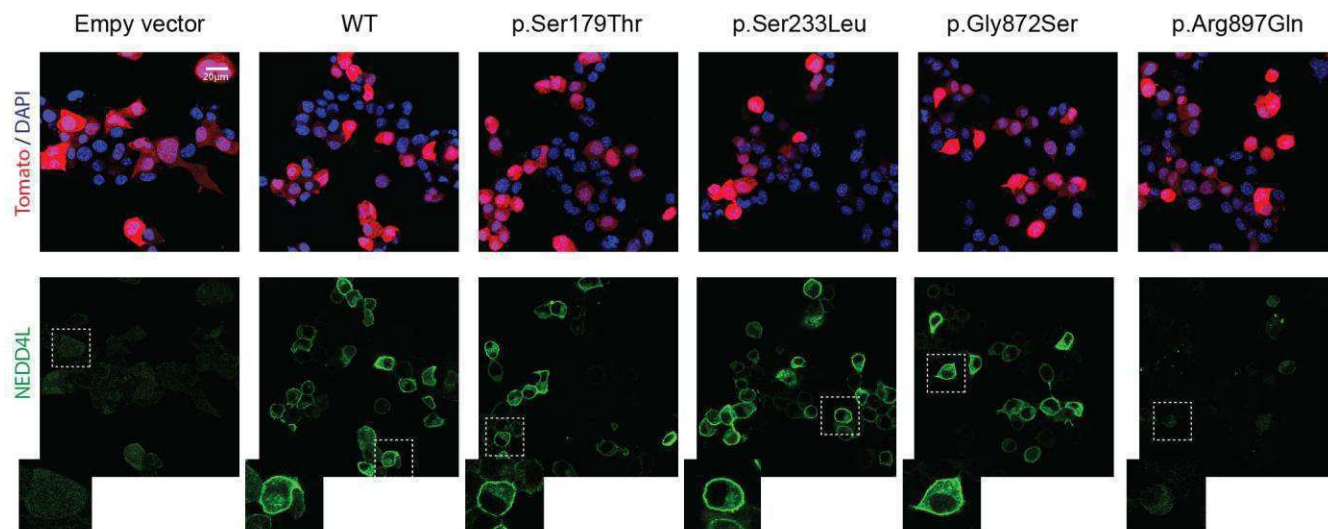


Supplementary Figure 4

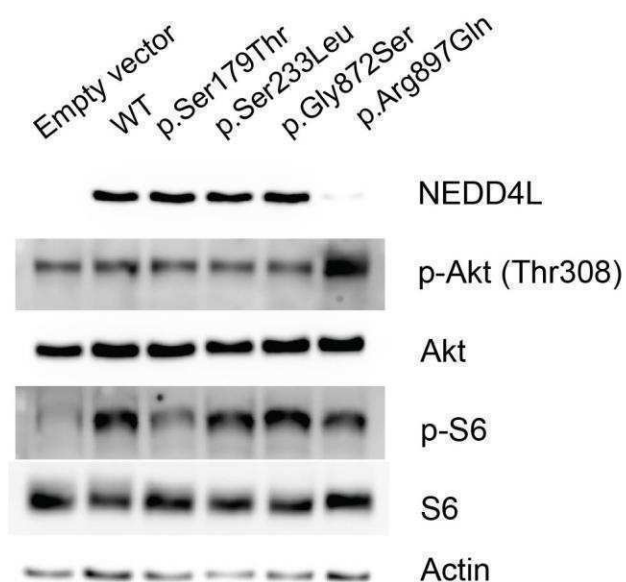
Expression and cellular localization of wild-type and NEDD4L mutants in cultured neuronal cells.

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

a



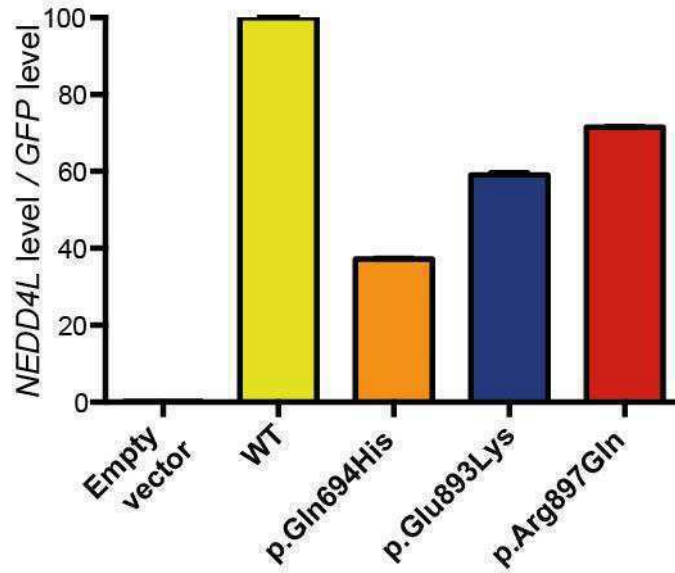
b



Supplementary Figure 5

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

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

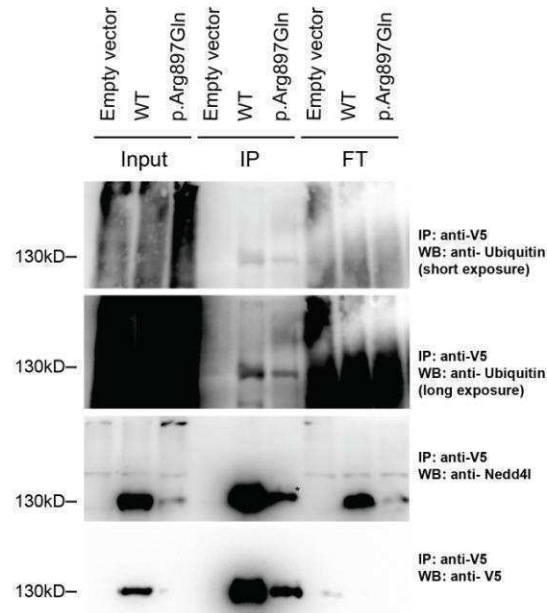


Supplementary Figure 6

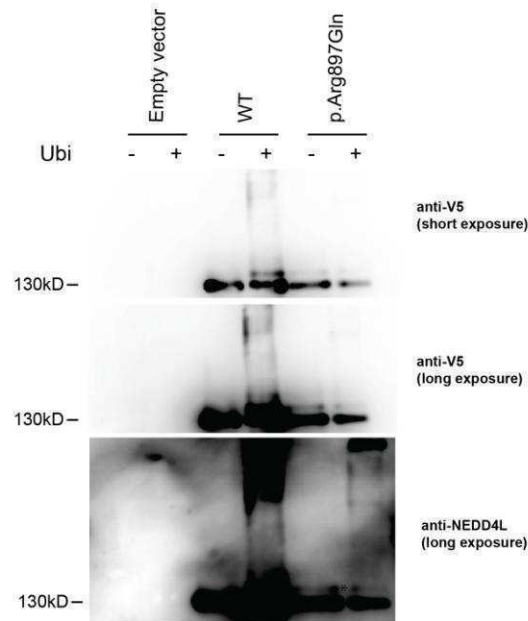
qRT-PCR analysis of *NEDD4L* transcripts in N2A cells transfected with wild-type and mutant *NEDD4L* cDNA constructs.

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

a



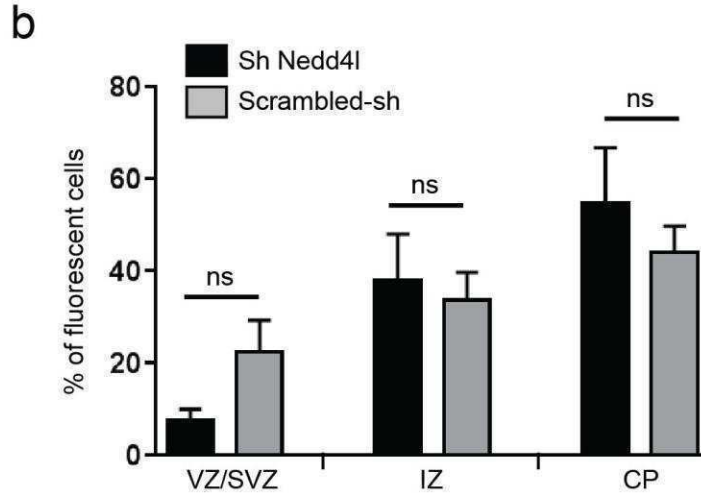
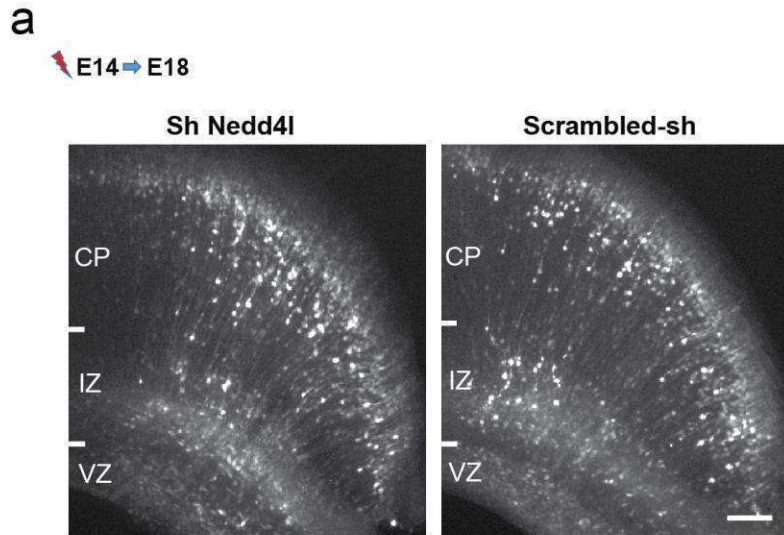
b



Supplementary Figure 7

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

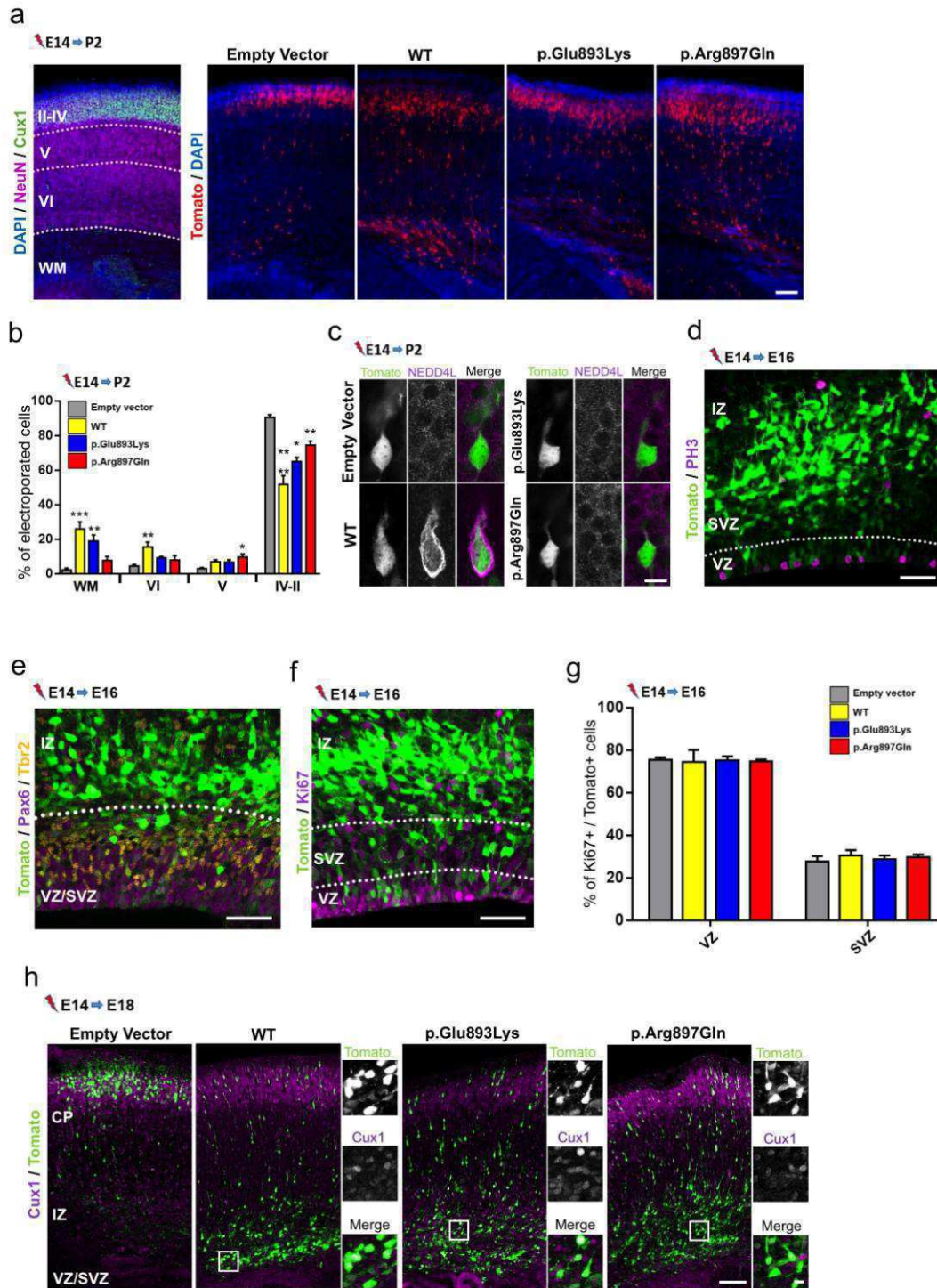
(a) Immunoprecipitation against V5-tagged Nedd4l and analysis by immunoblotting using antibodies to ubiquitin, V5 and NEDD4L. We can observe in the immunoprecipitate (IP) a band corresponding to NEDD4L and a smear of the ubiquitinated protein. (b) Wild-type and mutant NEDD4L were immunopurified from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



Supplementary Figure 8

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

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

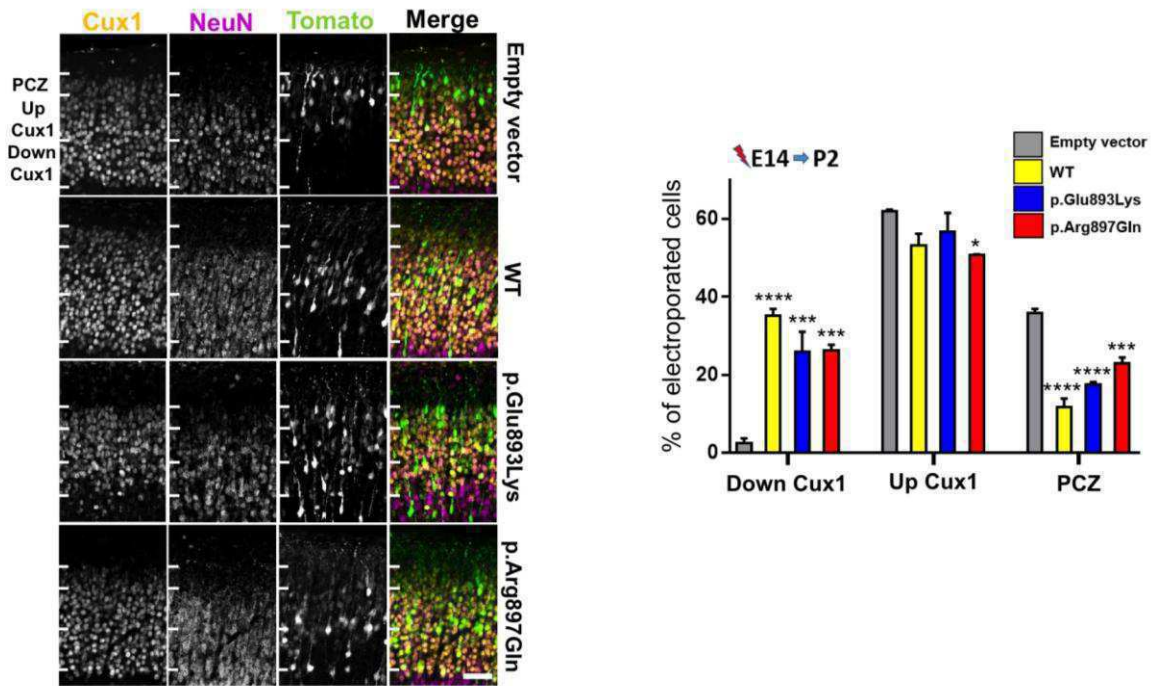


Supplementary Figure 9

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

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

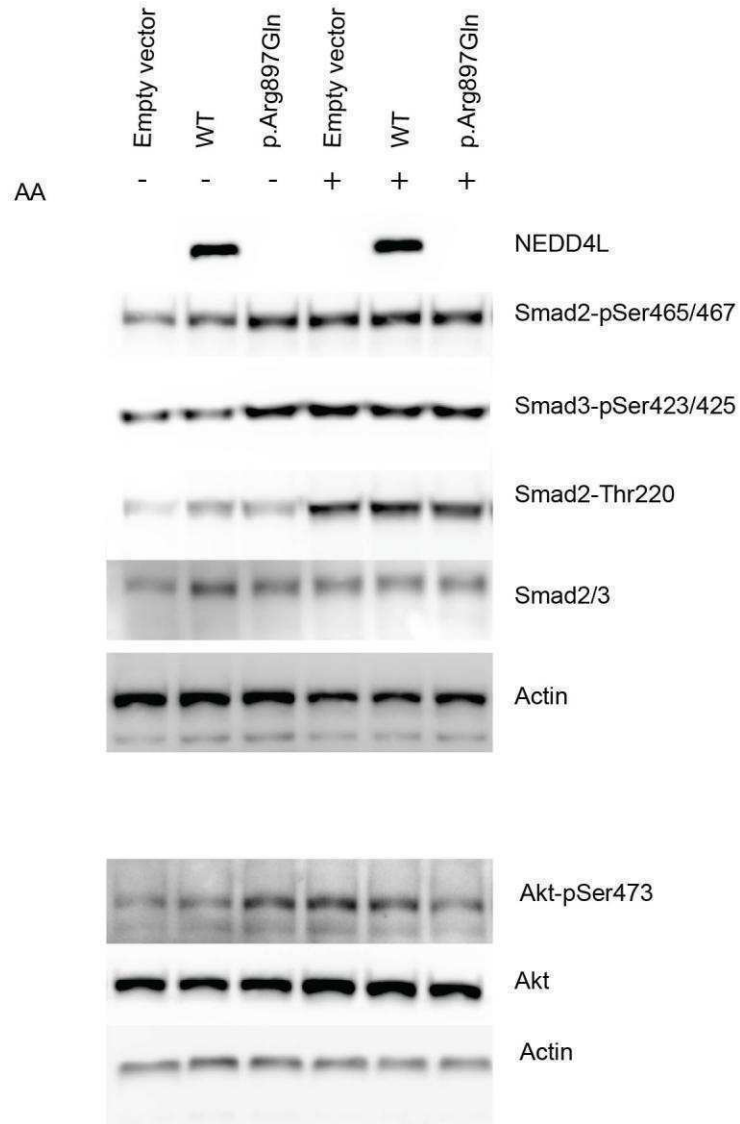
positioning in the white matter (WM), layers VI, V and II–IV. Scale bar, 100 μm . **(b)** Fluorescent neurons were quantified in the P2 brain regions highlighted in **a**: WM: empty vector (EV) versus WT, $P = 0.0004$, EV versus p.Glu893Lys, $P = 0.0078$; VI: EV versus WT, $P = 0.0091$; V: EV versus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



Supplementary Figure 10

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

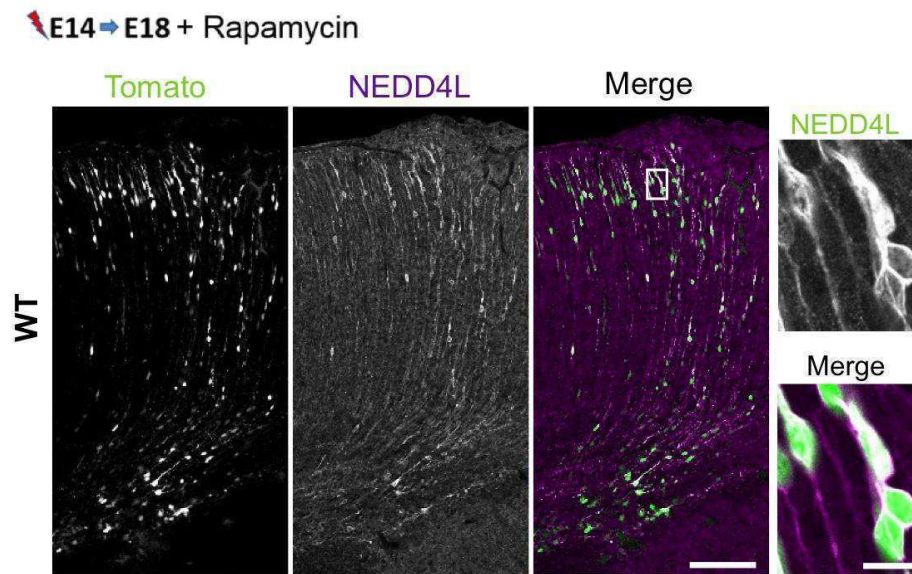
(a) Representative images of brain sections showing electroporated neurons with Tomato reporter and NEDD4L constructs at E14.5 analyzed at P2 for the Cux1 (yellow) and NeuN (magenta) markers. (b) Quantification of electroporated neurons in the upper layers of cortices reflecting analysis of the terminal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



Supplementary Figure 11

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

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



Supplementary Figure 12

NEED4L expression after rapamycin treatment.

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

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

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

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

Supplementary notes

Clinical and neuroimaging features of patients with NEDD4L mutations

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

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

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

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

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

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

FLNA sequenced with normal results.

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

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

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

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

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

Susceptibility variant for neurobehavioral phenotypes but didn't explain the patient's symptoms.

Patient is on DECIPHER as SMH 259695.

Dehydrocholesterol was normal as was screening of connexin genes.

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

FLNA sequenced with normal results.

Review age 4yr 1m. Walked independently at 3yr 11m. Hearing improved but still some mild impairment due to middle ear problems. Points and can use an I-Pad to communicate but no words.

Good general health, hyperactive and difficult to examine. OFC 48.5 cm (0.4-2nd).

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

No further MRI scans have been carried out since.

