



Embryogenèse de la moelle épinière : de la dynamique collective observable à une proposition de modèle comportemental à l'échelle cellulaire

Manon Azaïs

► To cite this version:

Manon Azaïs. Embryogenèse de la moelle épinière : de la dynamique collective observable à une proposition de modèle comportemental à l'échelle cellulaire. Embryologie et organogenèse. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2018. Français. NNT : 2018TOU30283 . tel-02417559

HAL Id: tel-02417559

<https://theses.hal.science/tel-02417559>

Submitted on 18 Dec 2019

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

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

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par

Manon AZAÏS

Le 10 Décembre 2019

Embryogenèse de la moelle épinière : de la dynamique collective observable à une proposition de modèle comportemental à l'échelle cellulaire

École doctorale et discipline ou spécialité
ED SEVAB : Écologie, biodiversité et évolution

Unité de recherche
Centre de Recherches sur la Cognition Animale

Directrice(s) ou Directeur(s) de Thèse
Jacques Gautrais

Jury

François-Xavier DECHAUME-MONTCHARMONT, MdC U. Bourgogne (rapporteur)

Stéphane DOUADY, DR, MSC, Paris (rapporteur)

Jacques GAUTRAIS, CR, CRCA, Toulouse (directeur)

Xavier MORIN, DR, IBENS, Paris (rapporteur)

Fabienne PITUELLO, DR, CBD, Toulouse (invitée)

Catherine SOULA, PU, CBD, Toulouse (présidente)

Résumé

Nous proposons un modèle de l'embryogenèse de la moelle épinière considérée comme un système dynamique constitué d'unités comportementales (les cellules).

Pour que cet organe soit fonctionnel, il faut que les neurones des différents types soient mis en place au cours de l'embryogenèse, avec le bon nombre de neurones du bon type au bon endroit. Cette mise en place résulte d'un processus dynamique au cours duquel les progéniteurs neuronaux prolifèrent dans les proportions adéquates avant de se différencier en neurones spécialisés.

Les données expérimentales disponibles donnent l'évolution des populations de progéniteurs et de neurones, et la balance globale entre prolifération et différenciation.

Un premier modèle est énoncé à l'échelle collective pour rendre compte de la dynamique observée sur toute la durée du processus, avec une évolution de la balance prolifération / différenciation ajustée sur les données expérimentales.

Un second modèle introduit une différenciation comportementale des progéniteurs sous la forme d'une perte de leur capacité proliférative.

Ce changement comportemental, de type tout-ou-rien à l'échelle cellulaire, se traduit à l'échelle collective par une transition continue de la balance prolifération / différenciation telle qu'observée expérimentalement.

Enfin, nous explorons un raffinement de ce modèle où ce changement comportemental est gouverné par l'état du système (rétro-contrôle).

Nous examinons les différentes possibilités de rétro-contrôles et nous retenons celle qui rend le mieux compte de la dynamique collective observée.

En perspective, nous proposons des pistes pour intégrer la dimension spatiale du phénomène, et pour la prolongation de ce travail vers la modélisation du développement du cortex cérébral.

Mots clefs : Embryogenèse, prolifération, différenciation, moelle épinière, dynamique, modèle.

Abstract

Developing spinal cord: from observable collective dynamics to a behavioral model at cell scale

We consider the developing spinal cord as a dynamical system made of behavioral units (cells).

For the adult spinal cord to be functional, different neurons must be of the right kind at the right place. They are issued from a dynamical process of proliferative and differentiating neural progenitors, with a fine control of the balance between proliferation and differentiation.

Some experimental data are available for the evolution of progenitors and neurons population and for how the balance progresses with time.

Based on these data, we propose a first model at the collective scale to account for these dynamics all along the process. A second model is proposed at the cell scale which includes a loss of proliferative capacity that progressively concerns more and more progenitors. This behavioural switch at cell scale is reflected by a continuous progression of the balance proliferation / differentiation at population scale, as it is experimentally observed.

Finally, we introduce a feedback control process so that this progression is under the control of the progenitors and neurons populations. Among the multiple possibilities for this feedback, we point out to the most relevant process.

We discuss these findings, and how they can be extended to spatialized dynamics and neocortex development.

Keywords : Embryogenesis, proliferation, differentiation, spinal cord, dynamics, model.

Manon AZAÏS

**Embryogenèse de la moelle épinière : de la dynamique collective observable
à une proposition de modèle comportemental à l'échelle cellulaire**

2018

Table des matières

1	Présentation	17
1.1	Projet scientifique	17
1.2	Nos cas d'étude	18
1.2.1	Déplacements collectifs chez les moutons	18
1.2.2	Embryogenèse de la moelle épinière	18
2	Du modèle comportemental individuel à la dynamique collective : la coordination des déplacements chez les moutons	21
2.1	Dispositif expérimental	21
2.2	Modèle à l'échelle individuelle	22
2.2.1	Enonciation du modèle	22
2.3	Passage au modèle en densités	25
2.3.1	Enonciation du modèle	25
2.3.2	Prédictions du modèle en densité	27
2.3.3	Analyse du modèle	29
2.4	Perspectives	29
3	Embryogenèse de la moelle épinière : une approche en dynamique des populations	31
3.1	Présentation du cas d'étude : l'embryogenèse de la moelle épinière de poulet	31
3.1.1	Description du phénomène	32
3.1.2	Acteurs biologiques	32
3.1.3	Acteurs identifiés ayant un effet sur la balance prolifération / différenciation	33
3.1.4	Cycle cellulaire et contrôle de la balance prolifération / différenciation	36
3.1.5	La phosphatase CDC25B	38
3.2	Résumé de la question biologique pour un modélisateur : rôle de la phosphatase CDC25B sur le mode de division	40
3.3	Expériences	40
3.3.1	Principes de la manipulation expérimentale	40
3.3.2	Principe du protocole expérimental	41
3.3.3	Résultats des observations	42
3.4	Modélisation de la dynamique des populations de cellules	44
3.4.1	A l'échelle individuelle	44
3.4.2	Passage en population	45
3.4.3	Modèle avec mode de division asymétrique : le scénario PN	50

3.5	Estimation des paramètres du modèle	51
3.6	Interprétation des données sous l'éclairage du modèle	51
3.6.1	Progéniteurs hétérogènes avec durées de cycle spécifiques au mode de division	51
3.6.2	Evolution des densités vs. évolution des fractions	52
3.6.3	Sensibilité sur les prédictions	53
3.7	Conclusions	54
4	Proposition 1 : Restriction des modes de division	57
4.1	Extension du modèle PN à l'ensemble du processus	57
4.2	Hypothèse d'une restriction des modes de division	60
4.2.1	Les trois scénarios possibles	60
4.2.2	Le scénario GAN	61
5	Proposition 2 : L'état du système comme stimulus du changement comportemental	65
5.1	Exposé de la démarche dans un système à deux modes de division	66
5.1.1	Formulation par un système sans couplage	67
5.1.2	Introduction d'un couplage	69
5.2	Rétro-contrôles dans le modèle PN	75
5.2.1	Dépendances de $\alpha_{pp}(t)$	77
5.2.2	Dépendances de $\alpha_{nn}(t)$	77
5.2.3	Combinaisons examinées	77
5.2.4	Contrôle de α_{pp} et α_{nn} par N	78
5.2.5	Contrôle de $\alpha_{pp}(t)$ par N et $\alpha_{nn}(t)$ par $P + N$	78
5.2.6	Contrôle de α_{pp} par $P + N$ et α_{nn} par N	78
5.2.7	Contrôle de α_{pp} et de α_{nn} par $P + N$	78
5.3	Rétro-contrôles dans le modèle GAN	80
5.3.1	Dépendances de $\alpha_{ggg}(t)$	83
5.3.2	Dépendances de $\alpha_{ann}(t)$	83
5.3.3	Examen des prédictions des rétro-contrôles	84
5.3.4	Sensibilité aux conditions initiales	88
5.4	Rétro-contrôle et CDC25B	90
5.4.1	Gains de fonction dans le système PN	90
5.4.2	Gains de fonction dans le système GAN	94
6	Conclusions et perspectives	99
6.1	Déplacements collectifs : utilité de la modélisation	99
6.2	Propositions pour l'embryogenèse de la moelle épinière : utilités de la modélisation	100
6.3	Prolongation vers les aspects spatiaux dans la moelle épinière	101
6.4	Prolongation vers les aspects temporels dans le cortex	102
6.5	Résumé de la proposition	103
	Bibliographie	107

7 Articles	113
7.1 Article : Traveling pulse emerges from coupled intermittent walks : a case study in sheep, Azaïs et al. <i>PLoS ONE</i> 2018.	114
7.2 Article : Neurogenic decisions require a cell cycle independant function of the CDC25B phosphatase, Bonnet et al. <i>Elife</i> 2018.	150
7.3 Article : Timing the spinal cord development with neural progenitor cells losing their proliferative capacity : a theoretical analysis, Azaïs et al. , en révision à <i>Neural Dev.</i> 2019.	200

Table des figures

2.1	Exemple d'un déplacement collectif entre deux phases de broût	23
2.2	Effets de stimulation / inhibition sur le changement d'état.	25
2.3	Comparaison données / prédictions du modèle.	26
2.4	Résolution numérique du système 2.5.	28
3.1	Organisation spatiale de la moelle épinière.	33
3.2	Mise en place du pattern des progéniteurs dans la région ventrale de la moelle épinière, et expressions génétiques associées aux différents types neuronaux (source [16])	33
3.3	Action intra-cellulaire du signal Shh.	35
3.4	Interaction entre les différentes voies de signalisation (image issue de [13])	36
3.5	Le cycle cellulaire	37
3.6	Voies de régulation des CDC25.	39
3.7	Résumé des données et des prédictions.	43
3.8	Générations produites par une population de progéniteurs	47
3.9	Sensibilité de la fraction de neurones prédite à 48h en fonction de γ et η	54
4.1	Modèles PN et GAN	59
4.2	Modèle GAN et expériences de gains de fonction	63
5.1	Estimation de la <i>quitting fraction</i> $\hat{q}(t)$ reconstruite en fonction du temps	67
5.2	Evolution de l'indice de différenciation, évolution des deux populations dans le modèle à deux MoD	68
5.3	Régulation de ϕ par P	70
5.4	Régulation de ϕ par N	72
5.5	Régulation de ϕ par $P + N$	74
5.6	Evolution de $\alpha_{pp}, \alpha_{pn}, \alpha_{nn}$ en fonction des variables d'état $P(t)$ et $N(t)$	76
5.7	Evolution des progéniteurs et des neurones en fonction du couplage introduit dans le système PN	79
5.8	Rétro-contrôles possibles pour l'évolution de α_{GGG} dans le cas du scénario GAN	81
5.9	Rétro-contrôles possibles pour l'évolution de α_{ANN} dans le cas du scénario GAN	82
5.10	Modèle GAN avec rétro-contrôle par G+N.	85
5.11	Modèle GAN avec rétro-contrôle par A+N.	86
5.12	Modèle GAN avec rétro-contrôle par G+A+N.	87
5.13	Trajectoires dans l'espace P, N pour différentes conditions initiales	89
5.14	Couplages en présence du Gain de Fonction en CDC25B dans le système PN	91

5.15	Couplages en présence du GoF en CDC25B- Δ CDK dans le système PN	92
5.16	Effet d'un gain de fonction et d'une suppression de l'interaction entre CDK et sa cycline dans le système PN	93
5.17	Effet d'un GOF en CDC25B sur le système GAN	95
5.18	Effet d'un GoF en CDC25B- Δ CDK sur le système GAN	96
6.1	Représentation très simplifiée de la morphogenèse du cortex.	102
6.2	Résumé de la proposition de modèle pour la dynamique de l'embryogenèse de la partie ventrale de la moelle épinière.	103

Remerciements

Avant de commencer mon manuscrit, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont permis le bon déroulement de cette thèse.

La première personne à qui je pense est évidemment mon directeur de thèse, Jacques Gautrais, avec qui une belle collaboration a commencé durant mon stage de M2. Je vous remercie de m'avoir fait confiance durant mon stage et d'avoir accepté de continuer cette aventure par trois merveilleuses années de thèse. Nos nombreuses "déambulations dialogiques" vont me manquer. C'est donc avec beaucoup de respect que je vous remercie pour toutes ces années de partage scientifique.

Je remercie évidemment Eric Agius et Fabienne Pituello du CBD pour cette collaboration très fructueuse. Je vous remercie aussi pour nos discussions toujours très enrichissantes. Une pensée particulière va à Eric qui a su faire preuve de patience face à mes questions répétées et qui m'a permise de me former en embryologie. Merci à eux deux.

Je ne peux que témoigner ma reconnaissance infinie à Stéphane Blanco et Richard Fournier et tout d'abord pour m'avoir accueillie dans *notre couloir* où le partage de connaissances a été pour moi une bouffée d'oxygène. Je remercie Richard pour nos nombreuses discussions bienveillantes à questionner le questionnement :) Je remercie aussi Stéphane pour ses entrées fulgurantes dans le bureau me laissant de quoi réfléchir/travailler pendant de longues semaines. Je te remercie également pour ton apport scientifique dans ma thèse qui n'aurait pas eu cette dimension si tu n'avais pas consacré autant de temps à me former à la physique statistiques (notamment pour les longues séances au tableau passées à l'inversion des paramètres).

Je remercie mes rapporteurs : François-Xavier Dechaume-Montcharmont, Stéphane Douady et Xavier Morin pour avoir accepté de relire ma thèse mais surtout pour avoir donné leur avis scientifique, précieux à mes yeux. Je vous remercie également pour les discussions intéressantes que nous avons pu avoir au cours de la soutenance. Je remercie également Cathy Soula d'avoir accepté de présider mon jury de thèse et de l'avoir fait avec tant de bienveillance et Fabienne d'avoir accepté de venir en tant qu'invitée.

Je tient aussi à remercier Leah Edelstein-Keshet qui a accepté de me recevoir pendant trois mois dans son laboratoire à Vancouver. Je vous remercie pour tous les éclaircissements mathématiques que vous m'avez apportés.

Une pensée particulière va aux *espions* : Lionel Pelissier pour nos discussions sur "mon positionnement" qui m'ont été d'une grande aide à un moment de la thèse où les choses étaient un peu floues

pour moi ; Alain Rabier pour nos footings annuels à Roffiac et tous tes conseils ; et Marie-Hélène Lecureux pour nos discussions sur la didactique. Ce fut un réel plaisir de faire votre rencontre.

Je remercie aussi tous les doctorants du CRCA, notamment pour nos parties de foot et de volley! Alexis, Natacha, Paul, Violette, Amélie, Aurélie, Matthias, Valentin, Manon... en espérant n'oublier personne ! Je remercie toutes les personnes de *notre couloir* qui m'ont permis de me sentir un peu "comme à la maison" : les *stars*, Pascal et Marc, Sébastien, Jacques. Egalement tous les doctorants qui ont envahi *notre couloir* petit à petit, merci pour nos parties de cartes et pour votre joie de vivre : Marie, Paule, Léa, Jérémie, Lloris et bien sûr caliméro — n'oubliez pas de perpétuer la tradition de *l'Excellence* ;)

J'adresserai mon dernier remerciement à la personne qui m'a le plus soutenue et qui n'a pu résister à venir s'installer lui aussi dans cet environnement précieux qu'est *notre couloir*, ma biche.

J'ai envie de conclure ces remerciements par une pensée spéciale à celui qui a été sans nul doute mon plus précieux allié et autour duquel nous avons pu échanger, partager et sans qui ma thèse n'aurait pu aussi bien se dérouler : le tableau noir.

Chapitre 1

Présentation

1.1 Projet scientifique

Mon travail de thèse, dirigé par Jacques Gautrais, s'est déroulé au croisement de trois laboratoires de l'Université Toulouse III, où travaillent les cinq chercheurs qui ont encadré des parties de mon travail : le Centre de Recherches sur la Cognition Animale (CRCA, Jacques Gautrais), le Laboratoire Plasma et Conversion d'Energie (LaPlaCE, Richard Fournier et Stéphane Blanco) et le Centre de Biologie du Développement (CBD, Fabienne Pituello et Eric Agius).

La question scientifique centrale qui anime les travaux de J. Gautrais est de faire le lien entre différentes échelles de description d'un même phénomène. Ses travaux ont porté ces dernières années sur l'émergence de phénomènes collectifs dans les sociétés animales, telles que la coordination des déplacements dans les bancs de poissons, la construction des nids chez les insectes sociaux ou l'émergence de réseaux chez *Physarum polycephalum*. La perspective est de comprendre comment un modèle comportemental à l'échelle individuelle (et qui comprend donc les interactions avec les autres individus) permet de construire un modèle du phénomène à l'échelle collective. Depuis une dizaine d'années, il est accompagné dans ce travail de modélisation à deux échelles par S. Blanco et R. Fournier, spécialistes en physique statistique et en phénomènes non linéaires, et se situant dans le champ des Sciences pour l'Ingénieur. Cette collaboration s'étend donc à la réflexion sur les méthodes, à la fois de modélisation / formalisation, mais aussi de résolution numérique des modèles.

Mon premier travail de thèse a été de me former aux concepts et aux techniques de ce champ inter-disciplinaire. La question scientifique était de comprendre le déplacement collectif émergent dans des groupes de moutons. Il s'agissait donc d'énoncer un modèle comportemental à l'échelle individuelle et de construire sa traduction en un modèle à l'échelle collective.