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

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

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

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

CGH array and *FLNA* screening were normal

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

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

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

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

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

Cardiac ultrasounds showed membranous interventricular communication. CGH array was normal

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

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

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

DDDP110533 (c.2036A>G Tyr679Cys)

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

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

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

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

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

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

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

Figure number	Condition/region	Statistical test, age, and genotype	exact p values	Average	"n" per condition	Inclusion/Exclusion	Blinded / not blinded
Fig 4b	E18 Positioning	E18 embryos electroporated at E14	P < 0.05 considered significant	Error bars are mean +/- SEM	Several slices from 4 brains (Empty vector, NEDD4L p.Glu893Lys)	Exclusion : Wrong region of electroporation	Not Blinded
	VZ/SVZ	<i>One way ANOVA, p=0,0036</i>			or from 3 brains (NEDD4L WT, NEDD4L p.Arg897Gln)	Exclusion : Different efficiency of electroporation	
		Dunnett's Multiple Comparison Test					
		Empty vector vs. NEDD4L WT	0,1206				
		Empty vector vs. NEDD4L p.Arg897Gln	0,2189				
		Empty vector vs. NEDD4L p.Glu893Lys	0,005				
	IZ	<i>One way ANOVA, p< 0,0001</i>					
		Dunnett's Multiple Comparison Test					
		Empty vector vs. NEDD4L WT	< 0,0001				
		Empty vector vs. NEDD4L p.Arg897Gln	< 0,0001				
		Empty vector vs. NEDD4L p.Glu893Lys	< 0,0001				
	CP	<i>One way ANOVA, p< 0,0001</i>					
		Dunnett's Multiple Comparison Test					
		Empty vector vs. NEDD4L WT	< 0,0001				
		Empty vector vs. NEDD4L p.Arg897Gln	< 0,0001				
		Empty vector vs. NEDD4L p.Glu893Lys	< 0,0001				

Fig 4d	Mitotic index	E16 embryos electroporated at E14	P < 0.05 considered significant	Error bars are mean +/- SEM	Several slices from 4 brains (Empty vector, NEDD4L p.Arg897Gln)	Exclusion : Different area of electroporation	Not Blinded
	VZ	<i>One way ANOVA, p < 0,0001</i>			or from 3 brains (NEDD4L WT, NEDD4L p.Glu893Lys)	Exclusion : Different efficiency of electroporation	
		Dunnett's Multiple Comparison Test					
		Empty vector vs. NEDD4L WT	0,0001				
		Empty vector vs. NEDD4L p.Arg897Gln	< 0,0001				
		Empty vector vs. NEDD4L p.Glu893Lys	0,0021				
Fig 4e	Pax6/Tbr2 quantification	E16 embryos electroporated at E14	P < 0.05 considered significant	Error bars are mean +/- SEM	Several slices from 3 brains for each conditions	Exclusion : Different area of electroporation	Not Blinded
	Pax6 in VZ/SVZ	<i>One way ANOVA, p < 0,0001</i>				Exclusion : Different efficiency of electroporation	
		Dunnett's Multiple Comparison Test					
		Empty vector vs. NEDD4L WT	0,6346				
		Empty vector vs. NEDD4L p.Arg897Gln	0,0001				
		Empty vector vs. NEDD4L p.Glu893Lys	0,0003				
	Tbr2 in VZ/SVZ	<i>One way ANOVA, p = 0,0003</i>					
		Dunnett's Multiple Comparison Test					
		Empty vector vs. NEDD4L WT	0,3653				
		Empty vector vs. NEDD4L p.Arg897Gln	0,0014				
		Empty vector vs. NEDD4L p.Glu893Lys	0,0147				
Fig 5c	pS6/S6 (% from empty vector)	One way Anova, p < 0,0001	P < 0.05 considered significant	Error bars are mean +/- SEM	3 independent experiments	No exclusion, inclusion criteria	Not blinded

		Dunnett's Multiple Comparison Test					
		Empty vector vs. WT	< 0,0001				
		Empty vector vs. p.Glu893Lys	< 0,0001				
		Empty vector vs. p.Arg897Gln	< 0,0001				
		Empty vector vs. p.Gln694His	< 0,0001				
	Akt-pT308/Akt (% from empty vector)	One way Anova, p< 0,0001					
		Dunnett's Multiple Comparison Test					
		Empty vector vs. WT	0,0602				
		Empty vector vs. p.Glu893Lys	< 0,0001				
		Empty vector vs. p.Arg897Gln	< 0,0001				
		Empty vector vs. p.Gln694His	< 0,0001				
	Akt-pS473/Akt (% from empty vector)	One way Anova, p=0,0012					
		Dunnett's Multiple Comparison Test					
		Empty vector vs. WT	0,9998				
		Empty vector vs. p.Glu893Lys	0,0496				
		Empty vector vs. p.Arg897Gln	0,0053				
		Empty vector vs. p.Gln694His	0,0025				
Fig 6b	E18 Positioning DMSO/Rapa mycin	E18 embryos electroporated at E14	P < 0.05 considered significant	Error bars are mean +/- SEM	Several slices from 3 brains for each conditions	Exclusion : Different area of electroporation	Not Blinded
	VZ/SVZ	Two way ANOVA, p< 0,0001				Exclusion : Different efficiency of electroporation	

		Sidak's Multiple Comparison Test					
		Empty vector (DMSO) vs. Empty vector (Rapamycin)	0,9963				
		NEDD4L WT (DMSO) vs. NEDD4L WT (Rapamycin)	0,012				
		NEDD4L p.Glu893Lys (DMSO) vs. NEDD4L p.Glu893Lys (Rapamycin)	0,998				
		NEDD4L p.Arg897Gln (DMSO) vs. NEDD4L p.Arg897Gln (Rapamycin)	> 0,9999				
	IZ	<i>Two way ANOVA, p < 0,0001</i>					
		Sidak's Multiple Comparison Test					
		Empty vector (DMSO) vs. Empty vector (Rapamycin)	0,9714				
		NEDD4L WT (DMSO) vs. NEDD4L WT (Rapamycin)	< 0,0001				
		NEDD4L p.Glu893Lys (DMSO) vs. NEDD4L p.Glu893Lys (Rapamycin)	0,0377				
		NEDD4L p.Arg897Gln (DMSO) vs. NEDD4L p.Arg897Gln (Rapamycin)	0,0004				
	CP	<i>Two way ANOVA, p < 0,0001</i>					
		Sidak's Multiple Comparison Test					

		Empty vector (DMSO) vs. Empty vector (Rapamycin)	0,9453				
		NEDD4L WT (DMSO) vs. NEDD4L WT (Rapamycin)	< 0,0001				
		NEDD4L p.Glu893Lys (DMSO) vs. NEDD4L p.Glu893Lys (Rapamycin)	0,0566				
		NEDD4L p.Arg897Gln (DMSO) vs. NEDD4L p.Arg897Gln (Rapamycin)	0,0013				
Supp. Fig 3b	Q-PCR analysis of NEDD4L expression	<i>One way ANOVA, p < 0,0001</i>	P < 0.05 considered significant	Error bars are mean +/- SEM	4 brains from independant litters	No exclusion, inclusion criteria	Not blinded
		Bonferroni's Multiple Comparison Test					
		E12 vs E16	< 0,0001				
		E12 vs E18	0,002				
Supp. Fig 8b	E18 Positioning ShRNA	E18 embryos electroporated at E14	P < 0.05 considered significant	Error bars are mean +/- SEM	Several slices from 4 brains (Sh NEDD4L) or from 5 brains (Scrambled-sh)	Exclusion : Different area of electroporation	Not Blinded
		<i>t-test, Two-tailed</i>				Exclusion : Different efficiency of electroporation	
	VZ	Sh NEDD4L vs. Scrambled-sh	0,105				
	IZ	Sh NEDD4L vs. Scrambled-sh	0,7065				
	CP	Sh NEDD4L vs. Scrambled-sh	0,4186				
Supp. Fig 9b	P2 Positioning	P2 pups electroporated at E14	P < 0.05 considered significant	Error bars are mean +/- SEM	Several slices from 4 brains (NEDD4L WT)	Exclusion : Different area of electroporation	Not Blinded
	WM	<i>One way ANOVA, p=0,0002</i>			or from 3 brains (Empty vector, NEDD4L p.Arg897Gln, NEDD4L p.Glu893Lys)	Exclusion : Different efficiency of electroporation	
		Dunnett's Multiple Comparison Test					
		Empty vector vs. NEDD4L WT	0,0004				

		Empty vector vs. NEDD4L p.Arg897Gln	0,5172				
		Empty vector vs. NEDD4L p.Glu893Lys	0,0078				
	Layer VI	<i>One way ANOVA, p=0,0073</i>					
		Dunnett's Multiple Comparison Test					
		Empty vector vs. NEDD4L WT	0,0091				
		Empty vector vs. NEDD4L p.Arg897Gln	0,6372				
		Empty vector vs. NEDD4L p.Glu893Lys	0,3782				
	Layer V	<i>One way ANOVA, p=0,0644</i>					
		Dunnett's Multiple Comparison Test					
		Empty vector vs. NEDD4L WT	0,1571				
		Empty vector vs. NEDD4L p.Arg897Gln	0,0185				
		Empty vector vs. NEDD4L p.Glu893Lys	0,2234				
	Layer IV-II	<i>One way ANOVA, p< 0,0001</i>					
		Dunnett's Multiple Comparison Test					
		Empty vector vs. NEDD4L WT	< 0,0001				
		Empty vector vs. NEDD4L p.Arg897Gln	0,0448				
		Empty vector vs. NEDD4L p.Glu893Lys	0,0024				
Supp. Fig 9f	Ki67 quantification	E16 embryos electroporated at E14	P < 0.05 considered significant	Error bars are mean +/- SEM	Several slices from 3 brains for each conditions	Exclusion : Different area of electroporation	Not Blinded
	VZ	<i>One way ANOVA, p=0,9994</i>				Exclusion : Different efficiency of electroporation	

		Dunnett's Multiple Comparison Test					
		Empty vector vs. NEDD4L WT	0,9983				
		Empty vector vs. NEDD4L p.Arg897Gln	0,9997				
		Empty vector vs. NEDD4L p.Glu893Lys	> 0,9999				
	SVZ	<i>One way ANOVA, p=0,8244</i>					
		Dunnett's Multiple Comparison Test,					
		Empty vector vs. NEDD4L WT	0,6743				
		Empty vector vs. NEDD4L p.Arg897Gln	0,8589				
		Empty vector vs. NEDD4L p.Glu893Lys	0,9932				
Supp. Fig 10	P2 Terminal translocation	P2 pups electroporated at E14	P < 0.05 considered significant	Error bars are mean +/- SEM	Several slices from 3 brains for each conditions	Exclusion : Different area of electroporation	Not Blinded
	Down Cux1	<i>One way ANOVA, p< 0,0001</i>				Exclusion : Different efficiency of electroporation	
		Dunnett's Multiple Comparison Test					
		Empty vector vs. NEDD4L WT	< 0,0001				
		Empty vector vs. NEDD4L p.Arg897Gln	0,0003				
		Empty vector vs. NEDD4L p.Glu893Lys	0,0004				
	Up Cux1	<i>One way ANOVA, p=0,0285</i>					
		Dunnett's Multiple Comparison Test					
		Empty vector vs. NEDD4L WT	0,1071				
		Empty vector vs. NEDD4L p.Arg897Gln	0,0371				

		Empty vector vs. NEDD4L p.Glu893Lys	0,4456				
	PCZ	<i>One way ANOVA, p < 0,0001</i>					
		Dunnett's Multiple Comparison Test					
		Empty vector vs. NEDD4L WT	< 0,0001				
		Empty vector vs. NEDD4L p.Arg897Gln	0,0005				
		Empty vector vs. NEDD4L p.Glu893Lys	< 0,0001				

Discussion/Perspectives

1. Un mécanisme physiopathologique original

Les travaux menés au cours de cette thèse ont permis notamment de montrer une absence de surexpression de la protéine NEDD4L mutante *in cellulo* et *in vivo*, ces observations sont corrélées avec des anomalies du positionnement des neurones au cours du développement. Cette absence de surexpression est corrigée lorsqu'on inhibe l'action du protéasome en traitant les cellules au MG132. Les protéines mutantes sont donc produites mais vraisemblablement dégradées très rapidement par le protéasome.

Les mutations étudiées et responsables d'HNP sont localisées au niveau du domaine catalytique HECT de la protéine et de précédentes études ont montré que des mutations dans ce domaine conduisaient à une instabilité de la protéine (Bruce et al., 2008). Les auteurs ont en effet montré que les E3 ubiquitine ligases à domaine HECT contenaient un motif LPXY au sein du domaine HECT et localisé à proximité d'un résidu cystéine. Leur hypothèse est que ce motif interagirait avec l'un des quatre domaines WW (domaines riches en acides aminés tryptophane et liant les substrats) de la partie N-terminale de NEDD4L, sa conformation serait donc modifiée et la protéine n'aurait ainsi plus la capacité d'être ubiquitinée. Ce mécanisme pourrait participer à l'activité de NEDD4L. En effet en l'absence de substrat, la protéine se replie pour ne pas être dégradée, et lorsqu'un substrat se présente, celui-ci présente une affinité plus forte que le domaine HECT pour les domaines WW ce qui lui permet de défaire l'interaction précédente et d'ubiquitiner le substrat. En revanche, la mutation p.Tyr971Ala localisée dans le domaine HECT et rapportée par Bruce et al. (2008) empêcherait cette interaction, et permettrait ainsi l'ubiquitination de la protéine NEDD4L soit pas elle-même (auto-ubiquitination) soit pas d'autres E3 ubiquitine ligases (Figure 36).

Une autre étude (Escobedo et al., 2014) montre une interaction *in vitro* entre le domaine HECT et le domaine C2 et que cette interaction participerait aussi à l'auto-ubiquitination de la protéine NEDD4L (Figure 37). Dans cet article ils montrent qu'un afflux de Ca^{2+} dans la cellule conduit à une abolition de l'interaction C2-HECT et à une interaction du C2 avec le PIP2 à la membrane formant ainsi de l'IP3. La protéine NEDD4L serait alors fonctionnelle et pourrait s'auto-ubiquitiner en faisant interagir le domaine WW3 d'une protéine avec le domaine HECT d'une autre (Figure 36). On peut alors imaginer qu'une mutation dans le domaine HECT pourrait conduire aussi à une absence d'interaction C2-HECT et ainsi déstabiliser la protéine.

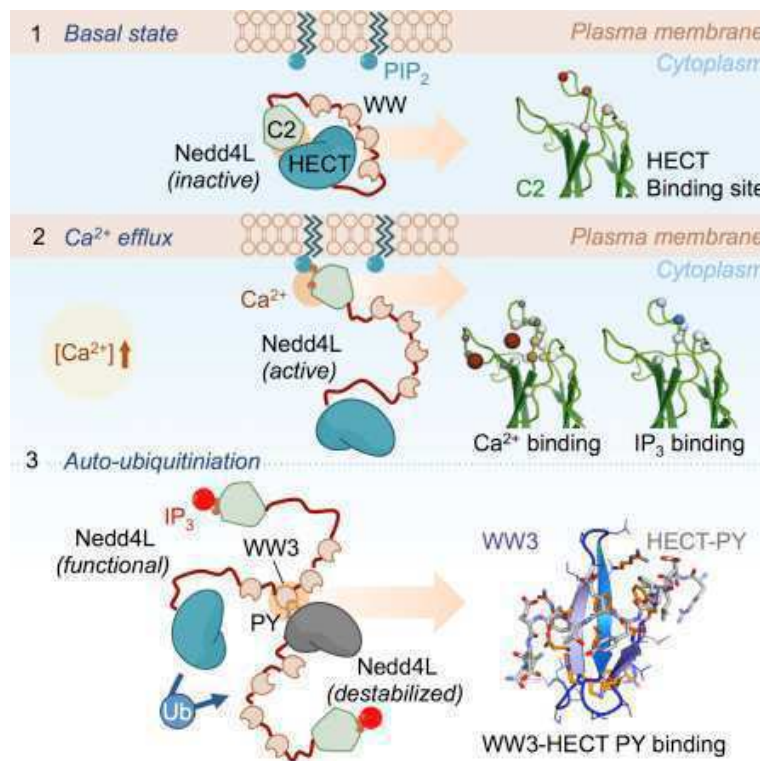


Figure 36 : Modèle de l'auto-ubiquitination de NEDD4L (voir texte principal). D'après Escobedo et al., 2014.

Ce type de mécanisme ne semble pas uniquement observé avec NEDD4L, en effet d'autres E3 ubiquitine ligases à domaine HECT semblent utiliser le même mécanisme de changement de conformation pour réguler leur stabilité et leur fonctionnement. C'est notamment le cas de SMURF2 qui fait interagir son domaine HECT avec son domaine C2 ce qui diminue son ubiquitination et sa dégradation (Wiesner et al., 2007). De plus, les auteurs ont montré que la délétion du domaine C2 de SMURF2 conduisait à son auto-ubiquitination ainsi qu'une inhibition de l'ubiquitination de ses substrats (Wiesner et al., 2007) (Figure 37). Les auteurs ont aussi montré que SMAD7, un substrat de SMURF2 pouvait se lier à SMURF2 ce qui défait l'interaction C2-HECT qui peut alors ubiquitiner ses substrats. Parmi les autres protéines testées, il semble que NEDD4-1 et WWP2 fonctionnent comme Smurf2 avec une interaction C2-HECT alors qu'ils montrent que NEDD4L et ITCH ne sont pas déstabilisés par la délétion de leur domaine C2, ce qui est en faveur d'une interaction WW-HECT pour NEDD4L comme l'ont montré Bruce et al. (2008). Pour ITCH il a été montré que la phosphorylation d'une région précédant les domaines WW inhibe la liaison WW-HECT et augmente ainsi son activité (Figure 38) (Gallagher et al., 2006).

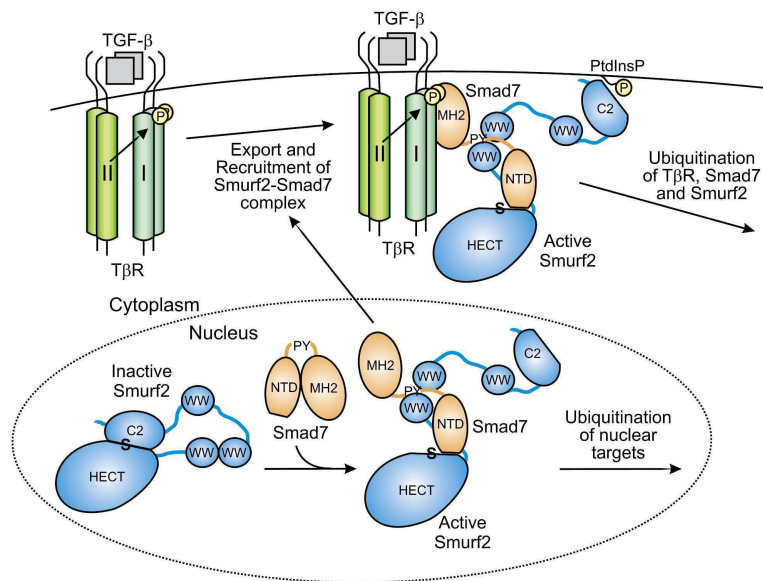


Figure 37 : Modèle de l'auto-inhibition et de l'activation de SMURF2 via la liaison de son domaine N-Terminal avec son domaine C-Terminal. D'après Wiesner et al., 2007.

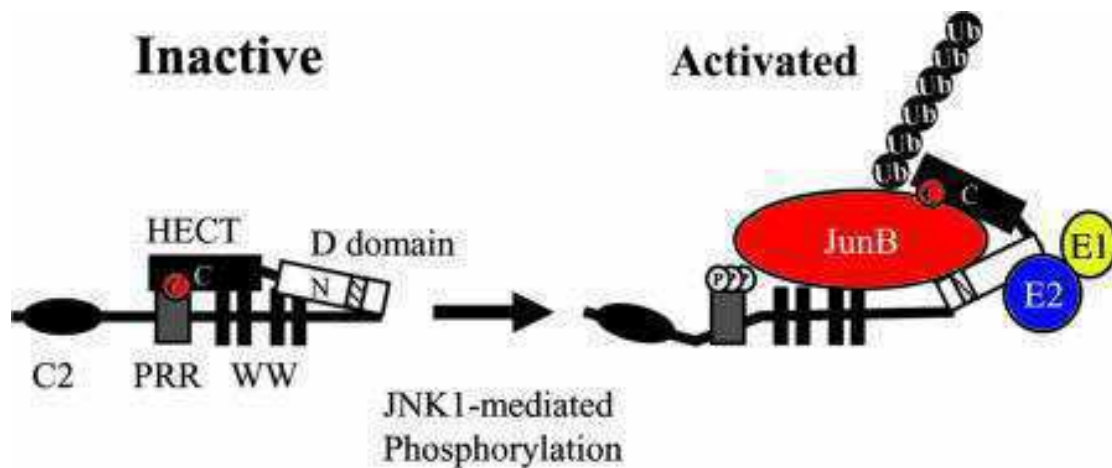


Figure 38 : L'activité d'Itch est régulée par un changement de conformation dû à sa phosphorylation. Quand la protéine n'est pas phosphorylée, le domaine HECT peut interagir avec les domaines PRR et WW. Lorsque JNK1 se lie au domaine D (le domaine hachuré situé au milieu du domaine HECT), il phosphoryle Itch ce qui altère la conformation des domaines WW et réduit l'interaction HECT/WW ce qui active Itch. Le domaine WW de Itch peut alors recruter des substrats comme JunB. D'après Gallagher et al., 2006.

Ce mécanisme semble donc assez récurrent chez les E3 ubiquitine ligases à domaine HECT, mais c'est donc la première fois, à notre connaissance, que des mutations dans ce domaine ont été montrées comme responsables d'une instabilité des protéines qui conduiraient à une pathologie et notamment une malformation du développement cortical.

La spécificité des conséquences des mutations dans le domaine HECT sur la stabilité de NEDD4La aussi été étayée par l'étude d'une autre mutation dans le gène NEDD4L, la mutation p.Pro294Arg qui a été identifiée chez un patient atteint d'épilepsie photosensible, mais sans hétérotopie nodulaire périventriculaire, ni syndactylie. Cette mutation est située entre deux domaines riches en tryptophanes (domaines WW). Les mécanismes physiopathologiques responsables de cette épilepsie semblent très différents des mutations dans le domaine HECT car on n'observe aucune instabilité de la protéine (Figure 39).