La question centrale de ma thèse a émergé d'une collaboration entre J. Gautrais et les embryologistes du CBD, F. Pituello et E. Agius qui travaillent sur l'embryogenèse de la moelle épinière. La question scientifique est de comprendre l'émergence des différents tissus à partir d'une population initiale de cellules-souches indifférenciées. Là encore, il s'agit de faire le lien entre les deux échelles de description : le comportement à l'échelle de la cellule, et le comportement à l'échelle de la population. Cependant, nous n'avons pas un accès expérimental direct au comportement individuel dans ce système, mais seulement à des données relevées à l'échelle de la population. La question a donc été là de proposer des modèles comportementaux individuels en partant du modèle à l'échelle collective.

1.2 Nos cas d'étude

1.2.1 Déplacements collectifs chez les moutons

J'ai débuté ce travail au cours de mon stage final de Master et je l'ai poursuivi la première année de ma thèse.

Je suis partie de données expérimentales collectées par Marie-Hélène Pillot lors de sa thèse, et qu'elle n'avait pas eu le temps d'exploiter. En m'inspirant de ses travaux précédents en modélisation, je propose un modèle comportemental individuel qui rend compte de la façon dont les moutons changent de mode de déplacement (broût très lent vs. marche rapide) en tenant compte de la position et du mode de marche de leurs congénères. Pour ce faire, j'ai commencé par choisir des descripteurs à l'échelle individuelle, et formaliser des mécanismes d'évolution de ces descripteurs par des choix stochastiques (réponse comportementale) fonctions de l'état et de la position des autres individus (stimulus). Les paramètres du modèle ont été estimés à partir des données. Des simulations de ce modèle individu-centré ont permis d'explorer ses prédictions et de le valider.

J'ai ensuite réalisé le travail de formalisation de la traduction de ce modèle individu-centré en un modèle exprimé en densité / densité de flux (c'est-à-dire à l'échelle collective).

La première étape a consisté à traduire le modèle individuel par une équation de type Boltzmann. Dans une seconde étape, j'en ai fait la traduction en variables "macroscopiques" classiques (densité spatiale, densité de flux). Ces traductions ont pu se faire sans approximation (à la limite des grands nombres). Les descripteurs sont donc différents mais le modèle est le même. Nous avons confronté des résolutions numériques du système macroscopique aux simulations individu-centrées pour le vérifier. Le système macroscopique a permis, par ailleurs, de trouver une solution analytique qui décrit ce comportement collectif sous la forme d'une vague solitaire qui se propage à vitesse constante (un "soliton").

Ces travaux sont rapportés dans le chapitre 2 : [Du modèle comportemental individuel à la dynamique collective : la coordination des déplacements chez les moutons](#).

1.2.2 Embryogenèse de la moelle épinière

Notre question générale est ici de comprendre comment le nombre de progéniteurs et de neurones évoluent au cours du temps et quels mécanismes comportementaux à l'échelle de la cellule rendent compte de la population neuronale finale.

Le concept central est la balance entre prolifération et différenciation car c'est elle qui assure la création des neurones en bon nombre et permet la mise en place d'une moelle épinière fonctionnelle.

Il existe de nombreux acteurs moléculaires qui interviennent dans le processus de morphogenèse de la moelle épinière. Nous en traiterons un en particulier : CDC25B, que l'équipe de F. Pituello et E. Agius a mis en évidence comme un acteur dans le contrôle de cette balance prolifération / différenciation.

Dans le chapitre 3 : [Embryogenèse de la moelle épinière : une approche en dynamique des populations](#), nous présenterons l'effet de CDC25B sur le devenir des cellules et nous poserons un modèle à l'échelle de la population pour aider à la compréhension des résultats obtenus. Ce premier modèle est énoncé avec une balance prolifération / différenciation considérée comme constante

sur une période courte, et correspond à des progéniteurs présentant tous le même comportement individuel.

Dans le chapitre 4 : [Proposition 1 : Restriction des modes de division](#), nous reprendrons ce modèle et nous l'étendrons à toute la durée du processus de formation de la moelle épinière (de sa partie ventrale) avec une balance prolifération / différenciation qui évolue au cours du temps. Ce modèle étendu nous permet de reconstruire la dynamique d'évolution des progéniteurs et des neurones au cours du temps.

Nous considérerons alors un second modèle dans lequel le comportement individuel (à l'échelle cellulaire) est raffiné, pour introduire deux populations de progéniteurs ayant des comportements différents en termes de destin cellulaire. Nous montrerons que l'introduction de cette différence comportementale à l'échelle cellulaire permet de comprendre mieux et plus simplement la dynamique à l'échelle de la population.

Enfin, dans le chapitre 5 : [Proposition 2 : L'état du système comme stimulus du changement comportemental](#), nous explorerons la pertinence d'un troisième modèle dans lequel les choix cellulaires individuels ne sont plus pilotés par une évolution de la balance prolifération / différenciation imposée de l'extérieur, mais par un signal qui dépend de l'état du système (rétro-contrôle). Parmi les scénarios possibles, nous retenons l'hypothèse qui nous apparaît comme la plus robuste : que ce signal soit proportionnel à la population totale (comprenant les progéniteurs et les neurones).

Ce travail à l'interface de la physique statistique, de la dynamique des populations et de l'embryologie conclut donc à une proposition de modèle comportemental à l'échelle cellulaire comprenant deux ingrédients essentiels : la possibilité que les progéniteurs changent de comportement au cours du temps, et la possibilité que ce changement comportemental soit induit par un signal qui reflète la taille du système. Cette proposition est résumée à la section [Résumé de la proposition](#).

Nous ouvrons, dans le chapitre 6 : [Conclusions et perspectives](#), quelques pistes pour la prolongation de ces propositions.

Pour permettre un fil de lecture continu, nous avons regroupé en fin de documents les trois articles attachés à cette thèse : [Articles](#).

Chapitre 2

Du modèle comportemental individuel à la dynamique collective : la coordination des déplacements chez les moutons

Le mouton Merinos est une espèce de mouton très grégaire. Pour que cette vie en groupe soit possible, il faut des interactions comportementales qui permettent aux individus de synchroniser leurs activités. Il faut, en particulier, qu'ils restent cohésifs lors de leurs déplacements.

Notre question est ici de proposer un modèle comportemental individuel de ces interactions en déplacement et de le traduire dans un modèle à l'échelle collective.

L'observation expérimentale a porté sur l'évolution libre de petits groupes de brebis sur une pâture plane et homogène. Dans cette situation, les moutons alternent des phases de broût, tête baissée et presque immobile et des phases de marche rapide, tête levée. Nous proposons un modèle comportemental sous la forme d'une fonction stimulus / réponse dans laquelle la réponse comportementale porte sur la probabilité de basculer entre l'état arrêté et l'état de marche. Cette décision est sous la dépendance de la stimulation représentant la position relative et l'état des congénères. Nous trouvons que ce modèle comportemental individuel se traduit à l'échelle collective (utilisant les descripteurs densité spatiale et densité de flux) par la propagation d'une vague solitaire.

Ce travail est publié dans PLoS ONE ¹, et pour l'exposé des résultats, nous renvoyons à l'[Article : Traveling pulse emerges from coupled intermittent walks : a case study in sheep, Azaïs et al. PLoS ONE 2018](#).

Dans une perspective pédagogique, nous exposons plus en détail ci-dessous la démarche de modélisation que nous avons suivie.

2.1 Dispositif expérimental

Cette étude fait suite au travail de thèse de Marie-Helene Pillot durant lequel elle a réalisé différentes expériences avec les moutons Mérinos. Nous utiliserons en particulier son jeu de données où

1. A la date de remise du manuscrit aux rapporteurs, l'article est au statut "minor revision" et a été resoumis. La version resoumise est attachée en fin de document. La version finale de l'article remplacera cette version incluse dans le manuscrit provisoire.

des groupes de tailles différentes (2, 4, 6 et 8 individus) ont été introduits dans des pâtures homogènes de 80m x 80m.

Le déplacement spontané des moutons dans ces parcs a été filmé durant 1800 secondes au cours desquelles les positions des moutons ont été relevées toutes les secondes.

Lorsque ces moutons sont laissés en évolution libre dans ces arènes, nous remarquons qu'ils réalisent des déplacements collectifs qui séparent des phases de broût immobile. Les moutons alternent donc des phases collectives de broût (arrêt) et des phases collectives de déplacement (marche). Ces déplacements collectifs peuvent transporter le groupe sur plusieurs dizaines de mètres.

Un déplacement collectif est caractérisé par le départ d'un premier individu qui s'éloigne du groupe (nous l'appellerons l'initiateur) et qui déclenche en cascade le suivi de tous les autres congénères. Le groupe va marcher ainsi durant quelques temps jusqu'à ce qu'un individu décide de s'arrêter, ce qui déclenche en cascade l'arrêt des autres, et donc l'arrêt du groupe (Figure 2.1a). Nous remarquons que les congénères qui suivent l'initiateur se dirigent toujours dans la même direction que l'initiateur : nous décidons donc de négliger les choix sur la direction du déplacement. On suppose que l'initiateur fait le choix d'une direction qui sera toujours imitée par les suiveurs.