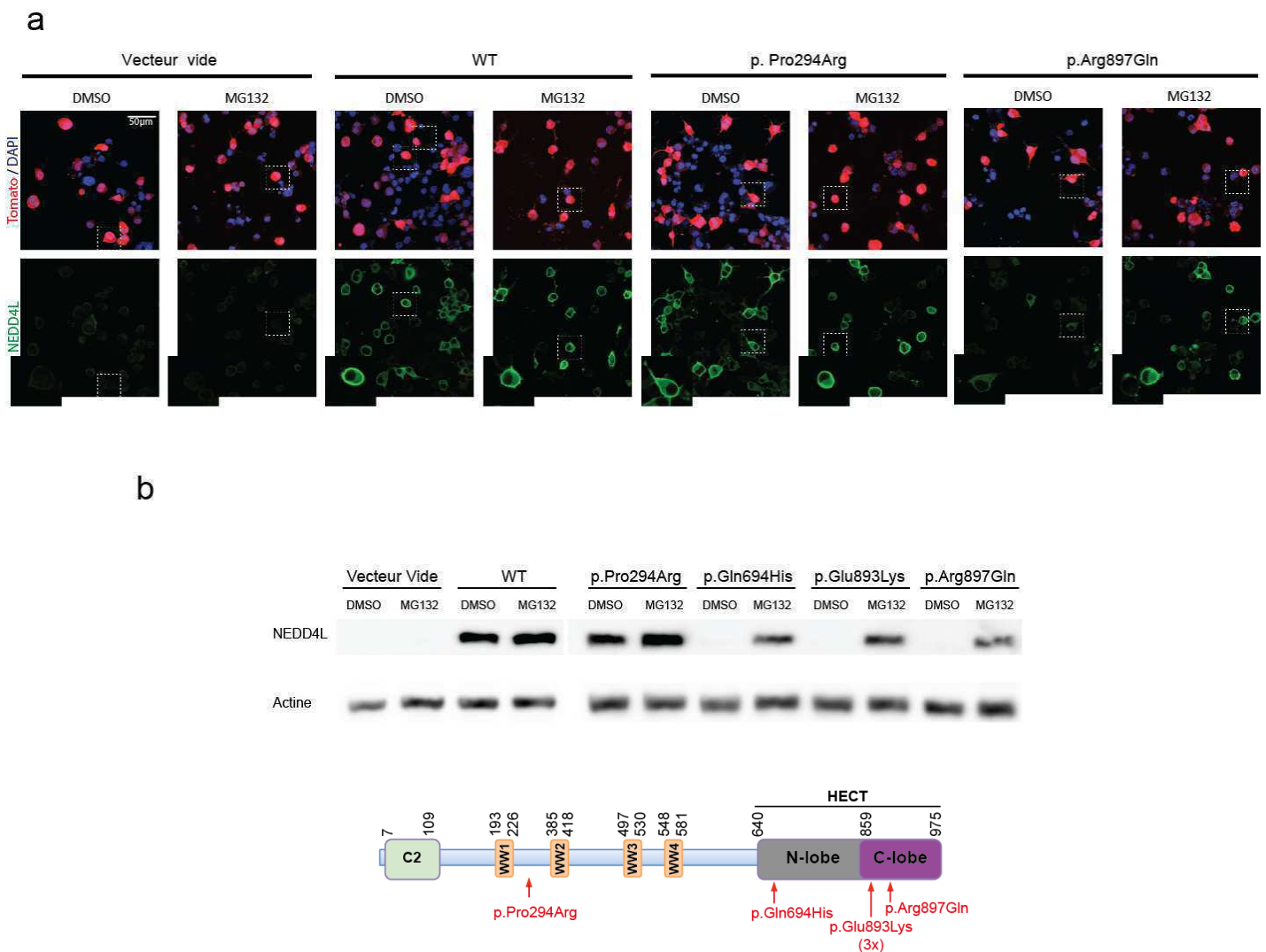


Figure 39 : La mutation p.Pro294Arg responsable d'épilepsie photosensible chez un patient ne présente pas le même phénotype d'instabilité que les mutants situés dans le domaine HECT.

Les protéines mutantes dans le domaine HECT étant instables nous avons voulu voir si la sous-expression de la protéine WT conduisait aussi à un mauvais positionnement des neurones chez les souris électroporées avec une construction shNedd4L. Nous n'avons observés aucun défaut de positionnement des neurones (Figure supplémentaire 8 de l'article). De plus, une étude précédente (Hsia et al., 2014) a montré que les souris double KO conditionnel pour Nedd4-1 et Nedd4l ne présentaient aucun défaut de positionnement des neurones dans le cortex mais avaient des défauts de croissance axonale. De plus, les souris cKO pour Nedd4l seulement, ont aussi une diminution du nombre de neurites (Hsia et al., 2014). D'après cette étude, Nedd4l serait indispensable à la neuritogenèse et donc aurait un rôle clé dans la fin de la corticogenèse. L'étude des souris cKO et nos expériences d'électroporation *in utero* du sh-Nedd4l suggère que les défauts de positionnement des neurones observés après l'électroporation des constructions mutantes ne sont pas dus à l'absence de la protéine mutante mais davantage aux conséquences de son activation constitutive qui aurait des effets non seulement sur sa propre stabilité, mais aussi sur la stabilité et le fonctionnement de ses effecteurs. Les souris cKO et les souris électroporées avec les constructions mutantes présenteraient donc deux mécanismes d'actions différents.

Compte tenu de ces différentes observations notre hypothèse principale est que les mutations du domaine HECT retrouvées chez les patients conduisent à une absence d'interaction entre le domaine HECT et le domaine WW ou C2. Ce dépliement de la protéine conduirait à une activation constitutive de la protéine et donc à sa dégradation par auto-ubiquitination (on a précédemment montré que la capacité d'ubiquitination était intacte figure) ou par ubiquitination par une autre protéine. Cette activation constitutive pourrait entraîner la dégradation des substrats de NEDD4L et donc conduire à des dérégulations dans des voies de signalisation impliquée dans la corticogenèse. Il faut en effet garder à l'esprit que les substrats des E3 ubiquitine ligases en général et de NEDD4L en particulier ne sont pas exclusivement dégradés mais ils peuvent être relocalisés ou exocytés par exemple.

Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans les mutations du domaine HECT de NEDD4L sont originaux. C'est la première fois que des mutations retrouvées chez des patients conduisent à une instabilité d'une E3 ubiquitine ligase. En effet, malgré les nombreuses mutations dans le domaine HECT des E3 ubiquitine ligases, à notre connaissance, aucune autre publication n'a rapporté de résultats similaires dans le domaine des malformations du développement cortical. Notre principale hypothèse est que l'instabilité de NEDD4L conduit à la dégradation de protéines qui ne sont normalement pas

dégradées par la protéine sauvage (elles peuvent être mono-ubiquitinées ou encore polyubiquitinées sur une autre lysine que Lys48). Cette dégradation anormale conduirait à une dérégulation des voies et donc au phénotype de défaut de migration observé chez les souris. C'est pourquoi l'un des principaux buts est d'identifier les protéines cibles de NEDD4L qui sont dérégulées chez le mutant. Pour cela on dispose de différents outils, comme l'immunoprécipitation, néanmoins le principal problème qui se pose est l'instabilité de la protéine. Pour résoudre ce problème on a pour le moment deux solutions qui, certes, ne sont pas parfaites mais qui peuvent nous aider à identifier les cibles de NEDD4L. La première est de traiter les cellules avec du MG132, un inhibiteur du protéasome, mais le principal inconvénient de cette technique est la toxicité importante de ce produit pour les cellules ce qui pourrait modifier les substrats de NEDD4L. Le deuxième outil à notre disposition est une construction plasmidique contenant le gène NEDD4L muté taggué Myc qui, de façon surprenante, produit une protéine mutante stable. Par cette technique nous sommes parvenus à identifier des cibles connues de NEDD4L, mais pour le moment aucune ne semble dérégulée avec le mutant (Figure 40).

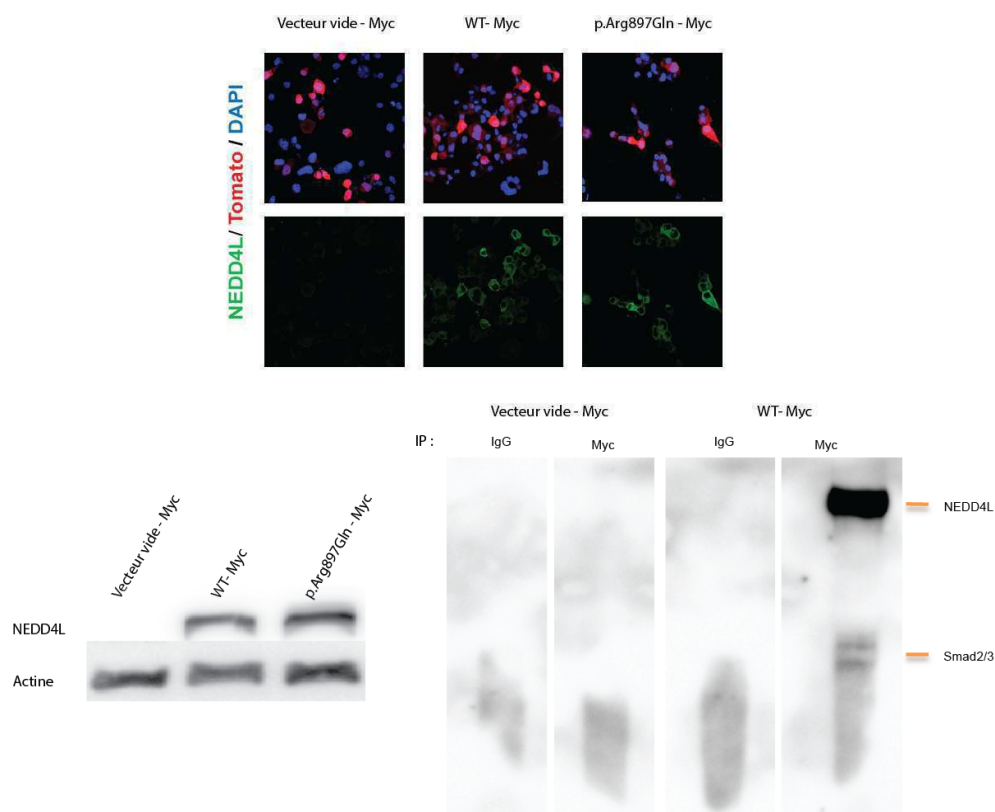


Figure 40 : Des expériences préliminaires d'immunoprécipitation avec les constructions tagguées Myc nous permettent d'identifier des protéines interagissant avec NEDD4L WT.

De manière surprenante, les expériences d'électroporation *in utero* ont mis en évidence un défaut de positionnement avec la surexpression des constructions portant les mutations HECT, mais aussi avec la construction WT. Par ailleurs, nous avons montré qu'un traitement à la rapamycine, un inhibiteur de la voie de signalisation mTORC1, permettait une restauration complète du phénotype de défaut de positionnement des neurones avec la construction WT ce qui n'est pas le cas avec les constructions mutantes (Figure 4 de l'article). Ces observations suggèrent que différentes voies de signalisation semblent impliquées dans la migration des neurones entre la situation observée chez le WT et celles chez les mutants.

En outre, nous avons montré que la co-transfection des constructions WT et mutante conduisait à une expression moindre que la seule transfection de la construction WT (Figure 41). Ces résultats suggèrent donc qu'en étant dégradée la protéine mutante emmène avec elle la protéine WT au protéasome.

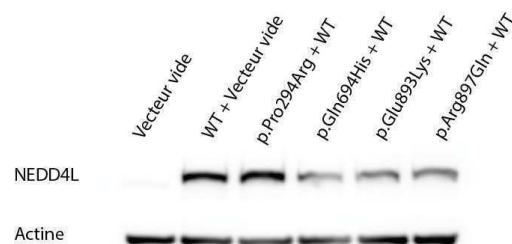


Figure 41 : Western Blot d'extraits protéique de cellules co-exprimant les constructions NEDD4L WT et/ou mutants. On observe une diminution de l'expression de NEDD4L lorsqu'on co-exprime la construction WT avec une construction mutante dans le domaine HECT.

2. Implication de la voie mTORC1 dans la surexpression de la forme WT

Le sauvetage total des défauts de positionnement des neurones lors du traitement à la rapamycine des souris électroporées avec la construction NEDD4L WT suggère que seule la voie mTORC1 est impliquée dans les défauts observés. En effet, la surexpression de la construction WT dans les cellules conduit à une augmentation de pS6 Ser235/236 mais il n'y a pas d'augmentation de la phosphorylation d'Akt (que ce soit Thr308 ou Ser473).

L'implication de la voie mTOR a été rapportée pour plusieurs maladies neurodéveloppementales notamment dans l'autisme où des mutations des régulateurs négatifs de mTORC1 ont été mis en évidence comme TSC1, TSC2 et PTEN (Ehninger et al.,

2008; Zhou et Parada, 2012). Chez les souris ces mutations conduisent à une augmentation de la signalisation mTORC1 ainsi qu'à un comportement autistique, des altérations dans l'apprentissage et la mémoire, une épilepsie et des modifications de la plasticité synaptique.

La voie de signalisation mTOR a aussi été impliquée dans les dysplasies corticales focales (Crino, 2005), l'hémimégalencéphalie (Baybis et al., 2009; Crino, 2005; Lee et al., 2012; Poduri et al., 2012), plusieurs sous-types de mégalencéphalies (Striano et Zara, 2012), le syndrome de Pretzel (Puffenberger et al., 2007) ou encore des épilepsies focales familiales (Ribierre et Baulac, 2016).

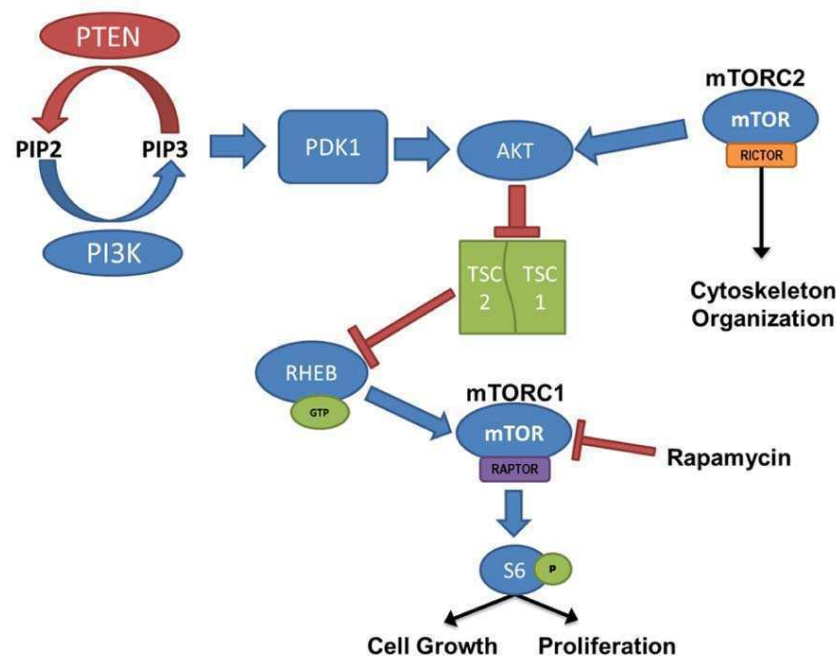


Figure 42: Schéma de la voie de signalisation mTOR. D'après LaSarge et Danzer, 2014.

La signalisation mTOR joue un rôle clé dans la croissance, la prolifération et la migration des cellules et est essentiel dans le développement du cerveau et l'étude des souris KO montre que la voie mTOR est indispensable au développement normal et à la viabilité des souris (Murakami et Ichisaka, 2004). En effet, il a été montré que chez la souris, l'abolition complète des composants de la voie mTOR conduisait à une létalité embryonnaire (Guertin et al., 2006; Shiota et al., 2006). Des KO conditionnels ont donc été créés pour analyser la fonction de mTOR dans le cerveau. Chez la souris, l'inactivation de mTORC1 par délétion conditionnelle du gène *Raptor* dans les progéniteurs neuronaux conduit à une microcéphalie caractérisée par une diminution du nombre de neurones mais aussi une diminution de leur

taille (Cloetta et al., 2013). En effet, on retrouve une augmentation de l'apoptose et une diminution de la prolifération, la délétion affecte aussi la durée du cycle cellulaire, ces altérations participent à la diminution du nombre de neurones (Ka et al., 2014). Les souris ont également une gliogenèse altérée, avec entre autre, une différenciation en astrocyte diminuée.

Les souris KO conditionnelle pour Rictor présentent elles aussi une microcéphalie et une diminution de la taille des neurones (Thomanetz et al., 2013).

Une autre étude montre que l'activation de la voie mTORC1 dans les neurones post-mitotiques conduit à des défauts de migration des neurones associés à une taille anormale des cellules ce qui conduit à une macrocéphalie avec une organisation corticale anormale (Kassai et al., 2014).

Par ailleurs, des mutations dans *TSC1* ou *TSC2* ont été montrées responsables de la sclérose tubéreuse de Bourneville. Le complexe TSC1/TSC2 est un inhibiteur de la signalisation mTORC1 et des mutations dans ce complexe conduisent à la sclérose tubéreuse qui est une maladie multisystème qui affecte le cerveau, les poumons, le cœur, la peau et les reins. Les symptômes neurologiques sont une épilepsie pharmaco-résistante, de l'autisme et une déficience intellectuelle. Les mutations dans *TSC1* ou *TSC2* conduisent à une activation de la voie ce qui induit une augmentation de la croissance cellulaire et la production de cellules anormales dans de nombreux organes (Crino PB, Nathanson KL, 2006). Une autre étude (Magri et al., 2011) montre chez les souris que la délétion de *Tsc1* est responsable de défaut de la lamination corticale et de nodules sous-épendymaires. Ces mêmes auteurs montrent une dérégulation de la prolifération et de la différenciation des progéniteurs neuronaux ainsi que des défauts de la migration neuronale (Magri et al., 2011).

Des expériences cellulaires ont montré qu'il y avait une relocalisation de DAB1 à la membrane des cellules lorsqu'on transfectait les cellules avec la construction WT (Figure 42).

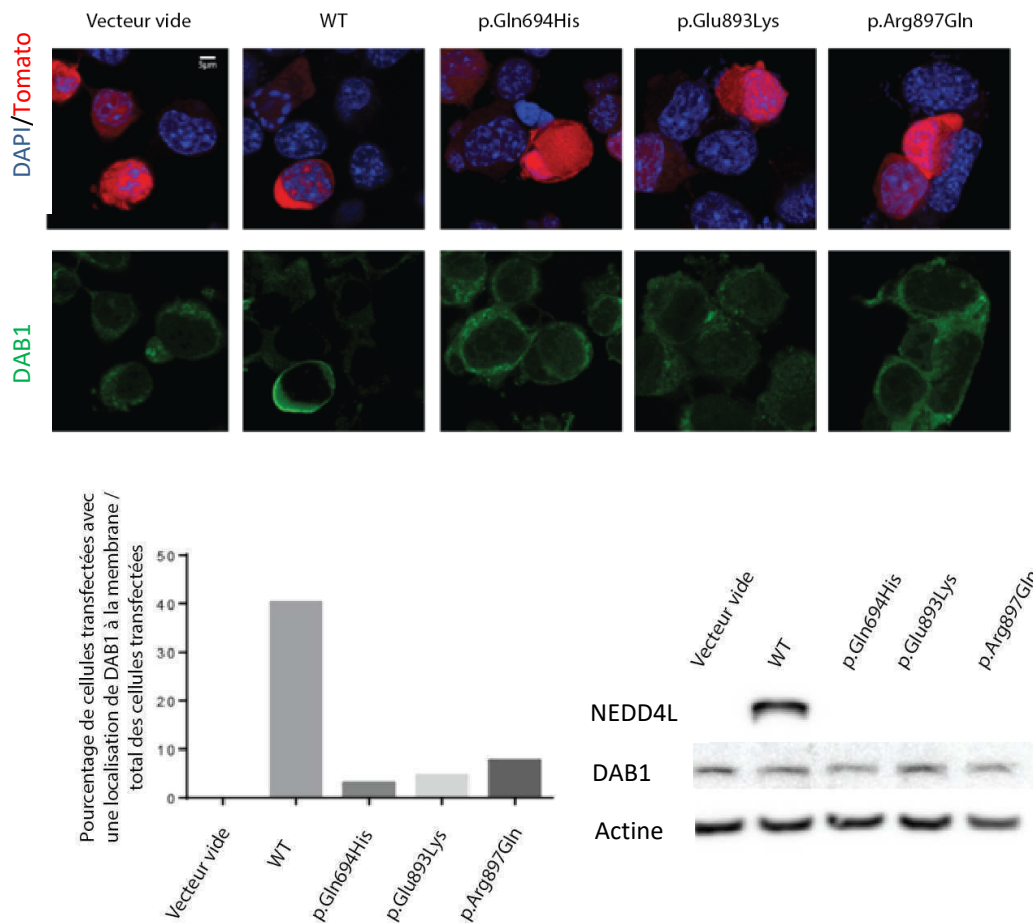


Figure 43 : Localisation anormale de la protéine DAB1 dans les cellules N2A transfectées avec la construction NEDD4L WT. A- Des analyses d'immunofluorescence montrent une accumulation de NEDD4L WT au niveau de la membrane des cellules transfectées avec la construction NEDD4L-WT alors que les protéines mutantes semblent avoir une localisation diffuse dans le cytoplasme. B- Pourcentage des cellules transfectées surexprimant DAB1 à la membrane. C- Western Blot d'extraits protéiques de cellules N2A transfectées avec NEDD4L WT et mutants. On n'observe pas de différence d'expression de la protéine DAB1.

Par ailleurs, une étude a récemment montré que les défauts de migration observés chez les souris KO pour TSC2 sont dus à une dérégulation de la signalisation Reelin-Dab1 (Moon et al., 2015). En effet, les auteurs observent une surexpression de l'E3 ubiquitine ligase CUL5 en l'absence de TSC2, cette E3 a été impliquée dans la dégradation de la protéine DAB1 phosphorylée (Feng et al., 2007).

Des études préliminaires montrent une augmentation du taux de phosphorylation de DAB1 uniquement dans le cas de la surexpression du WT (Figure 43). Dans des conditions normales, la protéine DAB1 phosphorylée est dégradée par CUL5, ce qui ne semble pas être

le cas ici. Une étude précédente a montré que NEDD4-1, était capable d'interagir avec CUL5 en formant un tri-complexe avec Rbx2 par exemple (Zhou et al., 2014). NEDD4-1 et NEDD4L étant des protéines très similaires, on peut émettre l'hypothèse que la surexpression de NEDD4L WT conduit à la formation du triplex puis à la dégradation ou au moins la séquestration de CUL5.

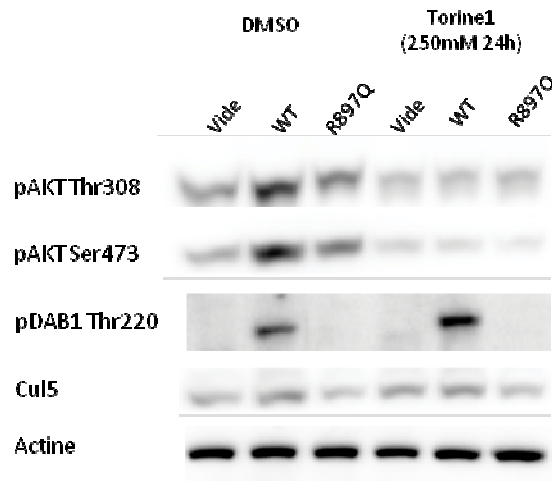


Figure 44 : Western Blot d'extraits protéiques de cellules exprimant les différentes constructions NEDD4L et traitées avec ou sans Torine 1, un inhibiteur des voies mTORC1 et mTORC2. (Données préliminaires)

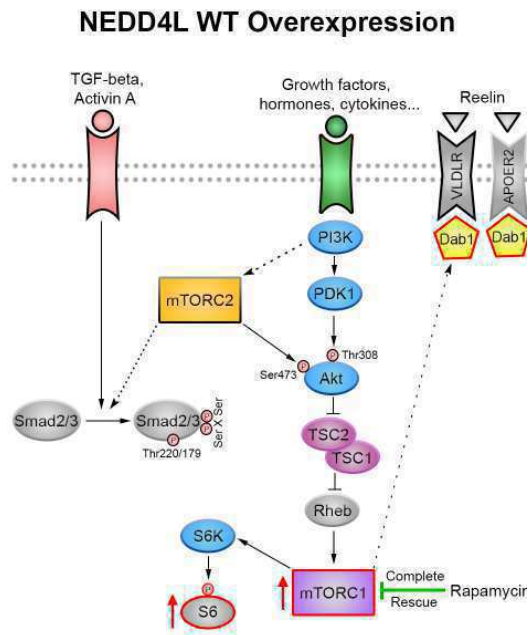


Figure 45 : Schéma récapitulatif des dérégulations observées lors d'un excès de NEDD4L WT.

3. Conséquences de la surexpression des formes NEDD4L mutées sur les voies PI3K-AKT-mTOR

Dans le cas de la surexpression des mutants responsables d'HNP, plusieurs voies de signalisation semblent impliquées. On retrouve une augmentation de l'activité de la voie mTORC1, en effet les défauts de migration des neurones sont partiellement restaurés par le traitement à la rapamycine. Néanmoins, contrairement à la surexpression de la protéine WT il ne semble pas y avoir de dérégulation de Dab1 autant au niveau localisation que phosphorylation.

En effet, on retrouve une augmentation de la phosphorylation pAKT Thr308 reflétant l'activation de la signalisation PI3K. NEDD4L a auparavant été impliqué dans la polyubiquitination puis la dégradation par le protéasome de PIK3CA (Wang et al., 2016). Les auteurs montrent que NEDD4L participe ainsi à la régulation de la voie PI3K-AKT en dégradant PIK3CA et une diminution de NEDD4L conduit à une augmentation de la phosphorylation d'AKTThr308. Cette phosphorylation est activatrice et est le reflet de l'activation de la voie PI3K. Cette voie a été impliquée notamment dans plusieurs malformations du développement cortical comme par exemple la perte de fonction de PTEN qui est responsables du syndrome de Cowden et Bannayan-Riley-Ruvalcaba ou encore des mutations activatrices dans *AKT3*, *PIK3CA*, *PIK3R2* et *CCND2* qui sont responsables de MPPH (Macrocéphalie Polymicrogyrie Polydactylie Hydrocéphalie) et de MCAP (Mégalencéphalie Malformation Capillaire Polymicrogyrie) (Mirzaa et al., 2014; Rivière et al., 2012).

Si la voie PI3K a été montrée très importante dans la régulation de la prolifération, l'apoptose et de la différenciation de nombreux types cellulaires (Franke, 2008; Oishi et al., 2009; Zhang et al., 2013), son implication dans la migration neuronale est encore assez discutée. En effet, en 2005, Konno et al, montrent que des mutants *PI3K*, *Rac1* et *Cdc42* ont des défauts de migration des neurones corticaux, alors que cette migration ne semble pas impactée chez les mutants Akt. Néanmoins, une étude plus récente a mis en évidence l'implication de la voie PDK1-AKT dans la migration neuronale (Itoh et al., 2016). En effet, Itoh et al ont montré que le KOc de Pdk1, qui est responsable de la phosphorylation activatrice d'AKT Thr308 entraînait un ralentissement de la locomotion en participant à la régulation des microtubules.

Par ailleurs, il a été montré que PTEN, un régulateur négatif de la voie PI3K/AKT était une cible de NEDD4-1 et/ou NEDD4L (Christie et al., 2012; Drinjakovic et al., 2010; Hsia et al.,

2014; Wang et al., 2007). On peut supposer que la surexpression de la protéine instable conduit à la dégradation de ce régulateur négatif, activant ainsi la voie PI3K/AKT.

Parmi les voies impliquées spécifiquement avec les mutations touchant au domaine HECT, il semble que la voie mTORC2 soit plus activée chez ces mutants ce qui est rapporté par une augmentation du taux de phosphorylation d'Akt en Ser473. Cette voie est moins étudiée que la voie mTORC1, néanmoins une étude (Thomanetz et al., 2013) a montré que les souris KO pour *Rictor*, un composant essentiel du complexe mTORC2, présentaient une microcéphalie avec une atteinte au niveau de la taille et de la morphologie des cellules et des synapses.

La dernière voie qui semble dérégulée chez le mutant est la voie TGF- β avec une augmentation de la phosphorylation de Smad2/3. NEDD4L a auparavant été impliqué dans la polyubiquitination et la dégradation du complexe SMAD2/3 phosphorylé (Gao et al., 2009). Il a récemment été montré que la voie PI3K/mTORC2 participait à la régulation de la voie TGF- β via notamment la protéine SGK1, en effet cette protéine est régulée positivement par mTORC2. SGK1 phosphoryle NEDD4L qui devient incapable de se lier à la protéine SMAD3 phosphorylée et donc ne peut pas ubiquitiner le complexe SMAD2/3 (Gao et al., 2009). La voie TGF- β est impliquée dans la différenciation des CGR en astrocyte. En effet, l'injection de TGF- β 1 induit une gliogenèse prématurée au détriment de la neurogenèse (Stipursky et al., 2014).

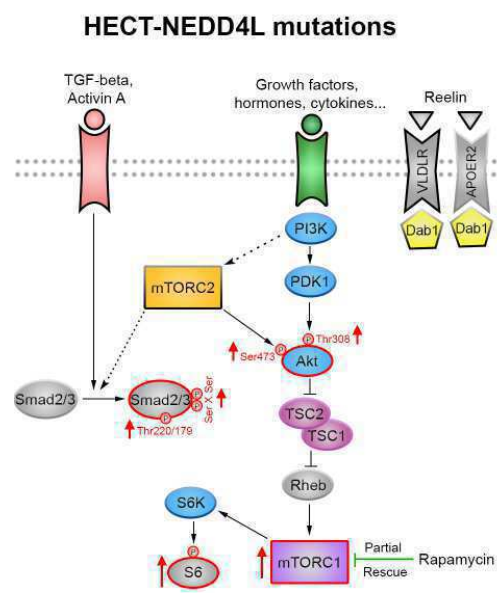


Figure 46 : Schéma récapitulatif des dérégulations observées lors d'un excès de NEDD4L mutant

Depuis la parution de notre article, une nouvelle publication a identifié une patiente portant une nouvelle mutation dans NEDD4L, il s'agit de la mutation p.Glu873Lys située dans le domaine HECT de la protéine (Kato et al., 2017). La patiente est atteinte d'une hétérotopie nodulaire périventriculaire associée à une polymicrogyrie et une fente palatine. Les auteurs ont analysé le niveau d'activation d'Akt et de mTORC1 dans une lignée de cellules lymphoblastoïdes mais ils n'observent aucune différence de phosphorylation (Kato et al., 2017).

4. Perspectives

Afin d'étudier plus profondément les différentes voies impliquées dans la pathologie, un modèle souris est en cours d'étude au laboratoire, il s'agit d'un modèle KI conditionnel portant la mutation p.Arg897Gln. Les premières études du modèle ont montré que les souris exprimaient la mutation au niveau de l'ARNm et que comme au niveau cellulaire, la protéine mutante était instable (données personnelles). Ce modèle va nous permettre de nous affranchir notamment des effets dus à la surexpression de la protéine observés dans les souris électroporées et les cultures cellulaires. En plus d'études ciblées et à grandes échelles pour identifier les cibles de NEDD4L, ce modèle souris permettra de disséquer plus en détail l'implication des voies PIK3, AKT, mTORC1 et mTORC2 qui seraient dérégulées dans les mécanismes physiopathologiques sous-tendant l'expression des formes mutées de NEDD4L. La quantification des protéines cibles de ces voies de signalisation telles que PIK3CA et PIK3R2, TSC1/2, CUL5 et DAB1 permettront de comprendre les mécanismes qui affectent ces voies.

Un autre axe de recherche permettra de mieux comprendre comment l'expression des mutants (en comparaison de l'excès de NEDD4L), constitutivement actifs, peut entraîner des dérégulations différentielles de voies de signalisation. L'excès de NEDD4L sauvage pourrait catalyser la monoubiquitination d'un plus grand nombre de protéines telles que DAB1 et RBX2, induisant une plus forte relocalisation de ces protéines au niveau périphérique de la cellule tandis que l'activité polyubiquitination vis-à-vis de ces substrats serait inchangée. L'expression des mutants de NEDD4L, potentiellement constitutivement activés, dérégulerait la balance en faveur d'une polyubiquitination des substrats plutôt qu'une monoubiquitination, ce qui pourrait expliquer les différences de phénotypes observées entre la surexpression de la protéine sauvage et les protéines mutées pour la localisation subcellulaire de DAB1 et RBX2. Il sera donc pertinent de savoir si NEDD4L est capable de

monoubiquitiner certains des substrats cités et d'évaluer la contribution de ce mécanisme dans les processus du développement cortical.

Bibliographie

- Aaku-Saraste, E., Oback, B., Hellwig, A., and Huttner, W. B. (1997). Neuroepithelial cells downregulate their plasma membrane polarity prior to neural tube closure and neurogenesis. *Mech. Dev.* 69, 71–81. doi:10.1016/S0925-4773(97)00156-1.
- Aggarwal, S., Bhowmik, A. Das, Ramprasad, V. L., Murugan, S., and Dalal, A. (2016). A splice site mutation in HERC1 leads to syndromic intellectual disability with macrocephaly and facial dysmorphism: Further delineation of the phenotypic spectrum. *Am. J. Med. Genet. Part A* 170, 1868–1873. doi:10.1002/ajmg.a.37654.
- Alcantara, D., and O’Driscoll, M. (2014). Congenital microcephaly. *Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet.* 166, 124–139. doi:10.1002/ajmg.c.31397.
- Alkuraya, F. S., Cai, X., Emery, C., Mochida, G. H., Al-Dosari, M. S., Felie, J. M., et al. (2011). Human Mutations in NDE1 Cause Extreme Microcephaly with Lissencephaly. *Am. J. Hum. Genet.* 88, 536–547. doi:10.1016/j.ajhg.2011.04.003.
- An, C.-I., Ganio, E., and Hagiwara, N. (2013). Trip12, a HECT domain E3 ubiquitin ligase, targets Sox6 for proteasomal degradation and affects fiber type-specific gene expression in muscle cells. *Skelet. Muscle* 3, 11. doi:10.1186/2044-5040-3-11.
- An, J. Y., Seo, J. W., Tasaki, T., Lee, M. J., Varshavsky, a, and Kwon, Y. T. (2006). Impaired neurogenesis and cardiovascular development in mice lacking the E3 ubiquitin ligases UBR1 and UBR2 of the N-end rule pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6212–6217. doi:10.1073/pnas.0601700103.
- Angevine, J. B., and Sidman, R. L. (1961). Autoradiographic Study of Cell Migration during Histogenesis of Cerebral Cortex in the Mouse. *Nature* 192, 766–768. doi:10.1038/192766b0.
- Arai, Y., Pulvers, J. N., Haffner, C., Schilling, B., Nüsslein, I., Calegari, F., et al. (2011). Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nat. Commun.* 2, 154. doi:10.1038/ncomms1155.
- Armisen, R., Fuentes, R., Olguín, P., Cabrejos, M. E., and Kukuljan, M. (2002). Repressor element-1 silencing transcription/neuron-restrictive silencer factor is required for neural sodium channel expression during development of *Xenopus*. *J. Neurosci.* 22, 8347–8351. doi:22/19/8347 [pii].
- Arnaud, L., Ballif, B. a, and Cooper, J. a (2003). Regulation of Protein Tyrosine Kinase Signaling by Substrate Degradation during Brain Development. 23, 9293–9302. doi:10.1128/MCB.23.24.9293.
- Aronica, E., Gorter, J. a., Ijlst-Keizers, H., Rozemuller, A. J., Yankaya, B., Leenstra, S., et al. (2003). Expression and functional role of mGluR3 and mGluR5 in human astrocytes and glioma cells: Opposite regulation of glutamate transporter proteins. *Eur. J. Neurosci.* 17, 2106–2118. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02657.x.
- Avram Hershko, and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425–479. doi:10.1016/S0968-0004(97)01122-5.
- Ayala, R., Shu, T., and Tsai, L. H. (2007). Trekking across the Brain: The Journey of Neuronal Migration. *Cell* 128, 29–43. doi:10.1016/j.cell.2006.12.021.
- Azzarelli, R., Guillemot, F., and Pacary, E. (2015). Function and regulation of Rnd proteins in cortical projection neuron migration. *Front. Neurosci.* 9. doi:10.3389/fnins.2015.00019.
- Bakircioglu, M., Carvalho, O. P., Khurshid, M., Cox, J. J., Tuysuz, B., Barak, T., et al. (2011). The Essential Role of Centrosomal NDE1 in Human Cerebral Cortex Neurogenesis. doi:10.1016/j.ajhg.2011.03.019.
- Ballas, N., Grunseich, C., Lu, D. D., Speh, J. C., and Mandel, G. (2005). REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cell* 121, 645–657. doi:10.1016/j.cell.2005.03.013.
- Barkovich, a. J., Guerrini, R., Kuzniecky, R. I., Jackson, G. D., and Dobyns, W. B. (2012). A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: Update 2012. *Brain* 135, 1348–1369. doi:10.1093/brain/aws019.
- Basel-Vanagaite, L., Dallapiccola, B., Ramirez-Solis, R., Segref, A., Thiele, H., Edwards, A., et al. (2012). Deficiency for the ubiquitin ligase UBE3B in a blepharophimosis-ptosis-intellectual-disability syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 91, 998–1010. doi:10.1016/j.ajhg.2012.10.011.
- Batista-Brito, R., and Fishell, G. (2009). The Developmental Integration of Cortical Interneurons into a Functional Network. 87, 81–118. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120240.Microglia.
- Baybis, M., Aronica, E., Nathanson, K. L., and Crino, P. B. (2009). Deletion of 15q11.2-15q13.1 in isolated human hemimegalencephaly. *Acta Neuropathol.* 118, 821–823. doi:10.1007/s00401-

- 009-0603-3.
- Bentley, D., and Toroian-Raymond, A. (1986). Disoriented pathfinding by pioneer neurone growth cones deprived of filopodia by cytochalasin treatment. *Nature* 323, 712–715. doi:10.1038/323712a0.
- Berko, E. R., Cho, M. T., Eng, C., Shao, Y., Sweetser, D. A., Waxler, J., et al. (2017). De novo missense variants in HECW2 are associated with neurodevelopmental delay and hypotonia. *54*, 84–86. doi:10.1016/j.celrep.2016.09.087.Roles.
- Bernhardt, A., Lechner, E., Hano, P., Schade, V., Dieterle, M., Anders, M., et al. (2006). CUL4 associates with DDB1 and DET1 and its downregulation affects diverse aspects of development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 47, 591–603. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02810.x.
- Bilgüvar, K., Ali Kemal Öztürk, Louvi, A., Kwan, K. Y., Choi, M., Tatli, B., et al. (2010). Whole exome sequencing identifies recessive WDR62 mutations in severe brain malformations. *467*, 207–210. doi:10.1038/nature09327.Whole.
- Bizzotto, S., and Francis, F. (2015). Morphological and functional aspects of progenitors perturbed in cortical malformations. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 30. doi:10.3389/fncel.2015.00030.
- Bock, H. H., and Herz, J. (2003). Tyrosine Kinases in Neurons. *13*, 18–26.
- Bond, A. (2012). The dynamic role of bone morphogenetic proteins in neural stem cell fate and maturation. *Dev. Neurobiol.* 72, 1068–1084. doi:10.1002/dneu.22022.The.
- Bradke, F., and Dotti, C. C. (1999). The Role of Local Actin Instability in Axon Formation. *Science (80-.).* 283, 1931–1934. doi:10.1126/science.283.5409.1931.
- Brose, K., and Tessier-Lavigne, M. (2000). Slit proteins: Key regulators of axon guidance, axonal branching, and cell migration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 95–102. doi:10.1016/S0959-4388(99)00066-5.
- Bruce, M. C., Kanelis, V., Fouladkou, F., Debonneville, A., Staub, O., and Rotin, D. (2008). Regulation of Nedd4-2 self-ubiquitination and stability by a PY motif located within its HECT-domain. *Biochem. J.* 415, 155–63. doi:10.1042/BJ20071708.
- Brückner, G., and Biesold, D. (1981). Histochemistry of glycogen deposition in perinatal rat brain: importance of radial glial cells. *J. Neurocytol.* 10, 749–757. doi:10.1007/BF01262651.
- Bruinsma, C. F., Savelberg, S. M. C., Kool, M. J., Jolfaei, M. A., Van Woerden, G. M., Baarends, W. M., et al. (2016). An essential role for UBE2A/HR6A in learning and memory and mGLUR-dependent long-term depression. *Hum. Mol. Genet.* 25, 1–8. doi:10.1093/hmg/ddv436.
- Brunelli, S., Faiella, A., Capra, V., Nigro, V., Simeone, A., Cama, A., et al. (1996). Germline mutations in the homeobox gene EMX2 in patients with severe schizencephaly. *Nat Genet.* 12, 353–6. doi:10.1038/ng0496-417.
- Bryan, B., Cai, Y., Wrighton, K., Wu, G., Feng, X. H., and Liu, M. (2005). Ubiquitination of RhoA by Smurf1 promotes neurite outgrowth. *FEBS Lett.* 579, 1015–1019. doi:10.1016/j.febslet.2004.12.074.
- Bystron, I., Blakemore, C., and Rakic, P. (2008). Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 110–122. doi:10.1038/nrn2252.
- Cabezas, D. a, Slaugh, R., Abidi, F., Arena, J. F., Stevenson, R. E., Schwartz, C. E., et al. (2000). A new X linked mental retardation (XLMR) syndrome with short stature, small testes, muscle wasting, and tremor localises to Xq24-q25. *J. Med. Genet.* 37, 663–8. doi:10.1136/jmg.37.9.663.
- Cahana, a, Escamez, T., Nowakowski, R. S., Hayes, N. L., Giacobini, M., von Holst, a, et al. (2001). Targeted mutagenesis of Lis1 disrupts cortical development and LIS1 homodimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6429–34. doi:10.1073/pnas.101122598.
- Calegari, F., Haubensak, W., Haffner, C., and Huttner, W. B. (2005). Selective Lengthening of the Cell Cycle in the Neurogenic Subpopulation of Neural Progenitor Cells during Mouse Brain Development. *J. Neurosci.* 25, 6533–6538. doi:10.1523/JNEUROSCI.0778-05.2005.
- Campbell, D. S., and Holt, C. E. (2001). Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron* 32, 1013–1026. doi:10.1016/S0896-6273(01)00551-7.
- Cao, Q., Mani, R.-S., Ateeq, B., Dhanasekaran, S. M., Asangan, I. A., Prensner, J. R., et al. (2011). Coordinated Regulation of Polycomb Group Complexes through microRNAs in Cancer. *20*, 187–199. doi:10.1086/498510.Parasitic.
- Carabalona, A., Beguin, S., Pallesi-pocachard, E., Buhler, E., Pellegrino, C., Arnaud, K., et al. (2012). A glial origin for periventricular nodular heterotopia caused by impaired expression of Filamin-A.