Nous pouvons alors idéalisé un déplacement collectif en projetant la position des moutons sur la ligne de déplacement du groupe (Figure 2.1b).

La durée de ces déplacements collectifs est longue devant la durée des transitions de changement d'état (passage d'un état collectif de broût à un état collectif de marche et inversement, figure 2.1c).

En alignant la fin d'un déplacement collectif avec le début du suivant, le phénomène peut alors être décrit par la progression d'individus le long de la trajectoire du groupe au cours du temps (et donc selon un axe 1D) et la question devient de comprendre comment les individus synchronisent leurs décisions individuelles de transition d'état, et comment ça se traduit par une cohésion à l'échelle collective (figure 2.1d).

2.2 Modèle à l'échelle individuelle

Cet énoncé est dans un premier temps qualitatif. Ensuite, nous formaliserons ces règles comportementales et nous obtiendrons une fonction stimulus / réponse.

2.2.1 Enonciation du modèle

La première étape de ce travail a été d'explorer des règles comportementale à l'échelle individuelle qui décrivent bien les observations comportementales. Ayant posé que nous allions décrire la réponse comportementale par un descripteur "tout-ou-rien", à l'arrêt ou en marche, la question porte alors sur la forme des stimuli qui module la probabilité de passer d'un état à l'autre. L'élaboration de cette fonction stimulus / réponse s'est faite en collaboration étroite avec les spécialistes du domaine qui ont conduit les expériences, en particulier Marie-Hélène Pillot, Sylvain Toulet et Richard Bon, et nous nous sommes appuyés sur leurs travaux de modélisation précédents (rappelés dans l'article). Après de nombreuses discussions au tableau, nous sommes arrivés à un énoncé qualitatif du modèle comportemental individuel.

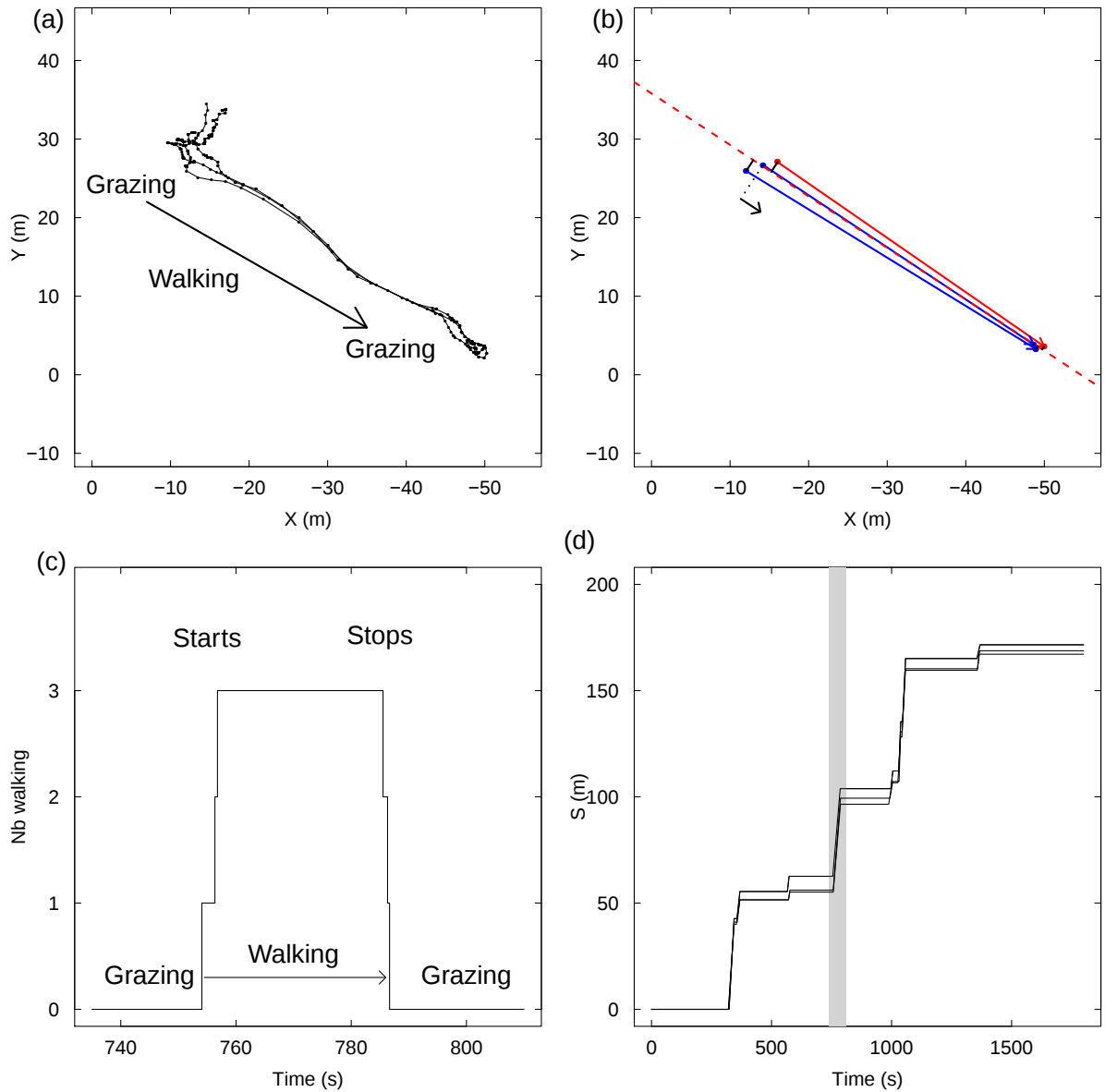


FIGURE 2.1 – Exemple d’un déplacement collectif entre deux phases de broût. a) Les positions de chaque mouton dans un groupe de $N = 3$ sont reportées par un point toutes les secondes. On observe (en haut à gauche) une phase de broût (Grazing) où les moutons bougent très peu, une phase de déplacement rapide (Walking) suivi d’un rassemblement du groupe qui retourne à une phase de broût. b) On peut idéaliser cette dynamique en négligeant les micro-mouvements pendant la phase de broût (positions initiales immobiles), et en projetant les déplacements sur l’axe général du déplacement du groupe : on obtient un déplacement en 1D. c) Le même évènement est reporté sur un axe temporel, où l’ordonnée indique le nombre d’individus en marche. On observe que le changement d’état du groupe est très rapide devant les durées des états “tous à l’arrêt” et “tous en marche”. d) Si on cumule ces évènements au cours du temps et qu’on repère chaque mouton par son abscisse S le long de la trajectoire, le groupe progresse de façon intermittente avec des phases d’arrêt collectif (S stable au cours du temps), et des phases de déplacement collectif (S augmente au cours du temps). L’évènement illustré en a-c est indiqué en (d) par la zone grisée.

Nous avons deux transitions à caractériser : lorsque les moutons se mettent en marche et lorsque les moutons s'arrêtent.

Le modèle proposé dans la thèse de Marie-Hélène Pillot concernait seulement la situation particulière (fixée par les conditions expérimentales) où tous les moutons étaient à l'arrêt. Ce modèle mettait en avant une logique d'amplification de la mise en mouvement : plus les congénères ont déjà basculé dans l'état de marche, et plus la probabilité de les imiter augmente. Ce modèle contenait aussi une logique d'inhibition où plus le nombre de congénères n'ayant pas encore basculé dans l'état de marche est grand, et plus la probabilité par unité de temps de rester dans l'état immobile est grande. Dans les deux cas, il s'agit d'une amplification de l'imitation, mais ces deux amplifications ont des effets opposés.

La thèse de Sylvain Toulet a montré que la même logique permet de modéliser l'arrêt collectif. Dans ces travaux précédents, on ne regardait qu'un seul évènement à la fois, et le premier départ ou le premier arrêt étaient contrôlés expérimentalement.

Nous avons alors généralisé ce modèle en intégrant le fait que pour décrire des évolutions spontanées pour nos groupes, il fallait un ingrédient supplémentaire pour décrire les départs spontanés depuis des groupes à l'arrêt, et les arrêts spontanés dans un groupe en train de marcher. De plus, les modèles précédents étaient purement temporels, et nous avons spatialisé la description, en considérant différemment les individus en train de s'éloigner et les individus en train de se rapprocher.

La mise en marche spontanée sera caractérisée par une probabilité par unité de temps d'adopter le mode marche (nous la notons μ_A , A pour Activation). Dans le cas de la mise à l'arrêt partant d'une condition où tous les moutons sont en mode marche, nous caractériserons l'évènement qu'un premier individu décide spontanément de s'arrêter par une probabilité par unité de temps d'adopter spontanément l'arrêt (nous la notons μ_I , I pour Inactivation).

Dans le modèle finalement adopté, nous considérons que les congénères vont être stimulés à se mettre en marche seulement par les moutons qui sont dans un état actif en train de s'éloigner (un état dénoté M^+ dont la somme sera dénotée A^+). Ils vont être en revanche inhibés par les moutons qui sont en marche et en train de se rapprocher (M^- et leur somme A^-) et par les moutons qui sont dans l'état arrêté (B^+ et B^- , et leurs sommes respectives I^+ et I^-). Ces effets croisés sont illustrés dans la figure 2.2 a.

Symétriquement, pour les moutons en mode marche, nous considérons qu'ils sont incités à l'arrêt par les congénères arrêtés dont ils s'éloignent et que cette transition vers l'arrêt est inhibée par les tous les autres (figure 2.2 b).

Les probabilités par unité de temps (taux de transition) de ces deux types de transition, K_A pour la transition marche / arrêt et K_I pour la transition arrêt / marche, peuvent alors être formalisées par les expressions suivantes :

$$K_A(A^-, I^-, A^+, I^+) = \mu_A + \alpha_A \frac{[A^+]^{\beta_A}}{[A^- + I^- + I^+]^{\gamma_A}} \quad (2.1)$$

et

$$K_I(A^-, I^-, A^+, I^+) = \mu_I + \alpha_I \frac{[I^-]^{\beta_I}}{[I^+ + A^+ + A^-]^{\gamma_I}} \quad (2.2)$$

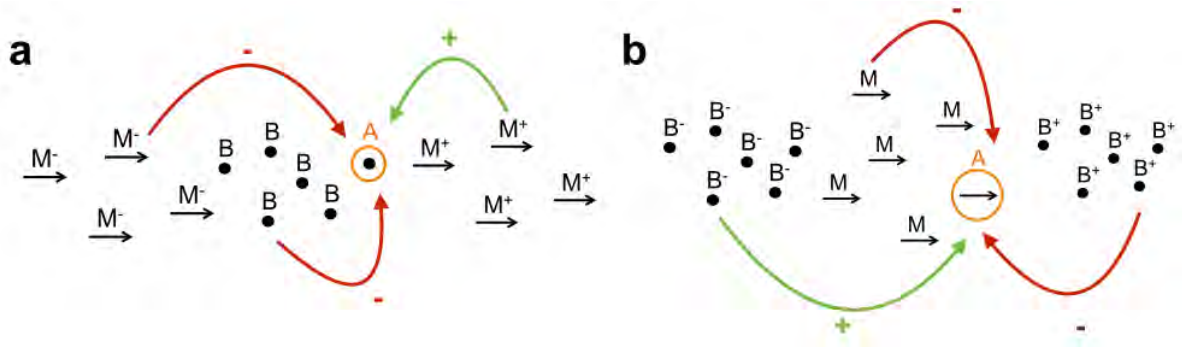


FIGURE 2.2 – Effets de stimulation / inhibition sur le changement d'état. a) Pour un individu focal A immobile, les individus qui s'éloignent (M^+) sont stimulants pour sa mise en mode marche, alors les individus arrêtés (B) et ceux qui se rapprochent (M^-) favorisent son maintien dans le mode immobile. b) Pour un individu focal A en train de marcher, les individus immobiles dont il s'éloigne (B^-) sont stimulants pour sa mise à l'arrêt alors que les individus immobiles dont il se rapproche (B^+) et les autres individus en mode marche (M) favorisent son maintien en mode marche.

Les paramètres de ces taux de transition ont été calibrés à partir des données, sauf le taux de départ spontané μ_A pour des raisons pratiques. Une valeur raisonnable (un départ spontané toutes les trois minutes environ) permet de retrouver un comportement collectif assez proche des comportements observés (figure 2.3).

2.3 Passage au modèle en densités

Nous avons donc posé un modèle à l'échelle individuelle qui permet de rendre compte du déplacement collectif cohésif des moutons lorsqu'ils sont laissés en évolution libre dans des pâtures homogènes.

Nous voulons traduire ce modèle comportemental individuel (modèle individu-centré) en une description qui donnerait directement l'équation d'évolution de la densité spatiale de moutons.

Le passage classique de l'individuel à la densité consiste à considérer un grand nombre d'individus et à faire un passage au continu (hypothèse des milieux continus).

2.3.1 Enonciation du modèle

Nous commençons par définir deux nouveaux descripteurs pour décrire en densité à la position x et au temps t la présence de moutons actifs : $A(x, t)$ et de moutons inactifs : $I(x, t)$.

Nous considérons que les moutons actifs se déplacent à la vitesse v positive. Pour une position x , on considère donc que les positions $x' > x$ sont situées "devant" x .

En l'absence de basculement entre les deux états, ces deux densités évolueraient selon :

$$\begin{cases} \partial_t I(x, t) & = 0 \\ \partial_t A(x, t) + v \partial_x A(x, t) & = 0 \end{cases} \quad (2.3)$$

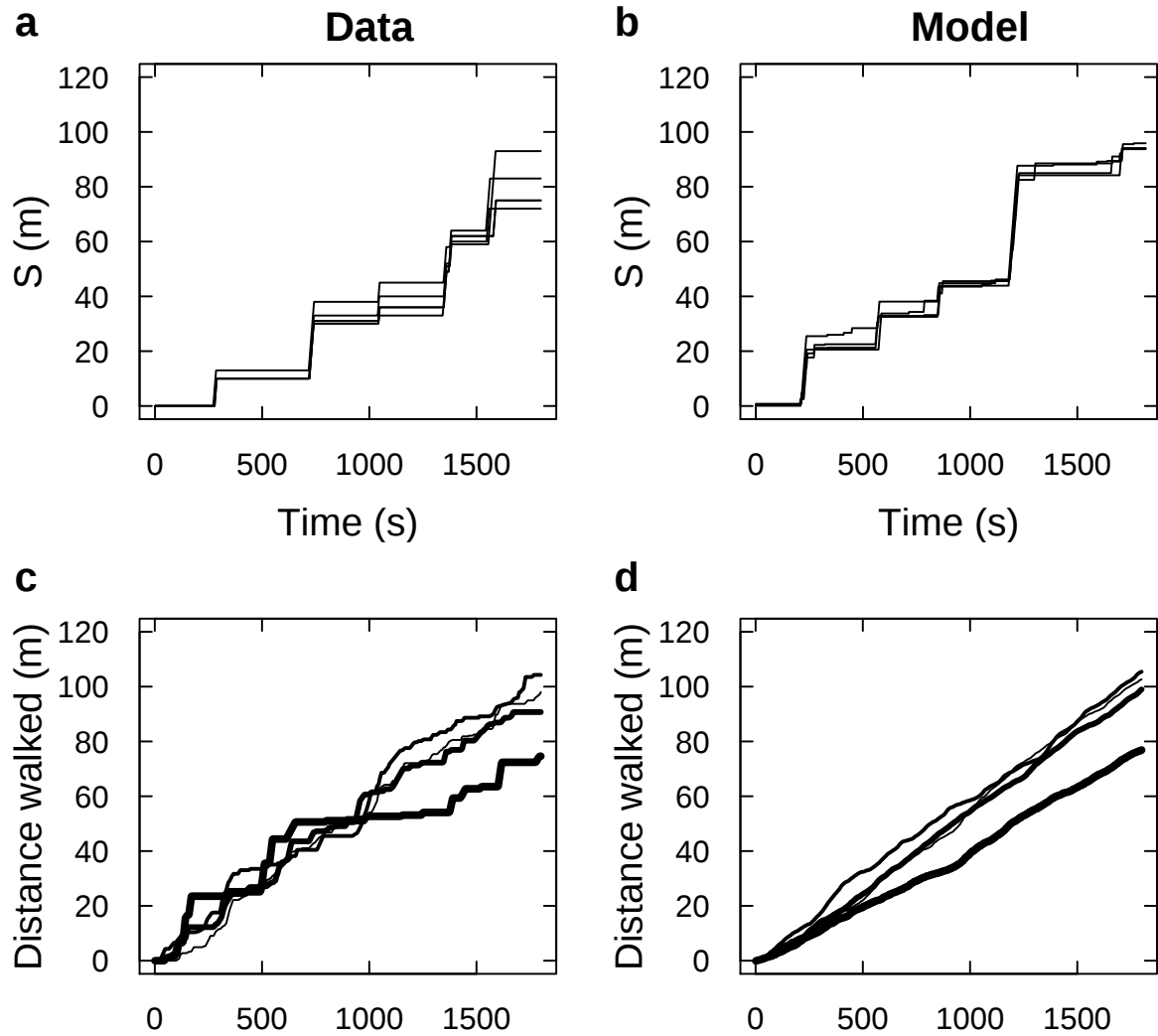


FIGURE 2.3 – Comparaison données / prédictions du modèle. L'évolution observée pour un groupe de $N = 4$ est reportée en (a) en regard d'une simulation obtenue par la simulation du modèle individu-centré (b). En moyenne, les distances parcourues par les groupes expérimentaux (c, de $N = 2$, ligne fine, à $N = 8$, ligne la plus épaisse) sont bien reproduites par les moyennes des simulations pour un taux d'activation spontané d'environ 1/3 minutes (d).

qui traduit simplement que la répartition spatiale des immobiles ne bougerait pas, et que la répartition spatiale des mobiles se déplacerait à la vitesse v (équation de transport pur).