- Hum. Mol. Genet.* 21, 1004–1017. doi:10.1093/hmg/ddr531.
- Castillo-Lluva, S., Tan, C.-T., Daugaard, M., Sorensen, P. H. B., and Malliri, a (2012). The tumour suppressor HACE1 controls cell migration by regulating Rac1 degradation. *Oncogene* 32, 1735–1742. doi:10.1038/onc.2012.189.
- Cepeda, C., André, V. M., Yamazaki, I., Hauptman, J. S., Jane, Y., Vinters, H. V., et al. (2011). NIH Public Access. 51, 160–165. doi:10.1111/j.1528-1167.2010.02633.x.Comparative.
- Chastagner, P., Israël, A., and Brou, C. (2008). AIP4/Itch Regulates Notch Receptor Degradation in the Absence of Ligand. *PLoS One* 3. doi:10.1371/Citation.
- Chen, C.-Y., Tsai, M.-S., Lin, C.-Y., Yu, I.-S., Chen, Y.-T., Lin, S.-R., et al. (2012). Rescue of the genetically engineered Cul4b mutant mouse as a potential model for human X-linked mental retardation. *Hum. Mol. Genet.* 21, 4270–85. doi:10.1093/hmg/dds261.
- Cheng, P. L., Lu, H., Shelly, M., Gao, H., and Poo, M. M. (2011). Phosphorylation of E3 ligase smurf1 switches its substrate preference in support of axon development. *Neuron* 69, 231–243. doi:10.1016/j.neuron.2010.12.021.
- Chenn, A., and Walsh, C. A. (2002). Regulation of Cerebral Cortical Size by Control of Cell Cycle Exit in Neural Precursors. 297, 365–370. doi:10.1126/science.1074192.
- Chin, L. S., Vavalle, J. P., and Li, A. (2002). Staring, a novel E3 ubiquitin-protein ligase that targets syntaxin 1 for degradation. *J. Biol. Chem.* 277, 35071–35079. doi:10.1074/jbc.M203300200.
- Chong-Kopera, H., Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Garcia-Gonzalo, F. R., Rosa, J. L., et al. (2006). TSC1 stabilizes TSC2 by inhibiting the interaction between TSC2 and the HERC1 ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* 281, 8313–8316. doi:10.1074/jbc.C500451200.
- Christensen, D. E., Brzovic, P. S., and Klevit, R. E. (2007). E2-BRCA1 RING interactions dictate synthesis of mono- or specific polyubiquitin chain linkages. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 941–948. doi:10.1038/nsmb1295.
- Christie, K. J., Martinez, J. a., and Zochodne, D. W. (2012). Disruption of E3 ligase NEDD4 in peripheral neurons interrupts axon outgrowth: Linkage to PTEN. *Mol. Cell. Neurosci.* 50, 179–192. doi:10.1016/j.mcn.2012.04.006.
- Cloetta, D., Thomanetz, V., Baranek, C., Lustenberger, R. M., Lin, S., Oliveri, F., et al. (2013). Inactivation of mTORC1 in the Developing Brain Causes Microcephaly and Affects Gliogenesis. *J. Neurosci.* 33, 7799–7810. doi:10.1523/JNEUROSCI.3294-12.2013.
- Colak, D., Ji, S. J., Porse, B. T., and Jaffrey, S. R. (2013). XRegulation of axon guidance by compartmentalized nonsense-mediated mRNA decay. *Cell* 153, 1252–1265. doi:10.1016/j.cell.2013.04.056.
- Conti, V., Carabalona, A., Pallesi-Pocachard, E., Parrini, E., Leventer, R. J., Buhler, E., et al. (2013). Periventricular heterotopia in 6q terminal deletion syndrome: Role of the C6orf70 gene. *Brain* 136, 3378–3394. doi:10.1093/brain/awt249.
- Crino, P. B. (2005). Molecular pathogenesis of focal cortical dysplasia and hemimegalencephaly. *J Child Neurol* 20, 330–6. doi:10.1177/08830738050200041101.
- Crino, P. B., Duhaime, a C., Baltuch, G., and White, R. (2001). Differential expression of glutamate and GABA-A receptor subunit mRNA in cortical dysplasia. *Neurology* 56, 906–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11294928>.
- Crino PB, Nathanson KL, H. E. (2006). The tuberous sclerosis complex. *N Engl J Med.* 355, 1345–56. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05117.x.
- D’Arca, D., Zhao, X., Xu, W., Ramirez-Martinez, N. C., Iavarone, A., and Lasorella, A. (2010). Huwe1 ubiquitin ligase is essential to synchronize neuronal and glial differentiation in the developing cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 5875–5880. doi:10.1073/pnas.0912874107.
- D’Arcangelo, G., G. Miao, G., Chen, S.-C., Scars, H. D., Morgan, J. I., and Curran, T. (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* 374, 719–723. doi:10.1038/374719a0.
- de Groot, R. E. a, Ganji, R. S., Bernatik, O., Lloyd-Lewis, B., Seipel, K., Šedová, K., et al. (2014). Huwe1-mediated ubiquitylation of dishevelled defines a negative feedback loop in the Wnt signaling pathway. *Sci. Signal.* 7, ra26. doi:10.1126/scisignal.2004985.
- Deblandre, G. A., Lai, E. C., and Kintner, C. (2001). Xenopus Neuralized Is a Ubiquitin Ligase that Interacts with XDelta1 and Regulates Notch Signaling. *Dev. Cell* 1, 795–806. doi:10.1016/S1534-5807(01)00091-0.
- Deshaies, R. J., and Joazeiro, C. a (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 78,

- 399–404 Deshaies, R. J., Joazeiro, C. (2009). RI. doi:10.1146/annurev.biochem.78.101807.093809.
- Desir, J., Cassart, M., David, P., Van Bogaert, P., and Abramowicz, M. (2008). Primary microcephaly with ASPM mutation shows simplified cortical gyration with antero-posterior gradient pre- and post-natally. *Am. J. Med. Genet. Part A* 146, 1439–1443. doi:10.1002/ajmg.a.32312.
- Dhanesh, S. B., Subashini, C., and James, J. (2016). Hes1: the maestro in neurogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 4019–4042. doi:10.1007/s00018-016-2277-z.
- Diantonio, A., Haghighi, A. P., Portman, S. L., Lee, J. D., Amaranto, A. M., and Goodman, C. S. (2001). Mechanisms Regulate Synaptic Growth and Function. *Nature* 412, 449–452. doi:10.1038/35086595.
- DiAntonio, A., and Hicke, L. (2004). Ubiquitin-Dependent Regulation of the Synapse. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 223–246. doi:10.1146/annurev.neuro.27.070203.144317.
- Drinjakovic, J., Jung, H., Campbell, D. S., Strohlic, L., Dwivedy, A., and Holt, C. E. (2010). E3 Ligase Nedd4 Promotes Axon Branching by Downregulating PTEN. *Neuron* 65, 341–357. doi:10.1016/j.neuron.2010.01.017.
- Dupont, S., Mamidi, A., Cordenosi, M., Montagner, M., Zacchigna, L., Adorno, M., et al. (2009). FAM/USP9x, a Deubiquitinating Enzyme Essential for TGF β Signaling, Controls Smad4 Monoubiquitination. *Cell* 136, 123–135. doi:10.1016/j.cell.2008.10.051.
- Ehninger, D., Li, W., Fox, K., Stryker, M. P., and Silva, A. J. (2008). Reversing Neurodevelopmental Disorders in Adults. *Dan.* 60, 950–960. doi:10.1016/j.neuron.2008.12.007.Reversing.
- Escobedo, A., Gomes, T., Aragón, E., Martín-Malpartida, P., Ruiz, L., and Macias, M. J. (2014). Structural Basis of the Activation and Degradation Mechanisms of the E3 Ubiquitin Ligase Nedd4L. *Structure* 22, 1446–1457. doi:10.1016/j.str.2014.08.016.
- Faesen, A. C., Luna-Vargas, M. P. a, and Sixma, T. K. (2012). The role of UBL domains in ubiquitin-specific proteases. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 539–45. doi:10.1042/BST20120004.
- Farkas, L. M., and Huttner, W. B. (2008). The cell biology of neural stem and progenitor cells and its significance for their proliferation versus differentiation during mammalian brain development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 707–715. doi:10.1016/j.ceb.2008.09.008.
- Faux, C., Rakic, S., Andrews, W., and Britto, J. M. (2012). Neurons on the move: Migration and lamination of cortical interneurons. *NeuroSignals* 20, 168–189. doi:10.1159/000334489.
- Feng, L., Allen, N. S., Simo, S., and Cooper, J. A. (2007). Cullin 5 regulates Dab1 protein levels and neuron positioning during cortical development. *GENES Dev.* 21, 2717–2730. doi:10.1101/gad.1604207.
- Feng, Y., and Walsh, C. A. (2004). Mitotic Spindle Regulation by Nde1 Controls Cerebral Cortical Size. *Neuron* 44, 279–293.
- Ferland, R. J., Batiz, L. F., Neal, J., Lian, G., Bundock, E., Lu, J., et al. (2009). Disruption of neural progenitors along the ventricular and subventricular zones in periventricular heterotopia. *Hum. Mol. Genet.* 18, 497–516. doi:10.1093/hmg/ddn377.
- Fernández, V., Llinares-Benadero, C., and Borrell, V. (2016). Cerebral cortex expansion and folding: what have we learned? *EMBO J.*, 1–24. doi:10.15252/embj.201593701.
- Fietz, S. a., and Huttner, W. B. (2011). Cortical progenitor expansion, self-renewal and neurogenesis—a polarized perspective. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 23–35. doi:10.1016/j.conb.2010.10.002.
- Finucane, B., Lusk, L., and Arkilo, D. (2016). 15q Duplication Syndrome and Related Disorders. *GeneReviews*®.
- Fox, J. W., Lamperti, E. D., Ek??io??lu, Y. Z., Hong, S. E., Feng, Y., Graham, D. a., et al. (1998). Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human Periventricular heterotopia. *Neuron* 21, 1315–1325. doi:10.1016/S0896-6273(00)80651-0.
- Franco, S. J., Martinez-Garay, I., Gil-Sanz, C., Harkins-Perry, S. R., and Müller, U. (2011). Reelin regulates cadherin function via Dab1/Rap1 to control neuronal migration and lamination in the neocortex. *Neuron* 69, 482–97. doi:10.1016/j.neuron.2011.01.003.
- Franco, S. J., and Müller, U. (2013). Shaping Our Minds: Stem and Progenitor Cell Diversity in the Mammalian Neocortex. *Neuron* 77, 19–34. doi:10.1016/j.neuron.2012.12.022.
- Franke, T. F. (2008). PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 27, 6473–6488. doi:10.1038/onc.2008.313.
- Friez, M. J., Brooks, S. S., Stevenson, R. E., Field, M., Basehore, M. J., Adès, L. C., et al. (2016). HUWE1 mutations in Juberg-Marsidi and Brooks syndromes: the results of an X-chromosome exome sequencing study. *BMJ Open* 6, e009537. doi:10.1136/bmjopen-2015-009537.

- Friocourt, G., Kappeler, C., Saillour, Y., Fauchereau, F., Rodriguez, M. S., Bahi, N., et al. (2005). Doublecortin interacts with the ubiquitin protease DFFRX, which associates with microtubules in neuronal processes. *Mol. Cell. Neurosci.* 28, 153–164. doi:10.1016/j.mcn.2004.09.005.
- Gadisseux, J. F., and Evrard, P. (1985). Glial neuronal relationship in the developing central nervous system. *Dev. Neurosci.* 7, 12–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4029035>.
- Gaiano, N., Nye, J. S., and Fishell, G. (2000). Radial Glial Identity Is Promoted by Notch1 Signaling in the Murine Forebrain. *Neuron* 26, 395–404. doi:10.1016/S0896-6273(00)81172-1.
- Gallagher, E., Gao, M., Liu, Y.-C., and Karin, M. (2006). Activation of the E3 ubiquitin ligase Itch through a phosphorylation-induced conformational change. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 1717–22. doi:10.1073/pnas.0510664103.
- Gambello, M. J., Darling, D. L., Yingling, J., Tanaka, T., Gleeson, J. G., and Wynshaw-Boris, A. (2003). Multiple dose-dependent effects of Lis1 on cerebral cortical development. *J. Neurosci.* 23, 1719–1729. doi:10.1523/JNEUROSCI.1604-11.2011.
- Gao, S., Alarcón, C., Sapkota, G., Rahman, S., Chen, P.-Y., Goerner, N., et al. (2009). Ubiquitin ligase Nedd4L targets activated Smad2/3 to limit TGF-beta signaling. *Mol. Cell* 36, 457–68. doi:10.1016/j.molcel.2009.09.043.
- Gao, Z., Ure, K., Ding, P., Nashaat, M., Yuan, L., Ma, J., et al. (2011). The Master Negative Regulator REST/NRSF Controls Adult Neurogenesis by Restraining the Neurogenic Program in Quiescent Stem Cells. *J. Neurosci.* 31, 9772–86. doi:10.1523/JNEUROSCI.1604-11.2011.
- Garner, C. C., Zhai, R. G., Gundelfinger, E. D., and Ziv, N. E. (2002). Molecular mechanisms of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci.* 25, 243–250. doi:10.1016/S0166-2236(02)02152-5.
- Ghosh, P., Wu, M., Zhang, H., and Sun, H. (2008). mTORC1 signaling requires proteasomal function and the involvement of CUL4-DDB1 ubiquitin E3 ligase. *Cell Cycle* 7, 373–381. doi:10.4161/cc.7.3.5267.
- Giagtoglou, N., Ly, C. V., and Bellen, H. J. (2009). Cell adhesion, the backbone of the synapse: “vertebrate” and “invertebrate” perspectives. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, 1–25. doi:10.1101/cshperspect.a003079.
- Godin, J. D., and Nguyen, L. (2014). *Cellular and Molecular Control of Neuronal Migration*. doi:10.1007/978-94-007-7687-6.
- Gonzalez-Billault, C., Jimenez-Mateos, E. M., Caceres, A., Diaz-Nido, J., Wandosell, F., and Avila, J. (2004). Microtubule-Associated Protein 1B Function during Normal Development, Regeneration, and Pathological Conditions in the Nervous System. *J. Neurobiol.* 58, 48–59. doi:10.1002/neu.10283.
- Götz, M., and Huttner, W. B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 777–788. doi:10.1038/nrm1739.
- Granata, T., Farina, L., Faiella, a., Cardini, R., D’Incerti, L., Boncinelli, E., et al. (1997). Familial schizencephaly associated with EMX2 mutation. *Neurology* 48, 1403–1406. doi:10.1212/WNL.48.5.1403.
- Graus-Porta, D., Blaess, S., Senften, M., Littlewood-Evans, A., Damsky, C., Huang, Z., et al. (2001). β 1-Class integrins regulate the development of laminae and folia in the cerebral and cerebellar cortex. *Neuron* 31, 367–379. doi:10.1016/S0896-6273(01)00374-9.
- Greig, L. C., Woodworth, M. B., Galazo, M. J., Padmanabhan, H., and Macklis, J. D. (2013). Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 755–769. doi:10.1038/nrn3586.
- Griffith, E., Walker, S., Martin, C.-A., Vagnarelli, P., Stiff, T., Vernay, B., et al. (2008). Mutations in pericentrin cause Seckel syndrome with defective ATR-dependent DNA damage signaling. *Nat. Genet.* 40, 232–6. doi:10.1038/ng.2007.80.
- Groettrup, M., Pelzer, C., Schmidtke, G., and Hofmann, K. (2008). Activating the ubiquitin family: UBA6 challenges the field. *Trends Biochem. Sci.* 33, 230–237. doi:10.1016/j.tibs.2008.01.005.
- Guerrini, R., and Dobyns, W. B. (2014). Malformations of cortical development: Clinical features and genetic causes. *Lancet Neurol.* 13, 710–726. doi:10.1016/S1474-4422(14)70040-7.
- Guertin, D. a., Stevens, D. M., Thoreen, C. C., Burds, A. a., Kalaany, N. Y., Moffat, J., et al. (2006). Ablation in Mice of the mTORC Components raptor, rictor, or mLST8 Reveals that mTORC2 Is Required for Signaling to Akt-FOXO and PKC α , but Not S6K1. *Dev. Cell* 11, 859–871. doi:10.1016/j.devcel.2006.10.007.
- Gupta-Rossi, N., Le Bail, O., Gonen, H., Brou, C., Logeat, F., Six, E., et al. (2001). Functional Interaction

- between SEL-10, an F-box Protein, and the Nuclear Form of Activated Notch1 Receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 34371–34378. doi:10.1074/jbc.M101343200.
- Haas, A. L., Warms, J. V. B., Hershkog, A., and Rose, I. A. (1982). Ubiquitin-activating Enzyme. 257.
- Haddad, D. M., Vilain, S., Vos, M., Esposito, G., Matta, S., Kalscheuer, V. M., et al. (2013). Mutations in the Intellectual Disability Gene Ube2a Cause Neuronal Dysfunction and Impair Parkin-Dependent Mitophagy. *Mol. Cell* 50, 831–843. doi:10.1016/j.molcel.2013.04.012.
- Hanoun, N., Fritsch, S., Gayet, O., Gigoux, V., Cordelier, P., Dusetti, N., et al. (2014). The E3 ubiquitin ligase thyroid hormone receptor-interacting protein 12 targets pancreas transcription factor 1a for proteasomal degradation. *J. Biol. Chem.* 289, 35593–35604. doi:10.1074/jbc.M114.620104.
- Hansson, E. M., Lanner, F., Das, D., Mutvei, a., Marklund, U., Ericson, J., et al. (2010). Control of Notch-ligand endocytosis by ligand-receptor interaction. *J. Cell Sci.* 123, 2931–2942. doi:10.1242/jcs.073239.
- Hao, Y. H., Fountain, M. D., Fon Tacer, K., Xia, F., Bi, W., Kang, S. H. L., et al. (2015). USP7 Acts as a Molecular Rheostat to Promote WASH-Dependent Endosomal Protein Recycling and Is Mutated in a Human Neurodevelopmental Disorder. *Mol. Cell* 59, 956–969. doi:10.1016/j.molcel.2015.07.033.
- Harlalka, G. V., Baple, E. L., Cross, H., Kühnle, S., Cubillos-Rojas, M., Matentzoglou, K., et al. (2013). Mutation of HERC2 causes developmental delay with Angelman-like features. *J. Med. Genet.* 50, 65–73. doi:10.1136/jmedgenet-2012-101367.
- Hashimoto-Torii, K., Torii, M., and Sarkisian, M. (2008). Interaction between Reelin and Notch signaling regulates neuronal migration in the cerebral cortex. *Neuron* 60, 273–284. doi:10.1016/j.neuron.2008.09.026.Interaction.
- Hashimoto, R., Nakazawa, T., Tsurusaki, Y., Yasuda, Y., Nagayasu, K., Matsumura, K., et al. (2016). Whole-exome sequencing and neurite outgrowth analysis in autism spectrum disorder. *J. Hum. Genet.* 61, 199–206. doi:10.1038/jhg.2015.141.
- Hatakeyama, J. (2004). Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development* 131, 5539–5550. doi:10.1242/dev.01436.
- Haubensak, W., Attardo, a., Denk, W., and Huttner, W. B. (2004). From The Cover: Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: A major site of neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 3196–3201. doi:10.1073/pnas.0308600100.
- He, K. K., Goel, A. a, Ciarkowski, C. E. C. E., Song, L. L., and Lee, H.-K. H. K. (2011). Brain area specific regulation of synaptic AMPA receptors by phosphorylation. *Commun. Integr. Biol.* 4, 569–572. doi:10.4161/cib.4.5.15890.
- Hershko, A., Heller, H., Elias, S., and Ciechanover, A. (1983). Components of Ubiquitin-Protein Ligase System. *J. Biol. Chem.* 258, 8206–8214. doi:papers2://publication/uuid/C82E58FF-33C7-42BF-BC20-CDD10219EC6E.
- Hicke, L. (2001). Protein Regulation By Monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 195–201. doi:10.1038/35056583.
- Hiesberger, T., Trommsdorff, M., Howell, B. W., Goffinet, A., Mumby, M. C., Cooper, J. a., et al. (1999). Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of Disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron* 24, 481–489. doi:10.1016/S0896-6273(00)80861-2.
- Higa, L. A., Yang, X., Zheng, J., Banks, D., Wu, M., Ghosh, P., et al. (2006). Involvement of CUL4 ubiquitin E3 ligases in regulating CDK inhibitors Dacapo/p27Kip1 and cyclin E degradation. *Cell Cycle* 5, 71–77. doi:10.4161/cc.5.1.2266.
- Hirabayashi, Y., Itoh, Y., Tabata, H., Nakajima, K., Akiyama, T., Masuyama, N., et al. (2004). The Wnt/ -catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development* 131, 2791–2801. doi:10.1242/dev.01165.
- Hitchins, M. P., Rickard, S., Dhalla, F., Fairbrother, U. L., de Vries, B. B. a, Winter, R., et al. (2004). Investigation of UBE3A and MECP2 in Angelman syndrome (AS) and patients with features of AS. *Am. J. Med. Genet. A* 125A, 167–172. doi:10.1002/ajmg.a.20343.
- Hochstrasser, M. (2006). Lingering mysteries of ubiquitin-chain assembly. *Cell* 124, 27–34. doi:10.1016/j.cell.2005.12.025.
- Hochstrasser, M. (2009). Origin and function of ubiquitin-like proteins-2.pdf. *Nature* 458, 422–9. doi:10.1038/nature07958.

- Hoeller, D., Hecker, C.-M., and Dikic, I. (2006). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 6, 776–788. doi:10.1161/01.RES.0000264500.11888.f0.
- Hofmann, R. M., and Pickart, C. M. (1999). Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* 96, 645–53. doi:10.1016/S0092-8674(00)80575-9.
- Hollmann, M., and Heinemann, S. (1994). Cloned Glutamate Receptors. *Annu Rev Neurosci*, 31–108. doi:10.1146/annurev.neuro.17.1.31.
- Hollstein, R., Parry, D. A., Nalbach, L., Logan, C. V., Strom, T. M., Hartill, V. L., et al. (2015). HACE1 deficiency causes an autosomal recessive neurodevelopmental syndrome. *J. Med. Genet.* 52, 797–803. doi:10.1136/jmedgenet-2015-103344.
- Hong, S. E., Shugart, Y. Y., Huang, D. T., Shahwan, S. a, Grant, P. E., Hourihane, J. O., et al. (2000). Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nat. Genet.* 26, 93–96. doi:10.1038/79246.
- Hoppe, T. (2005). Multiubiquitylation by E4 enzymes: “One size” doesn’t fit all. *Trends Biochem. Sci.* 30, 183–187. doi:10.1016/j.tibs.2005.02.004.
- Howell, B. W., Gertler, F. B., and Cooper, J. a. (1997). Mouse disabled (mDab1): A Src binding protein implicated in neuronal development. *EMBO J.* 16, 121–132. doi:10.1093/emboj/16.1.121.
- Howell, B. W., Herrick, T. M., and Cooper, J. a. (1999). Reelin-induced tyrosine phosphorylation of Disabled 1 during neuronal positioning. *Genes Dev.* 13, 643–648. doi:10.1101/gad.13.6.643.
- Hsia, H.-E., Kumar, R., Luca, R., Takeda, M., Courchet, J., Nakashima, J., et al. (2014). Ubiquitin E3 ligase Nedd4-1 acts as a downstream target of PI3K/PTEN-mTORC1 signaling to promote neurite growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 13205–10. doi:10.1073/pnas.1400737111.
- Hu, J., Zacharek, S., He, Y. J., Hu, J., Zacharek, S., He, Y. J., et al. (2008). WD40 protein FBW5 promotes ubiquitination of tumor suppressor TSC2 by DDB1 – CUL4 – ROC1 ligase WD40 protein FBW5 promotes ubiquitination of tumor suppressor TSC2 by DDB1 – CUL4 – ROC1 ligase. 866–871. doi:10.1101/gad.1624008.
- Hung-Hsiang, Y., and Kolodkin, A. L. (1999). Semaphorin signaling: A little less per-plexin. *Neuron* 22, 11–14. doi:10.1016/S0896-6273(00)80672-8.
- Hurley, J. H., Lee, S., and Prag, G. (2006). Ubiquitin-binding domains. *J. Biol. Chem.* 399, 361–372. doi:10.1042/BJ20061138.
- Huttner, W. B., and Brand, M. (1997). Asymmetric division and polarity of neuroepithelial cells. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 29–39. doi:10.1016/S0959-4388(97)80117-1.
- Iimura, A., Yamazaki, F., Suzuki, T., Endo, T., Nishida, E., and Kusakabe, M. (2016). The E3 ubiquitin ligase Hace1 is required for early embryonic development in *Xenopus laevis*. *BMC Dev. Biol.* 16, 31. doi:10.1186/s12861-016-0132-y.
- Ikonen, E., de Almeida, J. B., Fath, K. R., Burgess, D. R., Ashman, K., Simons, K., et al. (1997). Myosin II is associated with Golgi membranes: identification of p200 as nonmuscle myosin II on Golgi-derived vesicles. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 1, 2155–2164.
- Inestrosa, N. C., and Varela-nallar, L. World’s largest Science , Technology & Medicine Open Access book publisher Wnt Signaling Roles on the Structure and Function of the Central Synapses : Involvement in Alzheimer ’ s Disease.
- Inoue, Y., and Imamura, T. (2008). Regulation of TGF- β family signaling by E3 ubiquitin ligases. *Cancer Sci.* 99, 2107–2112. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00925.x.
- Ishii, N., Owada, Y., Yamada, M., Miura, S., Murata, K., Asao, H., et al. (2001). Loss of neurons in the hippocampus and cerebral cortex of AMSH-deficient mice. *Mol. Cell. Biol.* 21, 8626–37. doi:10.1128/MCB.21.24.8626-8637.2001.
- Israël, A. (2010). The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, 1–14. doi:10.1101/cshperspect.a000158.
- Itoh, M., Kim, C.-H., Palardy, G., Oda, T., Jiang, Y.-J., Maust, D., et al. (2003). Mind Bomb Is a Ubiquitin Ligase that Is Essential for Efficient Activation of Notch Signaling by Delta. *Dev. Cell* 4, 67–82. doi:10.1016/S1534-5807(02)00409-4.
- Itoh, Y., Higuchi, M., Oishi, K., Kishi, Y., Okazaki, T., Sakai, H., et al. (2016). PDK1-Akt pathway regulates radial neuronal migration and microtubules in the developing mouse neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E2955-64. doi:10.1073/pnas.1516321113.
- Jackson, S. E. (2006). Ubiquitin: a small protein folding paradigm. *Org. Biomol. Chem.* 4, 1845–1853. doi:10.1039/b600829c.

- Jaglin, X. H., and Chelly, J. (2009). Tubulin-related cortical dysgeneses: microtubule dysfunction underlying neuronal migration defects. *Trends Genet.* 25, 555–566. doi:10.1016/j.tig.2009.10.003.
- Jehn, B. M., Dittert, I., Beyer, S., Von Der Mark, K., and Bielke, W. (2002). c-Cbl binding and ubiquitin-dependent lysosomal degradation of membrane-associated Notch1. *J. Biol. Chem.* 277, 8033–8040. doi:10.1074/jbc.M108552200.
- Jenkins, M. a., and Traynelis, S. F. (2012). PKC phosphorylates GluA1-Ser831 to enhance AMPA receptor conductance. *Channels (Austin)*. 6, 60–64. doi:10.4161/chan.6.1.18648.
- Jiang, Y. hui, Armstrong, D., Albrecht, U., Atkins, C. M., Noebels, J. L., Eichele, G., et al. (1998). Mutation of the Angelman ubiquitin ligase in mice causes increased cytoplasmic p53 and deficits of contextual learning and long-term potentiation. *Neuron* 21, 799–811. doi:10.1016/S0896-6273(00)80596-6.
- Jin, J., Arias, E. E., Chen, J., Harper, J. W., and Walter, J. C. (2006). A Family of Diverse Cul4-Ddb1-Interacting Proteins Includes Cdt2, which Is Required for S Phase Destruction of the Replication Factor Cdt1. *Mol. Cell* 23, 709–721. doi:10.1016/j.molcel.2006.08.010.
- Jin, J., Li, X., Gygi, S. P., and Harper, J. W. (2007). Dual E1 activation systems for ubiquitin differentially regulate E2 enzyme charging. *Nature* 447, 1135–1138. doi:10.1038/nature05902.
- Jossin, Y., and Cooper, J. a (2011). Reelin, Rap1 and N-cadherin orient the migration of multipolar neurons in the developing neocortex. *Neuron* 14, 697–703. doi:10.1038/nn.2816.Reelin.
- Ka, M., Condorelli, G., Woodgett, J. R., and Kim, W.-Y. (2014). mTOR regulates brain morphogenesis by mediating GSK3 signaling. *Development* 141, 4076–4086. doi:10.1242/dev.108282.
- Kajiro, M., Tsuchiya, M., Kawabe, Y., Furumai, R., Iwasaki, N., Hayashi, Y., et al. (2011). The E3 Ubiquitin Ligase Activity of Trip12 Is Essential for Mouse Embryogenesis. *PLoS One* 6, e25871. doi:10.1371/journal.pone.0025871.
- Kalil, K., and Dent, E. W. (2014). Branch management: mechanisms of axon branching in the developing vertebrate CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 7–18. doi:10.1038/nrn3650.
- Kang, K., Lee, D., Hong, S., Park, S.-G., and Song, M.-R. (2012). The E3 Ligase Mind Bomb-1 (Mib1) Modulates Delta-Notch Signaling to Control Neurogenesis and Gliogenesis in the Developing Spinal Cord *. doi:10.1074/jbc.M112.398263.
- Kassai, H., Sugaya, Y., Noda, S., Nakao, K., Maeda, T., Kano, M., et al. (2014). Selective Activation of mTORC1 Signaling Recapitulates Microcephaly, Tuberous Sclerosis, and Neurodegenerative Diseases. *Cell Rep.* 7, 1626–1639. doi:10.1016/j.celrep.2014.04.048.
- Katiyar, S., Liu, E., Knutzen, C. A., Lang, E. S., Lombardo, C. R., Sankar, S., et al. (2009). REDD1, an inhibitor of mTOR signalling, is regulated by the CUL4A–DDB1 ubiquitin ligase. *EMBO Rep.* 10, 866–872. doi:10.1038/embor.2009.93.
- Kato, K., Miya, F., Hori, I., Ieda, D., Ohashi, K., Negishi, Y., et al. (2017). A novel missense mutation in the HECT domain of NEDD4L identified in a girl with periventricular nodular heterotopia, polymicrogyria and cleft palate. *J. Hum. Genet.*, 1–3. doi:10.1038/jhg.2017.53.
- Katzmann, D. J., Odorizzi, G., and Emr, S. D. (2002). Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 893–905. doi:10.1038/nrm973.
- Kavakebi, P., Hausott, B., Tomasino, A., Ingorokva, S., and Klimaschewski, L. (2005). The N-end rule ubiquitin-conjugating enzyme, HR6B, is up-regulated by nerve growth factor and required for neurite outgrowth. doi:10.1016/j.mcn.2005.04.008.
- Kawabe, H., and Brose, N. (2011). The role of ubiquitylation in nerve cell development. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 251–268. doi:10.1038/nrn3009.
- Kawabe, H., Neeb, A., Dimova, K., Jr, S. M. Y., Katsurabayashi, S., Mitkovski, M., et al. (2010). Regulation of Rap2A by the Ubiquitin Ligase Nedd4-1 Controls Neurite Development. *Neuron* 65, 358–372. doi:10.1016/j.neuron.2010.01.007.Regulation.
- Killick, R., Niklison-Chirou, M., Tomasini, R., Bano, D., Rufini, A., Grespi, F., et al. (2011). p73: A multifunctional protein in neurobiology. *Mol. Neurobiol.* 43, 139–146. doi:10.1007/s12035-011-8172-6.
- Kim, S., Chahrour, M., Ben-Shachar, S., and Lim, J. (2013a). Ube3a/E6AP is involved in a subset of MeCP2 functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 437, 67–73. doi:10.1016/j.bbrc.2013.06.036.
- Kim, S. T., Tasaki, T., Zakrzewska, A., Yoo, Y. D., Sa Sung, K., Kim, S.-H., et al. (2013b). The N-end rule proteolytic system in autophagy. *Autophagy* 9, 1100–3. doi:10.4161/auto.24643.

- Kim, T.-H., Lee, H. K., Seo, I. A., Bae, H. R., Suh, D. J., Wu, J., et al. (2005). Netrin induces down-regulation of its receptor, Deleted in Colorectal Cancer, through the ubiquitin–proteasome pathway in the embryonic cortical neuron. *95*, 1–8. doi:10.1007/s11103-011-9767-z.Plastid.
- Kirkin, V., and Dikic, I. (2007). Role of ubiquitin- and Ubl-binding proteins in cell signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* *19*, 199–205. doi:10.1016/j.ceb.2007.02.002.
- Kishino, T., Lalonde, M., and Wagstaff, J. (1997). UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat. Genet.* *15*, 70–73. doi:10.1038/ng0197-70.
- Knoepfler, P. S., Cheng, P. F., and Eisenman, R. N. (2002). N- myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes Dev.*, 2699–2712. doi:10.1101/gad.1021202.mediate.
- Komander, D. (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem. Soc. Trans.* *37*, 937–53. doi:10.1042/BST0370937.
- Komander, D., Clague, M. J., and Urbé, S. (2009). Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 550–563. doi:10.1038/nrm2731.
- Konishi, Y., Stegmüller, J., Matsuda, T., Bonni, S., and Bonni, A. (2004). Cdh1-APC Controls Axonal Growth and Patterning in the Mammalian Brain. *Science (80-)*. *303*, 1026–1030. doi:10.1126/science.1093712.
- Koo, B.-K., Lim, H.-S., Song, R., Yoon, M.-J., Yoon, K.-J., Moon, J.-S., et al. (2005). Mind bomb 1 is essential for generating functional Notch ligands to activate Notch. *Development* *132*.
- Kosodo, Y., Röper, K., Haubensak, W., Marzesco, A.-M., Corbeil, D., and Huttner, W. B. (2004). Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells. *EMBO J.* *23*, 2314–24. doi:10.1038/sj.emboj.7600223.
- Kowalczyk, T., Pontious, A., Englund, C., Daza, R. a M., Bedogni, F., Hodge, R., et al. (2009). Intermediate neuronal progenitors (basal progenitors) produce pyramidal-projection neurons for all layers of cerebral cortex. *Cereb. Cortex* *19*, 2439–2450. doi:10.1093/cercor/bhn260.
- Krauss, S., Griesche, N., Jastrzebska, E., Chen, C., Rutschow, D., Achmüller, C., et al. (2013). Translation of HTT mRNA with expanded CAG repeats is regulated by the MID1-PP2A protein complex. *Nat Commun.* *4*, 1511. doi:10.1038/ncomms2514.
- Kriegstein, A., and varez-Buylla, A. (2009). The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annu. Rev. Neurosci.* *32*, 149–184. doi:10.1146/annurev.neuro.051508.135600.
- Kühnle, S., Kogel, U., Glockzin, S., Marquardt, A., Ciechanover, A., Matentzoglou, K., et al. (2011). Physical and functional interaction of the HECT ubiquitin-protein ligases E6AP and HERC2. *J. Biol. Chem.* *286*, 19410–19416. doi:10.1074/jbc.M110.205211.
- Kumar, A., Girimaji, S. C., Duvvari, M. R., and Blanton, S. H. (2008). Mutations in STIL, encoding a pericentriolar and centrosomal protein, cause primary microcephaly. *Am. J. Hum. Genet.* *84*, 286–290. doi:10.1016/j.ajhg.2009.01.017.
- Küry, S., Besnard, T., Ebstein, F., Khan, T. N., Gambin, T., Douglas, J., et al. (2017). De Novo Disruption of the Proteasome Regulatory Subunit PSMD12 Causes a Syndromic Neurodevelopmental Disorder. 1–12. doi:10.1016/j.ajhg.2017.01.003.
- Kuwahara, a., Hirabayashi, Y., Knoepfler, P. S., Taketo, M. M., Sakai, J., Kodama, T., et al. (2010). Wnt signaling and its downstream target N-myc regulate basal progenitors in the developing neocortex. *Development* *137*, 1035–1044. doi:10.1242/dev.046417.
- Kwon, Y. T., Xia, Z., An, J. Y., Tasaki, T., Davydov, I. V., Seo, J. W., et al. (2003). Female Lethality and Apoptosis of Spermatocytes in Mice Lacking the UBR2 Ubiquitin Ligase of the N-End Rule Pathway. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 8255–8271. doi:10.1128/MCB.23.22.8255–8271.2003.
- Kwon, Y. T., Xia, Z., Davydov, I. V., Lecker, S. H., and Varshavsky, A. (2001). Construction and Analysis of Mouse Strains Lacking the Ubiquitin Ligase UBR1 (E3_U) of the N-End Rule Pathway. *21*, 8007–8021. doi:10.1128/MCB.21.23.8007–8021.2001.
- Lai, E. C., and Rubin, G. M. (2001). Neuralized is essential for a subset of Notch pathway-dependent cell fate decisions during Drosophila eye development. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 5637–5642. doi:10.1073/pnas.101135498.
- Landrieu, P., and Goffinet, a. (1979). Mitotic spindle fiber orientation in relation to cell migration in the neo-cortex of normal and reeler mouse. *Neurosci. Lett.* *13*, 69–72. doi:10.1016/0304-3940(79)90077-6.
- Lange, W. (1975). Cell number and cell density in the cerebellar cortex of man and some other mammals. *Cell Tissue Res.* *157*, 115–124. doi:10.1007/BF00223234.

- LaSalle, J. M., Reiter, L. T., and Chamberlain, S. J. (2015). Epigenetic regulation of UBE3A and roles in human neurodevelopmental disorders. *Epigenomics* 7, 1213–28. doi:10.2217/epi.15.70.
- LaSarge, C. L., and Danzer, S. C. (2014). Mechanisms regulating neuronal excitability and seizure development following mTOR pathway hyperactivation. *Front. Mol. Neurosci.* 7, 18. doi:10.3389/fnmol.2014.00018.
- Lasorella, A., Stegmüller, J., Guardavaccaro, D., Liu, G., Carro, M. S., Rothschild, G., et al. (2006). Degradation of Id2 by the anaphase-promoting complex couples cell cycle exit and axonal growth. *Nature* 442, 471–474. doi:10.1038/nature04895.
- Le Borgne, R., and Schweisguth, F. (2003). Unequal segregation of neuralized biases Notch activation during asymmetric cell division. *Dev. Cell* 5, 139–148. doi:10.1016/S1534-5807(03)00187-4.
- Lee, G. H., and D’Arcangelo, G. (2016). New Insights into Reelin-Mediated Signaling Pathways. *Front. Cell. Neurosci.* 10, 1–8. doi:10.3389/fncel.2016.00122.
- Lee, J. H., Huynh, M., Silhavy, J. L., Kim, S., Dixon-Salazar, T., Heiberg, A., et al. (2012). De novo somatic mutations in components of the PI3K-AKT3-mTOR pathway cause hemimegalencephaly. *Nat. Genet.* 44, 941–945. doi:10.1038/ng.2329.
- Lehmann, R., Jimenez, F., Dietrich, U., and Campos-Ortega, J. A. (1983). On the phenotype and development of mutants of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux’s Arch. Dev. Biol.* 192, 62–74. doi:10.1007/BF00848482.
- Lehtinen, M. K., and Walsh, C. a (2011). Neurogenesis at the brain-cerebrospinal fluid interface. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 653–79. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154026.
- Lemke, G. (2001). Glial Control of Neuronal Development. 87–105.
- Leventer, R. J., Jansen, A., Pilz, D. T., Stoodley, N., Marini, C., Dubeau, F., et al. (2010). Clinical and imaging heterogeneity of polymicrogyria: A study of 328 patients. *Brain* 133, 1415–1427. doi:10.1093/brain/awq078.
- Li, W., Cogswell, C. a, and LoTurco, J. J. (1998). Neuronal differentiation of precursors in the neocortical ventricular zone is triggered by BMP. *J. Neurosci.* 18, 8853–8862.
- Lindenbaum, M. H., Carbonetto, S., Grosveld, F., Flavell, D., and Mushynski, W. E. (1988). Transcriptional and post-transcriptional effects of nerve growth factor on expression of the three neurofilament subunits in PC-12 cells. *J. Biol. Chem.* 263, 5662–5667. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3128545 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3128545>.
- Liu, B. P., and Strittmatter, S. M. (2001). Semaphorin-mediated axonal guidance via Rho-related G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 619–626. doi:10.1016/S0955-0674(00)00260-X.
- Louvi, A., and Grove, E. a. (2011). Cilia in the CNS: The quiet organelle claims center stage. *Neuron* 69, 1046–1060. doi:10.1016/j.neuron.2011.03.002.
- Lu, J., Tiao, G., Folkerth, R., Hecht, J., Walsh, C., and Sheen, V. (2006). Overlapping expression of ARFGEF2 and filamin A in the neuroependymal lining of the lateral ventricles: Insights into the cause of periventricular heterotopia. *J. Comp. Neurol.* 494, 476–484. doi:10.1002/cne.20806.
- Lu, T., Chen, R., Cox, T. C., Moldrich, R. X., Kurniawan, N., Tan, G., et al. (2013). X-linked microtubule-associated protein, Mid1, regulates axon development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 19131–6. doi:10.1073/pnas.1303687110.
- Lyuksyutova, A. I. (2003). Anterior-Posterior Guidance of Commissural Axons by Wnt-Frizzled Signaling. *Science (80-.)*. 302, 1984–1988. doi:10.1126/science.1089610.
- Mabie, Mehler, and Kessler (1999). Multiple roles of bone morphogenetic protein signaling in the regulation of cortical cell number and phenotype. *J. Neurosci.* 19, 7077–7088.
- Machon, O., Van Den Bout, C. J., Backman, M., Kemler, R., and Krauss, S. (2003). Role of β -catenin in the developing cortical and hippocampal neuroepithelium. *Neuroscience* 122, 129–143. doi:10.1016/S0306-4522(03)00519-0.
- Maekawa, M., Takashima, N., Arai, Y., Nomura, T., Inokuchi, K., Yuasi, S., et al. (2005). Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis. *Genes to Cells* 10, 1001–1014. doi:10.1111/j.1365-2443.2005.00893.x.
- Magri, L., Cambiaghi, M., Cominelli, M., Alfaro-Cervello, C., Cursi, M., Pala, M., et al. (2011). Sustained activation of mTOR pathway in embryonic neural stem cells leads to development of tuberous sclerosis complex-associated lesions. *Cell Stem Cell* 9, 447–462. doi:10.1016/j.stem.2011.09.008.
- Manabe, R., Kovalenko, M., Webb, D. J., and Horwitz, A. R. (2002). GIT1 functions in a motile, multi-

- molecular signaling complex that regulates protrusive activity and cell migration. *J. Cell Sci.* 115, 1497–1510. doi:10.1128/MCB.20.17.6354-6363.2000.
- Margolis, S. S., Salogiannis, J., Lipton, D. M., Mandel-Brehm, C., Wills, Z. P., Mardinly, A. R., et al. (2010). EphB-mediated degradation of the RhoA GEF Ephexin5 relieves a developmental brake on excitatory synapse formation. *Cell* 143, 442–455. doi:10.1016/j.cell.2010.09.038.
- Marín, O. (2013). Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of neocortical interneurons. *Eur. J. Neurosci.* 38, 2019–2029. doi:10.1111/ejn.12225.
- Marín, O., and Müller, U. (2014). Lineage origins of GABAergic versus glutamatergic neurons in the neocortex. *Curr. Opin. Neurobiol.* 26, 132–141. doi:10.1016/j.conb.2014.01.015.
- Markson, G., Kiel, C., Hyde, R., Brown, S., Charalabous, P., Bremm, A., et al. (2009). Analysis of the human E2 ubiquitin conjugating enzyme protein interaction network Analysis of the human E2 ubiquitin conjugating enzyme protein interaction network. 1905–1911. doi:10.1101/gr.093963.109.
- Matsumoto, A., Onoyama, I., Sunabori, T., Kageyama, R., Okano, H., and Nakayama, K. I. (2011). Fbxw7-dependent Degradation of Notch Is Required for Control of ‘Stemness’ and Neuronal-Glial Differentiation in Neural Stem Cells * □ S. doi:10.1074/jbc.M110.194936.
- Matsuno, K., Diederich, R. J., Go, M. J., Blaumueller, C. M., and Artavanis-Tsakonas, S. (1995). Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. *Development* 121, 2633–2644.
- Matsuzaki, F., and Shitamukai, A. (2015). Cell division modes and cleavage planes of neural progenitors during mammalian cortical development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, 1–16. doi:10.1101/cshperspect.a015719.
- Matthew Corley, and Kroll, K. L. (2015). The Roles and Regulation of Polycomb Complexes in Neural Development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 359, 65–85. doi:10.1038/nrm2621.
- McConnell, S. K. (1995). Constructing the cerebral cortex: Neurogenesis and fate determination. *Neuron* 15, 761–768. doi:10.1016/0896-6273(95)90168-X.
- McDonell, L. M., Mirzaa, G. M., Alcantara, D., Schwartzenuber, J., Carter, M. T., Lee, L. J., et al. (2013). Mutations in STAMBP, encoding a deubiquitinating enzyme, cause microcephaly-capillary malformation syndrome. *Nat. Genet.* 45, 556. doi:10.1038/ng.2602.
- Mcfarlane, S., Cornel, E., Amaya, E., and Holt, C. E. (1996). Inhibition of FGF Receptor Activity in Retinal Ganglion Cell Axons Causes Errors in Target Recognition be easily amenable to experimental manipulation, thus providing a very attractive system for studying the mo. *Neuron* 17, 245–254.
- Mehler, M. F., Mabie, P. C., Zhu, G., Gokhan, S., and Kessler, J. a (2000). Developmental changes in progenitor cell responsiveness to bone morphogenetic proteins differentially modulate progressive CNS lineage fate. *Dev. Neurosci.* 22, 74–85. doi:10.1159/000017429.
- Merello, E., Swanson, E., De Marco, P., Akhter, M., Striano, P., Rossi, A., et al. (2008). No major role for the EMX2 gene in schizencephaly. *Am. J. Med. Genet. Part A* 146, 1142–1150. doi:10.1002/ajmg.a.32264.
- Michelle, C., Vourc’H, P., Mignon, L., and Andres, C. R. (2009). What was the set of ubiquitin and ubiquitin-like conjugating enzymes in the eukaryote common ancestor? *J. Mol. Evol.* 68, 616–628. doi:10.1007/s00239-009-9225-6.
- Mirzaa, G., Dodge, N. N., Glass, I., Day, C., Gripp, K., Nicholson, L., et al. (2004). Megalencephaly and perisylvian polymicrogyria with postaxial polydactyly and hydrocephalus: A rare brain malformation syndrome associated with mental retardation and seizures. *Neuropediatrics* 35, 353–359. doi:10.1055/s-2004-830497.
- Mirzaa, G. M., Conti, V., Timms, A. E., Smyser, C. D., Ahmed, S., Carter, M., et al. (2015). Characterisation of mutations of the phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit, PIK3R2, in perisylvian polymicrogyria: A next-generation sequencing study. *Lancet Neurol.* 14, 1182–1195. doi:10.1016/S1474-4422(15)00278-1.
- Mirzaa, G., Parry, D. A., Fry, A. E., Giamanco, K. A., Vanstone, M., Logan, C. V., et al. (2014). De novo CCND2 mutations leading to stabilization of cyclin D2 cause megalencephaly-polymicrogyria-polydactyly- hydrocephalus syndrome. 46, 510–515. doi:10.1038/ng.2948.De.
- Miyata, T. (2004). Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development* 131, 3133–3145. doi:10.1242/dev.01173.
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H., and Ogawa, M. (2001). Asymmetric inheritance of radial glial