Pour incorporer la possibilité de transition entre les états immobile et mobile, on peut traduire les transitions énoncées à l'échelle individuelle par des taux de transition entre ces deux densités, sous la forme :

$$\begin{cases} K_{I \rightarrow A}(x, t) = \mu_A + \alpha_A \left[\int_x^\infty A(u, t) du \right]^{\beta_A} \left[N - \int_x^\infty A(u, t) du \right]^{-\gamma_A} \\ K_{A \rightarrow I}(x, t) = \mu_I + \alpha_I \left[\int_{-\infty}^x I(u, t) du \right]^{\beta_I} \left[N - \int_{-\infty}^x I(u, t) du \right]^{-\gamma_I} \end{cases} \quad (2.4)$$

où N représente la quantité totale de moutons présents.

$K_{I \rightarrow A}(x, t)$ indique le taux de transition de l'état inactif à actif, et $K_{A \rightarrow I}(x, t)$ indique le taux de transition de l'état actif à l'état inactif.

L'intégrale $\int_x^\infty A(u, t) du$ représente la somme (continue) sur tout l'espace devant x de la quantité d'actifs, et donc la quantité de moutons dans l'état actif et qui sont devant la position x .

L'intégrale $\int_{-\infty}^x I(u, t) du$ représente la quantité de moutons dans l'état inactif et qui sont derrière la position x .

On retrouve donc que le taux de transition inactif / actif (première équation) peut être spontané (si la somme des actifs devant est nulle, le taux est μ_A), et qu'il peut être stimulé par la somme des actifs devant, et inhibé par tous les autres (N -les actifs devant). La même logique s'applique pour la transition inverse.

On incorpore alors ces transitions dans le système 2.3 :

$$\begin{cases} \partial_t I(x, t) &= -K_{I \rightarrow A}(x, t) I(x, t) + K_{A \rightarrow I}(x, t) A(x, t) \\ \partial_t A(x, t) + v \partial_x A(x, t) &= +K_{I \rightarrow A}(x, t) I(x, t) - K_{A \rightarrow I}(x, t) A(x, t) \end{cases} \quad (2.5)$$

qui traduit, pour la première, que la densité d'inactifs en x à t va être diminuée de la quantité d'inactifs qui passent à l'état actif, et augmentée de la quantité d'actifs qui passent à l'état inactif. La seconde est complémentaire à la première puisque la perte en inactif se traduit par un gain en actif, et réciproquement.

Cette traduction en densités du modèle individu-centré donne donc un système d'équations différentielles partielles. Les descripteurs sont différents mais le modèle reste le même.

2.3.2 Prédiction du modèle en densité

La résolution numérique du système 2.5 produit un comportement où la densité totale de moutons (actifs + inactifs) converge vers une forme de vague qui se propage à vitesse constante (figure 2.4).

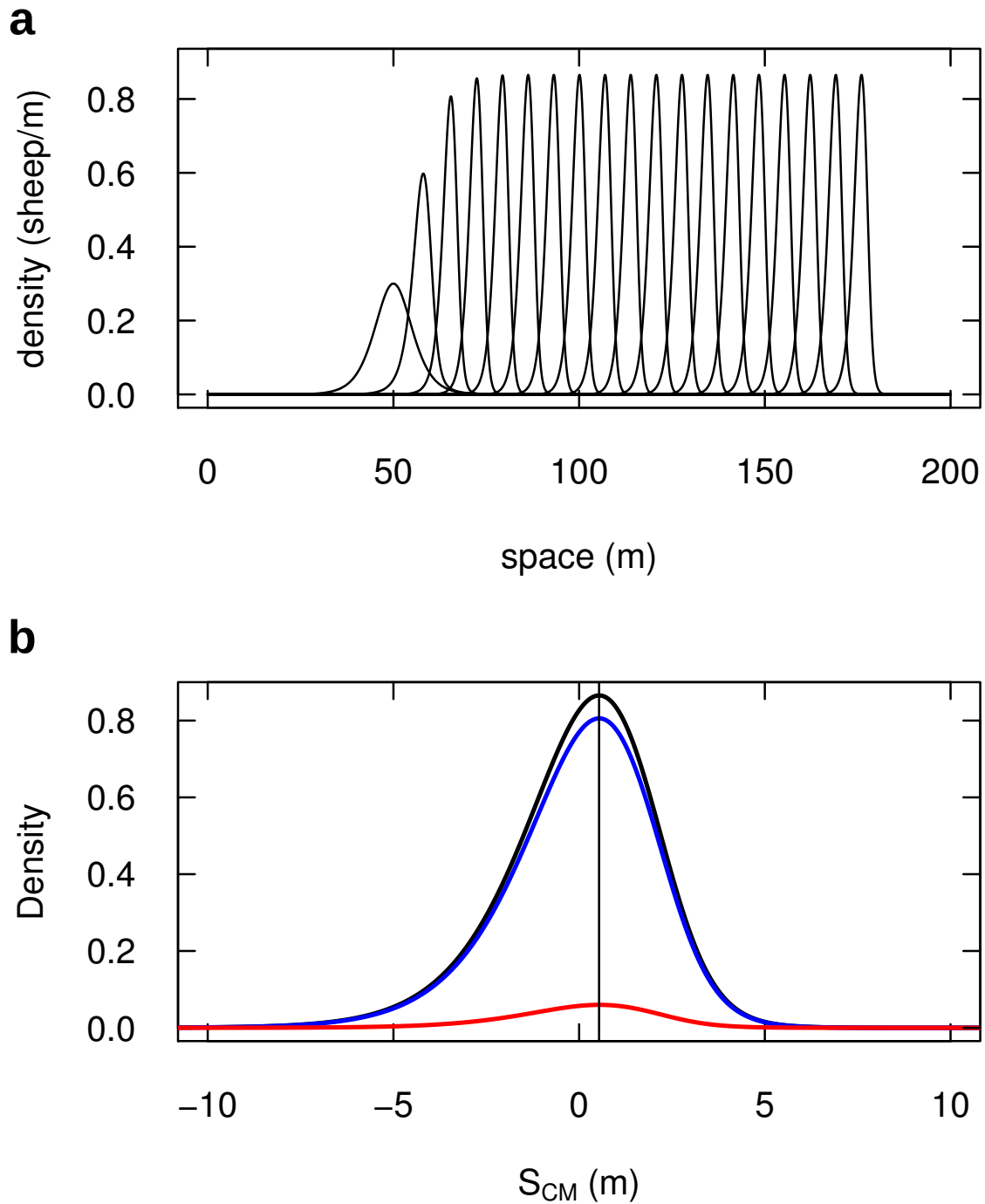


FIGURE 2.4 – Résolution numérique du système 2.5. a) Le profil de densité totale est représenté toutes les 100 secondes, à partir d'une condition initiale en forme de répartition gaussienne (le plus à gauche). Le profil converge vers une forme de type vague, et cette vague se propage à vitesse constante (de gauche à droite). b) Agrandissement du profil final (le plus à droite, à 1800 s), avec la représentation des deux densités sous-jacentes : en bleu, la densité en inactifs, en rouge, la densité en actifs.

2.3.3 Analyse du modèle

Nous avons confronté la prédiction obtenue par la résolution numérique du modèle en densité aux prédictions relevées en moyenne sur un grand nombre de réalisations du modèle individu-centré (cette confrontation est donnée en détail dans l'article à la partie "Group size effects").

Si on ne met pas de couplage ($\alpha_A = \alpha_I = 0$), alors le système est linéaire et traduit seulement un phénomène d'advection-diffusion. Nous obtenons alors une parfaite convergence entre la résolution numérique du système 2.5 et les simulations de notre modèle individu-centré (le modèle est linéaire et nous vérifions la superposition).

En présence de couplage, la résolution numérique du système 2.5 et les simulations du modèle individu-centré convergent à partir de $N = 100$. En-deça, on retrouve bien la forme de la vague pour des nombres aussi faibles que $N = 4$, mais le modèle en densité ne capture pas la vitesse moyenne d'évolution des groupes. Ce point reste à approfondir.