- fibers by cortical neurons. *Neuron* 31, 727–741. doi:10.1016/S0896-6273(01)00420-2.
- Mizuguchi, M., Ikeda, K., and Takashima, S. (2000). Simultaneous loss of hamartin and tuberlin from the cerebrum, kidney and heart with tuberous sclerosis. *Acta Neuropathol.* 99, 503–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10805093>.
- Mizutani, K., Yoon, K., Dang, L., Tokunaga, A., and Gaiano, N. (2007). Differential Notch signalling distinguishes neural stem cells from intermediate progenitors. *Nature* 449, 351–355. doi:10.1038/nature06090.
- Molnár, Z., Métin, C., Stoykova, A., Tarabykin, V., Price, D. J., Francis, F., et al. (2006). Comparative aspects of cerebral cortical development. *Eur. J. Neurosci.* 23, 921–934. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04611.x.
- Moon, B.-S., Yoon, J.-Y., Kim, M.-Y., Lee, S.-H., Choi, T., and Choi, K.-Y. (2009). Bone morphogenetic protein 4 stimulates neuronal differentiation of neuronal stem cells through the ERK pathway. *Exp. Mol. Med.* 41, 116–25. doi:10.3858/emmm.2009.41.2.014.
- Moon, U. Y., Park, J. Y., Park, R., Cho, J. Y., Hughes, L. J., McKenna, J., et al. (2015). Impaired Reelin-Dab1 Signaling Contributes to Neuronal Migration Deficits of Tuberous Sclerosis Complex. *Cell Rep.* 12, 965–978. doi:10.1016/j.celrep.2015.07.013.
- Moretti, J., and Brou, C. (2013). Ubiquitinations in the Notch signaling pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 6359–6381. doi:10.3390/ijms14036359.
- Moretti, J., Chastagner, P., Gastaldello, S., Heuss, S. F., Dirac, A. M., Bernards, R., et al. (2010). The translation initiation factor 3f (eIF3f) exhibits a deubiquitinase activity regulating notch activation. *PLoS Biol.* 8. doi:10.1371/journal.pbio.1000545.
- Mori, D., Yano, Y., Toyo-oka, K., Yoshida, N., Yamada, M., Muramatsu, M., et al. (2007). NDEL1 Phosphorylation by Aurora-A Kinase Is Essential for Centrosomal Maturation, Separation, and TACC3 Recruitment. *Mol. Cell. Biol.* 27, 352–367. doi:10.1128/MCB.00878-06.
- Murakami, M., and Ichisaka, T. (2004). mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 24, 6710–6718. doi:10.1128/MCB.24.15.6710.
- Muratani, M., and Tansey, W. P. (2003). How the ubiquitin–proteasome system controls transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 192–201. doi:10.1038/nrm1049.
- Myat, A., Henry, P., McCabe, V., Flintoft, L., Rotin, D., and Tear, G. (2002). Drosophila Nedd4, a ubiquitin ligase, is recruited by Commissureless to control cell surface levels of the Roundabout receptor. *Neuron* 35, 447–459. doi:10.1016/S0896-6273(02)00795-X.
- Nadarajah, B., Brunstrom, J. E., Grutzendler, J., Wong, R. O., and Pearlman, a L. (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat. Neurosci.* 4, 143–150. doi:10.1038/83967.
- Nakagawa, T., and Xiong, Y. (2011). X-Linked Mental Retardation Gene CUL4B Targets Ubiquitylation of H3K4 Methyltransferase Component WDR5 and Regulates Neuronal Gene Expression. *Mol. Cell* 43, 381–391. doi:10.1016/j.molcel.2011.05.033.
- Nascimento, R. M. P., Otto, P. A., de Brouwer, A. P. M., and Vianna-Morgante, A. M. (2006). UBE2A, which encodes a ubiquitin-conjugating enzyme, is mutated in a novel X-linked mental retardation syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 79, 549–55. doi:10.1086/507047.
- Nguyen, L. S., Schneider, T., Rio, M., Moutton, S., Siquier-Pernet, K., Verny, F., et al. (2015). A nonsense variant in HERC1 is associated with intellectual disability, megalencephaly, thick corpus callosum and cerebellar atrophy. *Eur. J. Hum. Genet.*, 1–4. doi:10.1038/ejhg.2015.140.
- Nichols, J. T., Miyamoto, A., Olsen, S. L., D’Souza, B., Yao, C., and Weinmaster, G. (2007). DSL ligand endocytosis physically dissociates Notch1 heterodimers before activating proteolysis can occur. *J. Cell Biol.* 176, 445–458. doi:10.1083/jcb.200609014.
- Niethammer, M., Smith, D. S., Ayala, R., Peng, J., Ko, J., Lee, M. S., et al. (2000). NUDEL is a novel Cdk5 substrate that associates with LIS1 and cytoplasmic dynein. *Neuron* 28, 697–711. doi:10.1016/S0896-6273(00)00147-1.
- Noctor, S. C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L., and Kriegstein, A. R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat. Neurosci.* 7, 136–144. doi:10.1038/nn1172.
- Öberg, C., Li, J., Pauley, A., Wolf, E., Gurney, M., and Lendahl, U. (2001). The Notch Intracellular Domain is Ubiquitinated and Negatively Regulated by the Mammalian Sel-10 Homolog. *J. Biol. Chem.* 276, 35847–35853. doi:10.1074/jbc.M103992200.

- Odajima, J., Wills, Z. P., Ndassa, Y. M., Terunuma, M., Kretschmannova, K., Deeb, T. Z., et al. (2011). Cyclin E Constrains Cdk5 Activity to Regulate Synaptic Plasticity and Memory Formation. *Dev. Cell* 21, 655–668. doi:10.1016/j.devcel.2011.08.009.
- Ohata, S., Aoki, R., Kinoshita, S., Yamaguchi, M., Tsuruoka-Kinoshita, S., Tanaka, H., et al. (2011). Dual roles of notch in regulation of apically restricted mitosis and apicobasal polarity of neuroepithelial cells. *Neuron* 69, 215–230. doi:10.1016/j.neuron.2010.12.026.
- Oishi, K., Watatani, K., Itoh, Y., Okano, H., Guillemot, F., Nakajima, K., et al. (2009). Selective induction of neocortical GABAergic neurons by the PDK1-Akt pathway through activation of Mash1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 13064–13069. doi:10.1073/pnas.0808400106.
- Olguin, P. (2006). RE-1 Silencer of Transcription/Neural Restrictive Silencer Factor Modulates Ectodermal Patterning during Xenopus Development. *J. Neurosci.* 26, 2820–2829. doi:10.1523/JNEUROSCI.5037-05.2006.
- Ortega-Recalde, O., Beltran, O. I., Galvez, J. M., Palma-Montero, A., Restrepo, C. M., Mateus, H. E., et al. (2015). Biallelic HERC1 mutations in a syndromic form of overgrowth and. *Clin. Genet.* 88(4), 1–3.
- Ortega, J. A., and Alcántara, S. (2010). BDNF/MAPK/ERK-induced BMP7 expression in the developing cerebral cortex induces premature radial glia differentiation and impairs neuronal migration. *Cereb. Cortex* 20, 2132–2144. doi:10.1093/cercor/bhp275.
- Oscar Marin1, Manuel Valiente1, and, X. G., and Tsai2, L.-H. (2010). Guiding Neuronal Cell Migrations. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, 1–21. doi:doi:10.1101/cshperspect.a001834.
- Ossipova, O., Ezan, J., and Sokol, S. Y. (2009). PAR-1 phosphorylates Mind bomb to promote vertebrate neurogenesis. *Dev. Cell* 17, 222–233. doi:10.1016/j.devcel.2009.06.010.PAR-1.
- Overstreet, E., Fitch, E., and Fischer, J. a (2004). Fat facets and Liquid facets promote Delta endocytosis and Delta signaling in the signaling cells. *Development* 131, 5355–66. doi:10.1242/dev.01434.
- Padmanabhan, J., Park, D. S., Greene, L. a, and Shelanski, M. L. (1999). Role of cell cycle regulatory proteins in cerebellar granule neuron apoptosis. *J. Neurosci.* 19, 8747–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10516294>.
- Palm, K., Belluardo, N., Metsis, M., and Timmusk, T. onis (1998). Neuronal Expression of Zinc Finger Transcription Factor REST/NRSF/XBR Gene. *J. Neurosci.* 18, 1280–1296. Available at: <http://www.jneurosci.org/content/18/4/1280.long>.
- Paridaen, J. T., and Huttner, W. B. (2014). Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep.* 15, 351–364. doi:10.1002/embr.201438447.
- Parks, a L., Klueg, K. M., Stout, J. R., and Muskavitch, M. a (2000). Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development* 127, 1373–1385. doi:10.1038/ng0797-212.
- Parrini, E., Ramazzotti, a., Dobyns, W. B., Mei, D., Moro, F., Veggiotti, P., et al. (2006). Periventricular heterotopia: Phenotypic heterogeneity and correlation with Filamin a mutations. *Brain* 129, 1892–1906. doi:10.1093/brain/awl125.
- Pasko Rakic (2007). The radial edifice of cortical architecture: From neuronal silhouettes to genetic engineering. *Brain Res Rev* 55, 204–219. doi:10.1038/nrm2621.
- Passemard, S., Titomanlio, L., Elmaleh, M., Afenjar, a., Alessandri, J. L., Andria, G., et al. (2009). Expanding the clinical and neuroradiologic phenotype of primary microcephaly due to ASPM mutations. *Neurology* 73, 962–969. doi:10.1212/WNL.0b013e3181b8799a.
- Pavlopoulos, E., Pitsouli, C., Klueg, K. M., Muskavitch, M. A. T., Moschonas, N. K., and Delidakis, C. (2001). Neuralized Encodes a Peripheral Membrane Protein Involved in Delta Signaling and Endocytosis. *Dev. Cell* 1, 807–816. doi:10.1016/S1534-5807(01)00093-4.
- Pelzer, C., Kassner, I., Matentzoglou, K., Singh, R. K., Wollscheid, H. P., Scheffner, M., et al. (2007). UBE1L2, a novel E1 enzyme specific for ubiquitin. *J. Biol. Chem.* 282, 23010–23014. doi:10.1074/jbc.C700111200.
- Pettersson, S., Sczaniecka, M., McLaren, L., Russell, F., Gladstone, K., Hupp, T., et al. (2013). Non-degradative ubiquitination of the Notch1 receptor by the E3 ligase MDM2 activates the Notch signalling pathway. *Biochem. J.* 450, 523–36. doi:10.1042/BJ20121249.
- Piao, X., Hill, R. S., Bodell, A., Chang, B. S., Basel-vanagaite, L., Straussberg, R., et al. (2004). R EPORTS G Protein – Coupled Receptor – Dependent Development of Human Frontal Cortex. 303, 2033–

- 2036.
- Pickart, C. M., and Eddins, M. J. (2004). Ubiquitin: Structures, functions, mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1695, 55–72. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.09.019.
- Pilz, D. T., Julie, K., Matsumoto, N., Bodurtha, J., Bernadi, B., Tassinari, C. a., et al. (1999). Subcortical band heterotopia in rare affected males can be caused by missense mutations in DCX(XLIS) or LIS1. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1757–1760. doi:10.1093/hmg/8.9.1757.
- Pilz, G.-A., Shitamukai, A., Reillo, I., Pacary, E., Schwausch, J., Stahl, R., et al. (2013). Amplification of progenitors in the mammalian telencephalon includes a new radial glial cell type. *Nat. Commun.* 4, 1–11. doi:10.1038/ncomms3125.
- Plafker, S. M., Plafker, K. S., Weissman, A. M., and Macara, I. G. (2004). Ubiquitin charging of human class III ubiquitin-conjugating enzymes triggers their nuclear import. *J. Cell Biol.* 167, 649–659. doi:10.1083/jcb.200406001.
- Poduri, A., Evrony, G. D., Cai, X., Elhosary, P. C., Beroukhi, R., Lehtinen, M. K., et al. (2012). Somatic Activation of AKT3 Causes Hemispheric Developmental Brain Malformations. 74, 41–48. doi:10.1016/j.neuron.2012.03.010.Somatic.
- Poirier, K., Keays, D. A., Francis, F., Saillour, Y., Bahi, N., Manouvrier, S., et al. (2007). Large Spectrum of Lissencephaly and Pachygyria Phenotypes Resulting from De Novo Missense Mutations in Tubulin Alpha 1A (TUB A1A). *Hum. Mutat.* 28, 1055–1064. doi:10.1002/humu.
- Poirier, K., Lebrun, N., Broix, L., Tian, G., Saillour, Y., Boscheron, C., et al. (2013). Mutations in TUBG1, DYNC1H1, KIF5C and KIF2A cause malformations of cortical development and microcephaly. *Nat. Genet.* 45, 639–47. doi:10.1038/ng.2613.
- Poulsen, E. G., Steinhauer, C., Lees, M., Lauridsen, A. M., Ellgaard, L., and Hartmann-Petersen, R. (2012). HUWE1 and TRIP12 Collaborate in Degradation of Ubiquitin-Fusion Proteins and Misframed Ubiquitin. *PLoS One* 7, 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0050548.
- Puffenberger, E. G., Strauss, K. a., Ramsey, K. E., Craig, D. W., Stephan, D. a., Robinson, D. L., et al. (2007). Polyhydramnios, megalencephaly and symptomatic epilepsy caused by a homozygous 7-kilobase deletion in LYK5. *Brain* 130, 1929–1941. doi:10.1093/brain/awm100.
- Puram, S. V., Kim, A. H., and Bonni, A. (2010). An Old Dog Learns New Tricks: A Novel Function for Cdc20-APC in Dendrite Morphogenesis in Neurons. 9, 482–485. doi:10.1086/498510.Parasitic.
- Purro, S. A., Ciani, L., Hoyos-Flight, M., Stamatakou, E., Siomou, E., and Salinas, P. C. (2008). Wnt Regulates Axon Behavior through Changes in Microtubule Growth Directionality: A New Role for Adenomatous Polyposis Coli. *J. Neurosci.* 28, 8644–8654. doi:10.1523/JNEUROSCI.2320-08.2008.
- Quaderi, N. A., Schweiger, S., Gaudenz, K., Franco, B., Rugarli, E. I., Berger, W., et al. (1997). Opitz G/BBB syndrome, a defect of midline development, is due to mutations in a new RING finger gene on Xp22. *Nat. Genet.* 17, 285–291. doi:10.1038/ng1197-285.
- Radakovits, R., Barros, C. S., Belvindrah, R., Patton, B., and Müller, U. (2009). Regulation of radial glial survival by signals from the meninges. *Dev. Biol.* 29, 7694–7705. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3277.Biomarkers.
- Rakic, P. (1974). *Analysis Primates.*
- Ravid, T., and Hochstrasser, M. (2007). Autoregulation of an E2 enzyme by ubiquitin-chain assembly on its catalytic residue. *Nat. Cell Biol.* 9, 422–427. doi:10.1038/ncb1558.
- Redmond, L., and Ghosh, A. (2001). The role of Notch and Rho GTPases signaling in the control of dendritic development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 111–117.
- Reiner, O., Carrozzo, R., Shen, Y., Wehnert, M., Faustinella, F., Dobyns, W. B., et al. (1993). Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature* 364, 717–721. doi:10.1038/364717a0.
- Ribierre, T., and Baulac, S. (2016). mTOR pathway in familial focal epilepsies. 8, 5674–5675. doi:10.18632/oncotarget.14234.
- Rivière, J.-B., Mirzaa, G. M., O’Roak, B. J., Beddaoui, M., Alcantara, D., Conway, R. L., et al. (2012). De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat. Genet.* 44, 934–40. doi:10.1038/ng.2331.
- Roeben N. Munji, Youngshik Choe, Guangnan Li, Julie A. Siegenthaler, and S. J. P. (2011). Wnt signaling regulates neuronal differentiation of cortical intermediate progenitors. *J. Neurosci.* 31, 1676–1687. doi:10.1523/JNEUROSCI.5404-10.2011.Wnt.
- Román-Trufero, M., Méndez-Gómez, H. R., Pérez, C., Hijikata, A., Fujimura, Y. I., Endo, T., et al. (2009).

- Maintenance of undifferentiated state and self-renewal of embryonic neural stem cells by polycomb protein Ring1B. *Stem Cells* 27, 1559–1570. doi:10.1002/stem.82.
- Rotin, D., and Kumar, S. (2009). Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 398–409. doi:10.1038/nrm2690.
- Scheffner, M., Nuber, U., and Huibregtse, J. M. (1995). Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* 373, 81–83. doi:10.1038/373081a0.
- Schwamborn, J. C., Berezikov, E., and Knoblich, J. a. (2009). The TRIM-NHL Protein TRIM32 Activates MicroRNAs and Prevents Self-Renewal in Mouse Neural Progenitors. *Cell* 136, 913–925. doi:10.1016/j.cell.2008.12.024.
- Schwamborn, J. C., and Püschel, A. W. (2004). The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat. Neurosci.* 7, 923–929. doi:10.1038/nn1295.
- Sczaniecka, M., Gladstone, K., Pettersson, S., McLaren, L., Huart, A. S., and Wallace, M. (2012). MDM2 protein-mediated ubiquitination of NUMB protein: Identification of a second physiological substrate of MDM2 that employs a dual-site docking mechanism. *J. Biol. Chem.* 287, 14052–14068. doi:10.1074/jbc.M111.303875.
- Segkilia, A., Seuntjens, E., Elkouris, M., Tsalavos, S., Stappers, E., Mitsiadis, T. A., et al. (2012). Bmp7 regulates the survival, proliferation, and neurogenic properties of neural progenitor cells during corticogenesis in the mouse. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0034088.
- Sekine, K., Honda, T., Kawauchi, T., Kubo, K., and Nakajima, K. (2011). The outermost region of the developing cortical plate is crucial for both the switch of the radial migration mode and the Dab1-dependent “inside-out” lamination in the neocortex. *J. Neurosci.* 31, 9426–39. doi:10.1523/JNEUROSCI.0650-11.2011.
- Sekine, K., Kawauchi, T., Kubo, K. I., Honda, T., Herz, J., Hattori, M., et al. (2012). Reelin Controls Neuronal Positioning by Promoting Cell-Matrix Adhesion via Inside-Out Activation of Integrin $\alpha 5 \beta 1$. *Neuron* 76, 353–369. doi:10.1016/j.neuron.2012.07.020.
- Sell, G. L., and Margolis, S. S. (2015). From UBE3A to Angelman syndrome: A substrate perspective. *Front. Neurosci.* 9, 1–6. doi:10.3389/fnins.2015.00322.
- Shariff, G. A. (1953). Cell counts in the primate cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 98, 381–400. doi:10.1002/cne.900980302.
- Shea, T. B., and Beermann, M. Lou (1999). Neuronal intermediate filament protein γ -internexin facilitates axonal neurite elongation in neuroblastoma cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 43, 322–333. doi:10.1002/(SICI)1097-0169(1999)43:4<322::AID-CM5>3.0.CO;2-B.
- Sheen, V. L., Ganesh, V. S., Topcu, M., Sebire, G., Bodell, a, Hill, R. S., et al. (2004). Mutations in ARFGEF2 implicate vesicle trafficking in neural progenitor proliferation and migration in the human cerebral cortex. *Nat Genet* 36, 69–76. doi:10.1038/ng1276.
- Sheldon, M., Rice, D. S., D’Arcangelo, G., Yoneshima, H., Nakajima, K., Mikoshiba, K., et al. (1997). Scrambler and yotari disrupt the disabled gene and produce a reeler-like phenotype in mice. *Nature* 389, 730–3. doi:10.1038/39601.
- Shen, J., Gilmore, E. C., Marshall, C. a, Haddadin, M., Reynolds, J. J., Eyaid, W., et al. (2010). Mutations in PNKP cause microcephaly, seizures and defects in DNA repair. *Nat. Genet.* 42, 245–9. doi:10.1038/ng.526.
- Sheng, Y., Saridakis, V., Sarkari, F., Duan, S., Wu, T., Arrowsmith, C. H., et al. (2006). Molecular recognition of p53 and MDM2 by USP7/HAUSP. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 285–291. doi:10.1038/nsmb1067.
- Shi, S.-H., Cheng, T., Jan, L. Y., and Jan, Y.-N. (2004). APC and GSK-3 β Are Involved in mPar3 Targeting to the Nascent Axon and Establishment of Neuronal Polarity. *Curr. Biol.* 14, 2025–2032. doi:10.1016/j.
- Shigeoka, T., Lu, B., and Holt, C. E. (2013). RNA-based mechanisms underlying axon guidance. *J. Cell Biol.* 202, 991–999. doi:10.1083/jcb.201305139.
- Shimojo, H., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2008). Oscillations in Notch Signaling Regulate Maintenance of Neural Progenitors. *Neuron* 58, 52–64. doi:10.1016/j.neuron.2008.02.014.
- Shimojo, H., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2011). Dynamic expression of notch signaling genes in neural stem/progenitor cells. *Front. Neurosci.* 5, 78. doi:10.3389/fnins.2011.00078.
- Shiota, C., Woo, J. T., Lindner, J., Shelton, K. D., and Magnuson, M. a. (2006). Multiallelic Disruption of the rictor Gene in Mice Reveals that mTOR Complex 2 Is Essential for Fetal Growth and Viability. *Dev. Cell* 11, 583–589. doi:10.1016/j.devcel.2006.08.013.

- Shitamukai, a., Konno, D., and Matsuzaki, F. (2011). Oblique Radial Glial Divisions in the Developing Mouse Neocortex Induce Self-Renewing Progenitors outside the Germinal Zone That Resemble Primate Outer Subventricular Zone Progenitors. *J. Neurosci.* 31, 3683–3695. doi:10.1523/JNEUROSCI.4773-10.2011.
- Shmueli, a, Segal, M., Sapir, T., Tsutsumi, R., Noritake, J., Bar, a, et al. (2010). Ndel1 palmitoylation: a new mean to regulate cytoplasmic dynein activity. *Embo J* 29, 107–119. doi:10.1038/emboj.2009.325.
- Shou, J., Rim, P. C., and Calof, a L. (1999). BMPs inhibit neurogenesis by a mechanism involving degradation of a transcription factor. *Nat. Neurosci.* 2, 339–45. doi:10.1038/7251.
- Shtiegman, K., and Yarden, Y. (2003). The role of ubiquitylation in signaling by growth factors: Implications to cancer. *Semin. Cancer Biol.* 13, 29–40. doi:10.1016/S1044-579X(02)00097-4.
- Siergiejuk, E., Scott, D. C., Schulman, B. A., Hofmann, K., Kurz, T., and Peter, M. (2009). Cullin neddylation and substrate-adaptors counteract SCF inhibition by the CAND1-like protein Lag2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 28, 3845–56. doi:10.1038/emboj.2009.354.
- Simó, S., and Cooper, J. a. (2013). Rbx2 Regulates Neuronal Migration through Different Cullin 5-RING Ligase Adaptors. *Dev. Cell* 27, 399–411. doi:10.1016/j.devcel.2013.09.022.
- Simo, S., Jossin, Y., and Cooper, J. A. (2010). Cullin 5 regulates cortical layering by modulating the speed and duration of Dab1-dependent neuronal migration. 30, 5668–5676. doi:10.1016/j.pestbp.2011.02.012. Investigations.
- Smart, I. H. (1973). Proliferative characteristics of the ependymal layer during the early development of the mouse neocortex: a pilot study based on recording the number, location and plane of cleavage of mitotic figures. *J. Anat.* 116, 67–91.
- Sobieszczuk, D. F., Poliakov, A., Xu, Q., and Wilkinson, D. G. (2010). A feedback loop mediated by degradation of an inhibitor is required to initiate neuronal differentiation. *Genes Dev.* 24, 206–218. doi:10.1101/gad.554510.
- Sontag, J.-M., and Sontag, E. (2014). Protein phosphatase 2A dysfunction in Alzheimer's disease. *Front. Mol. Neurosci.* 7, 1–10. doi:10.3389/fnmol.2014.00016.
- Sorkin, A., and Goh, L. K. (2008). Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp Cell Res* 314, 3093–3106. doi:10.1016/j.yexcr.2008.07.029. Endocytosis.
- Sperber, B. R., Leight, S., Goedert, M., and Lee, V. M. Y. (1995). Glycogen synthase kinase-3 β phosphorylates tau protein at multiple sites in intact cells. *Neurosci. Lett.* 197, 149–153.
- Sriram, S. M., Kim, B. Y., and Kwon, Y. T. (2011). The N-end rule pathway: emerging functions and molecular principles of substrate recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 735–747. doi:10.1038/nrm3217.
- Staropoli, J. F., McDermott, C., Martinat, C., Schulman, B., Demireva, E., and Abeliovich, A. (2003). Parkin Is a Component of an SCF-like Ubiquitin Ligase Complex and Protects Postmitotic Neurons from Kainate Excitotoxicity. *Neuron* 37, 735–749. doi:10.1016/S0896-6273(03)00084-9.
- Stegeman, S., Jolly, L. a., Premarathne, S., Gecz, J., Richards, L. J., Mackay-Sim, A., et al. (2013). Loss of Usp9x Disrupts Cortical Architecture, Hippocampal Development and TGF β -Mediated Axonogenesis. *PLoS One* 8, 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0068287.
- Stinchfield, M. J., Takaesu, N. T., Quijano, J. C., Castillo, A. M., Tiusanen, N., Shimmi, O., et al. (2012). Fat facets deubiquitylation of Medea/Smad4 modulates interpretation of a Dpp morphogen gradient. *Development* 139, 2721–2729. doi:10.1242/dev.077206.
- Stipursky, J., Francis, D., Dezone, R. S., Bérnago de Araújo, A. P., Souza, L., Moraes, C. a, et al. (2014). TGF- β 1 promotes cerebral cortex radial glia-astrocyte differentiation in vivo. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 393. doi:10.3389/fncel.2014.00393.
- Striano, P., and Zara, F. (2012). Genetics: Mutations in mTOR pathway linked to megalencephaly syndromes. *Nat. Rev. Neurol.* 8, 542–544. doi:10.1038/nrneurol.2012.178.
- Sun, J., Liu, Y., Moreno, S., Baudry, M., and Bi, X. (2015). Imbalanced Mechanistic Target of Rapamycin C1 and C2 Activity in the Cerebellum of Angelman Syndrome Mice Impairs Motor Function. *J. Neurosci.* 35, 4706–4718. doi:10.1523/JNEUROSCI.4276-14.2015.
- Suter, D. M., and Miller, K. E. (2011). The Emerging Role of Forces in Axonal Elongation Daniel. 94, 91–101. doi:10.1002/ana.22528. Toll-like.
- Swatek, K. N., and Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. *Cell Res.* 26, 399–422. doi:10.1038/cr.2016.39.
- Szaro, B. G., Grant, P., Lee, V. M. -, and Gainer, H. (1991). Inhibition of axonal development after

- injection of neurofilament antibodies into a *Xenopus laevis* embryo. *J. Comp. Neurol.* 308, 576–585. doi:10.1002/cne.903080406.
- Tai, H. C., and Schuman, E. M. (2010). Angelman Syndrome: Finding the Lost Arc. *Cell* 140, 608–610. doi:10.1016/j.cell.2010.02.019.
- Tarpey, P. S., Raymond, F. LucyTarpey, P. S., Raymond, F. L., O’Meara, S., Edkins, S., Teague, J., Butler, A., ... Partington, M. (2007). Mutations in CUL4B, which encodes a ubiquitin E3 ligase subunit, cause an X-linked mental retardation syndrome associated with aggressive outbursts, seizures, relative macrocephaly, central obesity, hypogonadism, pes cavus, and tremor. *Am. J. Hum. Genet.* 80, 345–52. <http://doi.org/10.1086/511134>, O’Meara, S., Edkins, S., Teague, J., Butler, A., et al. (2007). Mutations in CUL4B, which encodes a ubiquitin E3 ligase subunit, cause an X-linked mental retardation syndrome associated with aggressive outbursts, seizures, relative macrocephaly, central obesity, hypogonadism, pes cavus, and tremor. *Am. J. Hum. Genet.* 80, 345–52. doi:10.1086/511134.
- Taya, S., Yamamoto, T., Kanai-Azuma, M., Wood, S. a, and Kaibuchi, K. (1999). The deubiquitinating enzyme Fam interacts with and stabilizes beta-catenin. *Genes Cells* 4, 757–767. doi:10.1046/j.1365-2443.1999.00297.x.
- Tessier-Lavigne, M., and Goodman, C. S. (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* (80-). 274.
- Tessier-Lavigne, M., Placzek, M., Lumsden, A. G. S., Dodd, J., and Jessell, T. M. (1988). Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system. *Nature* 336, 775–778. doi:10.1038/336775a0.
- Thomanetz, V., Angliker, N., Cloëtta, D., Lustenberger, R. M., Schweighauser, M., Oliveri, F., et al. (2013). Ablation of the mTORC2 component rictor in brain or Purkinje cells affects size and neuron morphology. *J. Cell Biol.* 201, 293–308. doi:10.1083/jcb.201205030.
- Thornton, G. K., and Woods, C. G. (2009). Primary microcephaly: do all roads lead to Rome? *Trends Genet.* 25, 501–510. doi:10.1016/j.tig.2009.09.011.
- Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C. M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 19, 94–102. doi:10.1093/emboj/19.1.94.
- Tietjen, I., Erdogan, F., Currier, S., Apse, K., Chang, B. S., Hill, R. S., et al. (2005). EMX2-independent familial schizencephaly: Clinical and genetic analyses. *Am. J. Med. Genet.* 135 A, 166–170. doi:10.1002/ajmg.a.30734.
- Tissir, F., and Goffinet, A. M. (2003). Reelin and brain development. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 496–505. doi:10.1038/nrn1113.
- Todi, S. V., and Paulson, H. L. (2011). Balancing act: Deubiquitinating enzymes in the nervous system. *Trends Neurosci.* 34, 370–382. doi:10.1016/j.tins.2011.05.004.
- Tonazzini, I., Meucci, S., Van Woerden, G. M., Elgersma, Y., and Cecchini, M. (2016). Impaired Neurite Contact Guidance in Ubiquitin Ligase E3a (Ube3a)-Deficient Hippocampal Neurons on Nanostructured Substrates. *Adv. Healthc. Mater.* 5, 850–862. doi:10.1002/adhm.201500815.
- Torrino, S., Visvikis, O., Doye, A., Boyer, L., Stefani, C., Munro, P., et al. (2011). The E3 ubiquitin-ligase HACE1 catalyzes the ubiquitylation of active Rac1. *Dev. Cell* 21, 959–965. doi:10.1016/j.devcel.2011.08.015.
- Trockenbacher, A., Suckow, V., Foerster, J., Winter, J., Krauß, S., Schneider, R., et al. (2001). MID1 , mutated in Opitz syndrome , encodes an ubiquitin ligase that targets phosphatase 2A for degradation. *Nat. Genet.* 29, 287–294. doi:10.1038/ng762.
- Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., Stockinger, W., Nimpf, J., et al. (1999). Reeler/disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* 97, 689–701. doi:10.1016/S0092-8674(00)80782-5.
- Trousse, F., Martí, E., Gruss, P., Torres, M., and Bovolenta, P. (2001). Control of retinal ganglion cell axon growth: a new role for Sonic hedgehog. 128, 3927–3936.
- Tsai, J. W., Chen, Y., Kriegstein, A. R., and Vallee, R. B. (2005). LIS1 RNA interference blocks neural stem cell division, morphogenesis, and motility at multiple stages. *J. Cell Biol.* 170, 935–945. doi:10.1083/jcb.200505166.
- Tsai, L. H., and Gleeson, J. G. (2005). Nucleokinesis in neuronal migration. *Neuron* 46, 383–388. doi:10.1016/j.neuron.2005.04.013.
- Tuoc, T. C., and Stoykova, A. (2008). Trim11 modulates the function of neurogenic transcription factor Pax6 through ubiquitin-proteasome system. *Genes Dev.* 22, 1972–86. doi:10.1101/gad.471708.
- Vallee, R. B., Seale, G. E., and Tsai, J. W. (2009). Emerging roles for myosin II and cytoplasmic dynein in

- migrating neurons and growth cones. *Trends Cell Biol.* 19, 347–355. doi:10.1016/j.tcb.2009.03.009.
- Van Vactor, D., and Flanagan, J. G. (1999). The middle and the end: Slit brings guidance and branching together in axon pathway selection. *Neuron* 22, 649–652. doi:10.1016/S0896-6273(00)80723-0.
- Vandewalle, J., Langen, M., Zschätzsch, M., Zschaetzsch, M., Nijhof, B., Kramer, J. M., et al. (2013). Ubiquitin ligase HUWE1 regulates axon branching through the Wnt/ β -catenin pathway in a Drosophila model for intellectual disability. *PLoS One* 8, e81791. doi:10.1371/journal.pone.0081791.
- Viti, J., Gulacsi, A., and Lillien, L. (2003). Wnt regulation of progenitor maturation in the cortex depends on Shh or fibroblast growth factor 2. *J. Neurosci.* 23, 5919–5927. doi:23/13/5919 [pii].
- Vulto-van Silfhout, A. T., Nakagawa, T., Bahi-Buisson, N., Haas, S. a., Hu, H., Bienek, M., et al. (2015). Variants in CUL4B are associated with cerebral malformations. *Hum. Mutat.* 36, 106–117. doi:10.1002/humu.22718.
- Wan, L., Zou, W., Gao, D., Inuzuka, H., Fukushima, H., Berg, A. H., et al. (2011). Cdh1 Regulates Osteoblast Function Through an APC/C- Independent Modulation of Smurf1. *PLoS One* 4, 721–733. doi:10.1126/scitranslmed.3008882.
- Wang, H.-L., Chang, N.-C., Weng, Y.-H., and Yeh, T.-H. (2013). XLID CUL4B mutants are defective in promoting TSC2 degradation and positively regulating mTOR signaling in neocortical neurons. *BBA - Mol. Basis Dis.* 1832, 585–593. doi:10.1016/j.bbadis.2013.01.010.
- Wang, H.-R., Zhang, Y., Ozdamar, B., Ogunjimi, A. a., Alexandrova, E., Thomsen, G. H., et al. (2003). Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science* 302, 1775–1779. doi:10.1126/science.1090772.
- Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R. S., et al. (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 431, 862–868. doi:10.1038/nature02926.
- Wang, W. (2004). Drosophila Epsin mediates a select endocytic pathway that DSL ligands must enter to activate Notch. *Development* 131, 5367–5380. doi:10.1242/dev.01413.
- Wang, X., Trotman, L. C., Koppie, T., Alimonti, A., Chen, Z., Gao, Z., et al. (2007). NEDD4-1 Is a Proto-Oncogenic Ubiquitin Ligase for PTEN. *Cell* 128, 129–139. doi:10.1016/j.cell.2006.11.039.
- Wang, Z., Dang, T., Liu, T., Chen, S., Li, L., Huang, S., et al. (2016). NEDD4L protein catalyzes ubiquitination of PIK3CA protein and regulates PI3K-AKT signaling. *J. Biol. Chem.* 291, 17467–17477. doi:10.1074/jbc.M116.726083.
- Weeber, E. J., Jiang, Y.-H., Elgersma, Y., Varga, A. W., Carrasquillo, Y., Brown, S. E., et al. (2003). Derangements of hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in a mouse model for Angelman mental retardation syndrome. *J. Neurosci.* 23, 2634–2644. doi:23/7/2634 [pii].
- Wei, W., Li, M., Wang, J., Nie, F., and Li, L. (2012). The E3 Ubiquitin Ligase ITCH Negatively Regulates Canonical Wnt Signaling by Targeting Dishevelled Protein. *Mol. Cell. Biol.* 32, 3903–3912. doi:10.1128/MCB.00251-12.
- Westbrook, T. F., Hu, G., Ang, X. L., Mulligan, P., Natalya, N., Liang, A., et al. (2008). SCF β TRCP Controls Oncogenic Transformation and Neural Differentiation Through REST Degradation. *PLoS One* 3, 370–374. doi:10.1038/nature06780.
- Wiesner, S., Ogunjimi, A. a., Wang, H. R., Rotin, D., Sicheri, F., Wrana, J. L., et al. (2007). Autoinhibition of the HECT-Type Ubiquitin Ligase Smurf2 through Its C2 Domain. *Cell* 130, 651–662. doi:10.1016/j.cell.2007.06.050.
- Wilkin, M. B., Carbery, A.-M., Fostier, M., Aslam, H., Mazaleyrat, S. L., Higgs, J., et al. (2004). Regulation of Notch Endosomal Sorting and Signaling by Drosophila Nedd4 Family Proteins. *Curr. Biol.* 14, 2237–2264. doi:10.1016/j.
- Wilsch-Brauninger, M., Peters, J., Paridaen, J. T. M. L., and Huttner, W. B. (2012). Basolateral rather than apical primary cilia on neuroepithelial cells committed to delamination. *Development* 139, 95–105. doi:10.1242/dev.069294.
- Windheim, M., Pegg, M., and Cohen, P. (2008). Two different classes of E2 ubiquitin-conjugating enzymes are required for the mono-ubiquitination of proteins and elongation by polyubiquitin chains with a specific topology. *Biochem. J.* 409, 723–9. doi:10.1042/BJ20071338.
- Woelk, T., Oldrini, B., Maspero, E., Confalonieri, S., Cavallaro, E., Di Fiore, P. P., et al. (2006). Molecular mechanisms of coupled monoubiquitination. *Nat. Cell Biol.* 8, 1246–1254. doi:10.1038/ncb1484.

- Wonders, C. P., and Anderson, S. a. (2006). The origin and specification of cortical interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 687–696. doi:10.1038/nrn1954.
- Wu, G., Lyapina, S., Das, I., Li, J., Gurney, M., Pauley, A., et al. (2001). SEL-10 is an inhibitor of notch signaling that targets notch for ubiquitin-mediated protein degradation. *Mol Cell Biol* 21, 7403–7415. doi:10.1128/MCB.21.21.7403-7415.2001.
- Wu, H., Coskun, V., Tao, J., Xie, W., Ge, W., Yoshikawa, K., et al. (2010). Dnmt3a-Dependent Nonpromoter DNA Methylation Facilitates Transcription of Neurogenic Genes. *Science* (80-.). 329, 444–448. doi:10.1126/science.1190485.
- Yamada, K., Fuwa, T. J., Ayukawa, T., Tanaka, T., Nakamura, A., Wilkin, M. B., et al. (2011). Roles of Drosophila Deltex in Notch receptor endocytic trafficking and activation. *Genes to Cells* 16, 261–272. doi:10.1111/j.1365-2443.2011.01488.x.
- Ye, Y., and Rape, M. (2009). Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 755–764. doi:10.1038/nrm2780.
- Yeh, E., Dermer, M., Commisso, C., Zhou, L., McGlade, C. J., and Boulianne, G. L. (2001). Neuralized functions as an E3 ubiquitin ligase during Drosophila development. *Curr. Biol.* 11, 1675–1679. doi:10.1016/S0960-9822(01)00527-9.
- Yoon, K.-J., Koo, B.-K., Im, S.-K., Jeong, H.-W., Ghim, J., Kwon, M., et al. (2008). Mind Bomb 1-Expressing Intermediate Progenitors Generate Notch Signaling to Maintain Radial Glial Cells. *Neuron* 58, 519–531. doi:10.1016/j.neuron.2008.03.018.
- Youn, Y. H., Pramparo, T., Hirotsune, S., and Wynshaw-Boris, a. (2009). Distinct Dose-Dependent Cortical Neuronal Migration and Neurite Extension Defects in Lis1 and Ndel1 Mutant Mice. *J. Neurosci.* 29, 15520–15530. doi:10.1523/JNEUROSCI.4630-09.2009.
- Yu, T. W., Mochida, G. H., Tischfield, D. J., Sgaiier, S. K., Flores-Sarnat, L., Sergi, C. M., et al. (2010). Mutations in WDR62, encoding a centrosome-associated protein, cause microcephaly with simplified gyri and abnormal cortical architecture. *Nat. Genet.* 42, 1015–1020. doi:10.1038/ng.683.
- Yuasa-Kawada, J., Kinoshita-Kawada, M., Wu, G., Rao, Y., and Wu, J. Y. (2009). Midline crossing and Slit responsiveness of commissural axons require USP33. *Nat. Neurosci.* 12, 1087–1089. doi:10.1038/nn.2382.
- Zenker, M., Mayerle, J., Lerch, M. M., Tagariello, A., Zerres, K., Durie, P. R., et al. (2005). Deficiency of UBR1, a ubiquitin ligase of the N-end rule pathway, causes pancreatic dysfunction, malformations and mental retardation (Johanson-Blizzard syndrome). *Nat. Genet.* 37, 1345–1350. doi:10.1038/ng1681.
- Zhadanov, A. B., Provance, D. W., Speer, C. a., Coffin, J. D., Goss, D., Blixt, J. a., et al. (1999). Absence of the tight junctional protein AF-6 disrupts epithelial cell-cell junctions and cell polarity during mouse development. *Curr. Biol.* 9, 880–888. doi:10.1016/S0960-9822(99)80392-3.
- Zhang, J., Gambin, T., Yuan, B., Szafranski, P., Rosenfeld, J. a., Balwi, M. Al, et al. (2017). Haploinsufficiency of the E3 ubiquitin-protein ligase gene TRIP12 causes intellectual disability with or without autism spectrum disorders, speech delay, and dysmorphic features. *Hum. Genet.* 136, 377–386. doi:10.1007/s00439-017-1763-1.
- Zhang, J., Liu, M., Su, Y., Du, J., and Zhu, A. J. (2012). A Targeted *In Vivo* RNAi Screen Reveals Deubiquitinases as New Regulators of Notch Signaling. *G3: Genes/Genomes/Genetics* 2, 1563–1575. doi:10.1534/g3.112.003780.
- Zhang, J., Shemezis, J. R., McQuinn, E. R., Wang, J., Sverdlov, M., and Chenn, A. (2013). AKT activation by N-cadherin regulates beta-catenin signaling and neuronal differentiation during cortical development. *Neural Dev.* 8, 7. doi:10.1186/1749-8104-8-7.
- Zhao, X., D’Arca, D., Lim, W. K., Brahmachary, M., Carro, M. S., Ludwig, T., et al. (2009). The N-Myc-DLL3 Cascade Is Suppressed by the Ubiquitin Ligase Huwe1 to Inhibit Proliferation and Promote Neurogenesis in the Developing Brain. *Dev. Cell* 17, 210–221. doi:10.1016/j.devcel.2009.07.009.
- Zhao, X., Heng, J. I.-T., Guardavaccaro, D., Jiang, R., Pagano, M., Guillemot, F., et al. (2008). The HECT-domain ubiquitin ligase Huwe1 controls neural differentiation and proliferation by destabilizing the N-Myc oncoprotein. *Nat. Cell Biol.* 10, 643–653. doi:10.1038/ncb1727.
- Zhou, F. Q., Zhou, J., Dedhar, S., Wu, Y. H., and Snider, W. D. (2004). NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3 β and functions of the microtubule plus end binding protein APC. *Neuron* 42, 897–912. doi:10.1016/j.neuron.2004.05.011.
- Zhou, J., and Parada, L. F. (2012). PTEN signaling in autism spectrum disorders. *Curr. Opin. Neurobiol.*

- 22, 873–879. doi:10.1016/j.conb.2012.05.004.
- Zhou, W., Xu, J., Zhao, Y., and Sun, Y. (2014). SAG/RBX2 is a novel substrate of NEDD4-1 E3 ubiquitin ligase and mediates NEDD4-1 induced chemosensitization. *Oncotarget* 5, 6746–55. doi:10.18632/oncotarget.2246.
- Zhu, Q., and Wani, A. A. (2010). Histone Modifications: Crucial Elements for Damage Response and Chromatin Restoration. *J Cell Physiol* 223, 283–288. doi:10.1002/jcp.22060.
- Zou, Y., Liu, Q., Chen, B., Zhang, X., Guo, C., Zhou, H., et al. (2007). Mutation in CUL4B, which encodes a member of cullin-RING ubiquitin ligase complex, causes X-linked mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* 80, 561–6. doi:10.1086/512489.

Compréhension des mécanismes physiopathologiques des hétérotopies nodulaires périventriculaires associées à des mutations dans le gène *NEDD4L*

Résumé

Les hétérotopies nodulaires périventriculaires (HNP) sont des malformations du cortex cérébral caractérisées par la formation d'amas de neurones dans des parties inappropriées du cerveau. Elles peuvent être responsables d'une multitude de troubles tels qu'une hypotonie, un déficit intellectuel ou des épilepsies. Notre équipe a montré que le gène *NEDD4L* codant pour une E3 ubiquitine ligase était responsable d'HNP associées à des syndactylies. Des études cellulaires et une approche *in utero* nous ont permis de montrer une instabilité de la protéine mutante et des problèmes lors de la neurogénèse, le positionnement neuronal et la translocation terminale. Des études plus approfondies mettent en lumière le rôle critique de NEDD4L dans différentes voies de signalisation. En effet, alors que l'excès de protéine NEDD4L WT conduit à une dérégulation de DAB1 et de la voie mTORC1, l'instabilité des protéines mutantes conduit à une dérégulation des voies mTORC1 et AKT. L'ensemble de ces données permet de mieux comprendre le rôle critique de NEDD4L dans la régulation des voies mTOR et sa contribution dans le développement cortical.

Summary

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