Nous avons fait quelques explorations numérique du système 2.5. Nous avons testé en particulier l'effet de différentes conditions initiales sur la cohésion du groupe, en variant les répartitions initiales des deux densités. Nous avons constaté à chaque fois la convergence vers une vague qui se propage à vitesse constante. La seule chose qui change entre ces différentes conditions initiales, c'est le temps nécessaire pour atteindre cet état. Il semble donc que cet état (propagation d'une vague) soit l'attracteur unique pour le comportement de ce système. Le démontrer formellement ferait appel à des mathématiques avancées.

Le système 2.5 a été traduit finalement en utilisant les descripteurs macroscopiques classiques : densité (totale) et densité de flux. En simplifiant les termes d'interactions (en ne gardant que les termes stimulants), nous avons trouvé une expression analytique de l'état attracteur, qui donne la forme de la vague comme un profil de type sech^2 et sa vitesse de propagation. Cette expression analytique nous a permis d'explorer la sensibilité de la vitesse de propagation des groupes aux quatre paramètres du modèle simplifié.

2.4 Perspectives

Cet exposé de mon travail sur le déplacement collectif chez les moutons est une illustration de la démarche classique dans le groupe de travail pour faire le passage entre l'échelle comportementale individuelle énoncée sous la forme d'une fonction stimulus / réponse et l'échelle collective en densité.

La démarche complète a pu être illustrée ici comme un cas idéal, d'une part parce que nous avons accès à des données expérimentales aux deux échelles, d'autre part de par la nature du modèle énoncé, qui permet de réaliser toute la chaîne jusqu'à une solution analytique du comportement en densité.

Cette méthodologie de modélisation est le cadre dans lequel nous abordons la dynamique de la formation de la moelle épinière lors de la morphogenèse embryonnaire.

Chapitre 3

Embryogenèse de la moelle épinière : une approche en dynamique des populations

Dans ce chapitre, j'exposerai notre travail de modélisation réalisé en collaboration avec l'équipe de Fabienne Pituello (Centre de Biologie du Développement, Centre de Biologie Intégrative, Toulouse) sur l'implication de CDC25B dans le contrôle de la balance prolifération / différenciation des progéniteurs neuronaux. Ce travail est inclus dans l'[Article : Neurogenic decisions require a cell cycle independent function of the CDC25B phosphatase, Bonnet et al. *Elife* 2018.](#)

Pour le lecteur intéressé par quelques détails du système biologique qui a servi de cas d'étude, nous en exposons les grandes lignes dans la première section [Présentation du cas d'étude : l'embryogenèse de la moelle épinière de poulet](#). Pour un lecteur intéressé surtout par la question abordée par la modélisation, nous proposons un [Résumé de la question biologique pour un modélisateur : rôle de la phosphatase CDC25B sur le mode de division](#). Nous détaillons ensuite les expériences faites chez le poulet ([Expériences](#)). Nous exposons enfin le travail de modélisation et comment le modèle est venu en appui de l'interprétation des données ([Modélisation de la dynamique des populations de cellules](#)).

3.1 Présentation du cas d'étude : l'embryogenèse de la moelle épinière de poulet

La moelle épinière constitue la partie postérieure du système nerveux central chez les vertébrés. Ses principales fonctions sont de transmettre les informations sensorielles vers l'encéphale (qui est la partie antérieure du système nerveux central) et les informations motrices vers les muscles. La moelle épinière présente trois grandes régions : la région ventrale associée aux commandes motrices et la région dorsale associée aux voies sensorielles et une régions intermédiaire contenant des interneurons permettant des relais directs entre les neurones sensoriels et moteurs.

Pour que cet organe soit fonctionnel, différents types neuronaux doivent être produits à des places bien précises et il faut qu'ils soient présents en bon nombre. Ces neurones sont produits à partir d'un pool de cellules souches spécialisées : les progéniteurs neuronaux. Ces progéniteurs peuvent proliférer pour augmenter le pool de progéniteurs ou se différencier en neurones. La recherche porte sur les acteurs moléculaires impliqués dans la régulation du processus.

3.1.1 Description du phénomène

Les différents stades de développement d'un embryon de poulet ont été décrits par Hamburger & Hamilton [32]. Si l'on fait une coupe perpendiculaire à l'axe antéro-postérieur (plan dorso-ventral / droite-gauche) juste après la fermeture du tube neural, nous constatons que nous avons une structure ovale composée d'une lumière centrale (le ventricule) entourée par un neuroépithélium. Les cellules qui composent ce neuroépithélium sont initialement des progéniteurs. La formation du tube neural ne se fait pas de manière homogène dans toute les régions, il démarre dans la région du mésencéphale pour progresser vers la région rostrale et caudale. Dans le plan dorso-ventral / droite-gauche, le développement de la structure commence par la partie ventrale et progresse vers la partie dorsale. Les progéniteurs sont distribués dans la zone ventriculaire le long de l'axe dorso-ventral. Ils vont proliférer surtout au début du processus puis une proportion croissante va se différencier en neurones. La balance entre la prolifération et la différenciation doit donc évoluer au cours du temps. Ces progéniteurs peuvent réaliser trois type de divisions : proliférative (PP), asymétrique (PN) et terminale (NN).

Les corps cellulaires des progéniteurs sont attachés de part et d'autre de la zone ventriculaire, et ils ne bougent donc pas les uns par rapport aux autres. Ils forment donc toujours une monocouche de cellules (epithélium). En revanche, leur noyau effectue des mouvements du pôle apical vers le pôle basal et retour, synchronisés avec les différentes phases du cycle cellulaire (mouvement "interkinétique"). A chaque instant, les noyaux sont donc distribués spatialement le long de l'axe apico-basal (ce qui peut donner une impression de multi-couches cellulaires si on ne repère que les noyaux : ce type de structure est nommé pseudo-épithélium).

Les neurones produits migrent hors de la zone ventriculaire pour constituer la zone marginale (en passant par une zone intermédiaire, Fig. 3.1). Ils pourront également par la suite présenter une dispersion longitudinale [40].

3.1.2 Acteurs biologiques

La mise en place des progéniteurs, et leur différenciation produira une structuration étagée de la population neuronale finale, avec des couches de neurones spécifiques (repérés par l'expression de certains gènes spécifiques, Fig. 3.2 pour la partie ventrale). Un certain nombre d'acteurs biologiques, intra- et extra-cellulaires, ont été identifiés pour leur implication dans l'évolution de la balance prolifération/différenciation et de la régulation des types neuronaux produits.

Les acteurs biologiques fondamentaux sont les couples gènes / protéines issues de la transcription-traduction des gènes. Certaines protéines ont pour rôle particulier de réguler la transcription/traduction d'autres protéines et sont appelées facteurs de transcription : ce sont des régulateurs de l'expression génétique. Ils agissent par des cascades moléculaires, impliquant un ligand extra-cellulaire, et vont activer des facteurs de transcription pour des gènes cibles. On les regroupe sous le nom de *voix de signalisation*, chaque voie étant dénommée d'après son acteur principal. Les voies de signalisation peuvent être inter-cellulaires ou intra-cellulaires. Les voies de signalisation inter-cellulaires passent par des interactions avec la membrane (en émission et en réception), et déclenchent la transcription de gènes qui vont avoir, dans la cellule réceptrice, un rôle dans le contrôle des mécanismes intracellulaires. Pour le phénomène qui nous intéresse, les mécanismes intracellulaires regroupent la cinétique du cycle cellulaire et tous les acteurs qui permettent son contrôle.

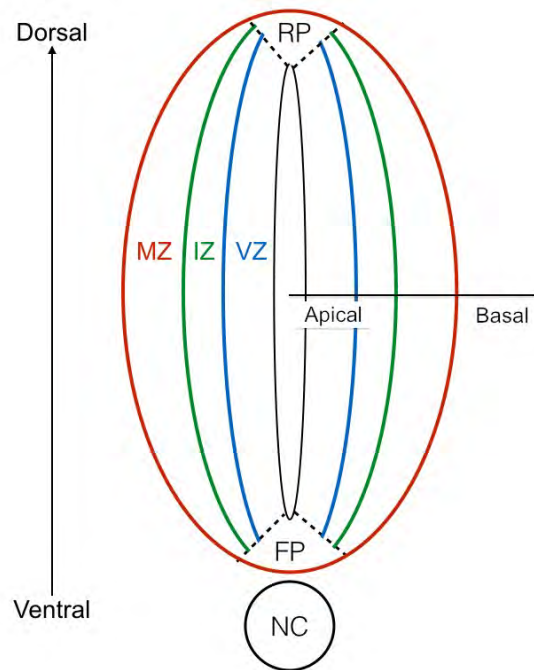


FIGURE 3.1 – Organisation spatiale de la moelle épinière en développement. VZ : Zone ventriculaire qui contient tous les progéniteurs, IZ : zone intermédiaire ; c'est une zone de transition pour les cellules différenciées, MZ : zone marginale, constituée par les neurones. RP : plaque du plafond, FP : plaque du plancher. NC : Notocorde. L'axe antéro-postérieur va de l'oeil du lecteur à la figure.

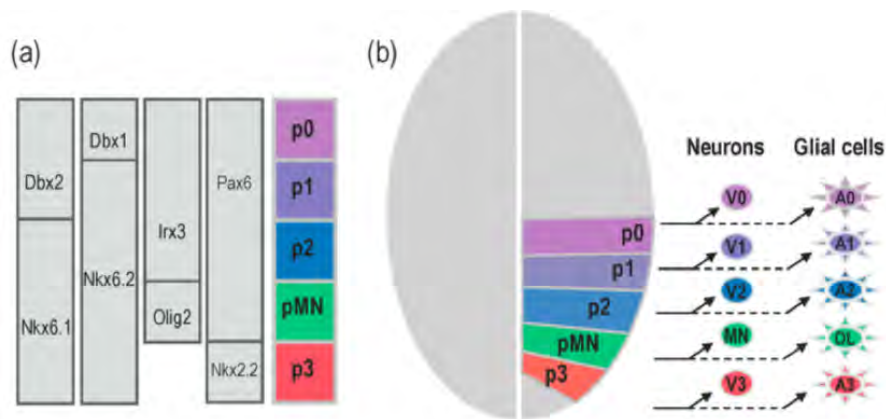


FIGURE 3.2 – Mise en place du pattern des progéniteurs dans la région ventrale de la moelle épinière, et expressions génétiques associées aux différents types neuronaux (source [16])

3.1.3 Acteurs identifiés ayant un effet sur la balance prolifération / différenciation

Un certain nombre de voies de signalisation interviennent dans le contrôle du destin cellulaire : Notch, BMP (Body Morphogenetic Protein), Wnt, FGF (Fibroblast Growth Factors), RA (Acide Rétinoïque), Shh (Sonic Hedgehog) [27, 47, 12, 8, 63, 6, 43, 55, 54, 33, 38, 37, 46, 13, 28].

La voie de signalisation BMP promeut la prolifération dans la zone dorsale, via les SMAD 1/5 [39].

Wnt favorise également le maintien des progéniteurs dans un état de prolifération [65, 50]

Les FGF promeuvent la prolifération cellulaire [52]. Ils permettent de maintenir les cellules de la

plaque neurale dans un état indifférencié [2, 1] et interviennent beaucoup au début du processus.

La voie de signalisation RA, en revanche, va favoriser la transition d'un état prolifératif à un état différenciatif [50].

L'induction de la voie Shh favorise ou maintient la dynamique proliférative des progéniteurs dans la zone ventrale (où sont produits les motoneurones) [39, 57]. Ci-dessous, nous la décrivons plus en détail.

La voie Sonic Hedgehog

La notochorde exprime un morphogène, Sonic hedgehog (Shh), qui fait partie de la famille des gènes hedgehog (il en existe trois types : Indian, Desert et Sonic). Un morphogène est une protéine qui diffuse¹ dans le milieu extra-cellulaire, se lie à des récepteurs membranaires (ce qui, en général, consomme la molécule porteuse du signal) et a un effet en termes de morphogenèse. Ici, la source se situant dans la notochorde, Shh va se propager dans la direction ventro-dorsale et former un gradient de concentration le long de cet axe.

A l'échelle du tissu, la régionalisation commence par la mise en place de la plaque du plancher déclenchée par Shh [56]. La mise en place de la plaque du plancher passe par un fort niveau transitoire de Shh, qui diminue une fois la plaque du plancher opérationnelle [54]. La plaque du plancher formée, elle va à son tour sécréter la protéine Shh [16].

Shh est par la suite impliquée dans la mise en place du pattern différencié des progéniteurs ventraux [26]. En réponse à Shh, les cellules réceptrices (les progéniteurs dans VZ) déclencheront en effet des programmes de transcription (expression de certains gènes) en fonction de la concentration locale en Shh, et cette expression différentielle de gènes se traduira par des neurones aux propriétés différentes.

A l'échelle moléculaire, Shh est initialement un précurseur de 45 kDa qui va être séparé par autoprolyse en deux peptides :

- 19 kDa que l'on appelle amino-terminal et que l'on note shh-N
- 26 kDa que l'on appelle carboxy-terminal et que l'on note shh-C

Le premier peptide shh-N est connu pour être le support de la transmission du signal. Le deuxième peptide shh-C permet à la réaction protéolytique d'avoir lieu. Une fois la protéine coupée en deux, un palmitate et un cholestérol sont ajoutés au premier peptide. Le cholestérol permet à la protéine d'interagir avec un récepteur transmembranaire (Dispatched, Dsp) de la cellule émettrice, qui va le libérer dans la matrice extracellulaire [14].

Shh entre en contact avec une cellule réceptrice par un récepteur transmembranaire Ptch (Fig. 3.3) levant ainsi l'inhibition qu'exerce ce dernier sur un autre récepteur (Smoothened, smo) [63]. Cette levée d'inhibition constitue l'activation de la voie Shh [11].

Cette activation va réguler l'activité de kinases qui activent des facteurs de transcriptions de la famille des protéines glioblastoma (Gli). L'induction de la voie extra-cellulaire Shh va donc déclencher une cascade moléculaire entraînant l'activation de la voie de signalisation intra-cellulaire Gli, qui

1. Le terme "diffuser" est utilisé ici dans son acception en embryologie et recouvre tout type de transport, de la diffusion passive isotrope (diffusion au sens de la physique) jusqu'au transport actif orienté non diffusif.

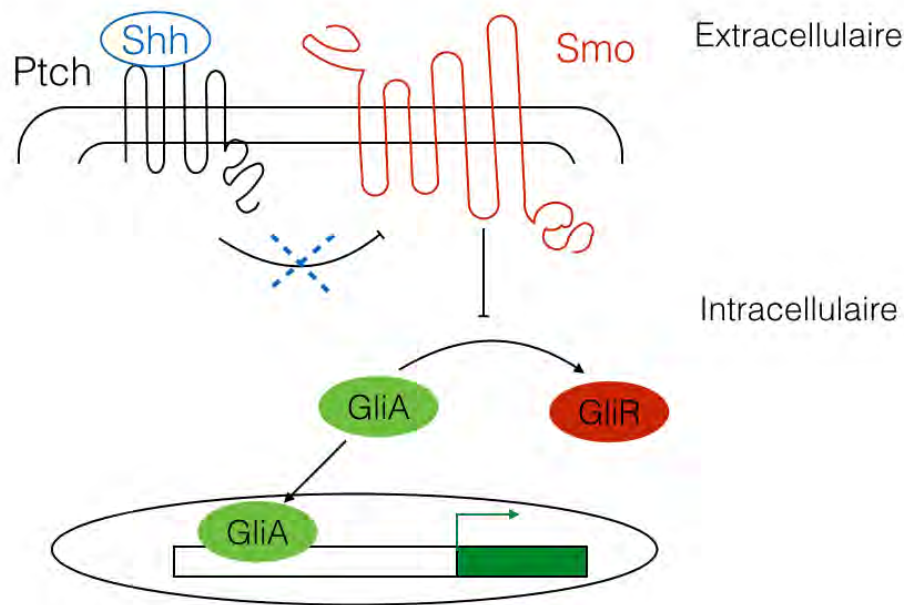


FIGURE 3.3 – Action intra-cellulaire du signal Shh.

va entraîner à son tour la transcription de gènes cibles tels que : Dbx1 et Dbx2, Nkx6.1 et Nkx2.2, Olig2, Pax6, ... [34, 22, 21, 5, 14, 16].

L'activation de ces gènes va être différente en fonction de la force du signal et de la durée d'exposition. La force du signal va dépendre du nombre de récepteurs transmembranaires qui seront fixés par une molécule Shh. Si tous les récepteurs sont fixés par une molécule de Shh alors le signal sera le plus fort possible [20]. Si les récepteurs ne sont pas tous liés par une molécule de Shh alors l'inhibition du récepteur Smo n'est que partiellement levée et l'expression des Gli est moins forte.

Il a par ailleurs été mis en évidence un rétro-contrôle négatif de l'induction de Shh sur la force de la signalisation. Une forte activité des Gli, induite par Shh, va en effet aussi déclencher / augmenter la transcription du récepteur transmembranaire Ptch. L'augmentation de la densité en ce récepteur entraîne une sur-inhibition de Smo. Cela implique donc qu'il faut augmenter la quantité de Shh reçue pour garder la même quantité de signalisation. Il y a donc une boucle de rétroaction entre Shh et Ptch qui régule le signal Shh [20, 15].

Effets des autres voies sur la signalisation Shh

La voie de signalisation Shh est en interaction avec les autres voies mentionnées ci-dessus. Les interactions connues entre ces différentes voies sont résumées dans la figure 3.4.

Ces interactions peuvent permettre des effets de type rétrocontrôle de la signalisation sur elle-même ou activation/inhibition d'autres voies. Par exemple, RA contrôle la voie de signalisation Shh via

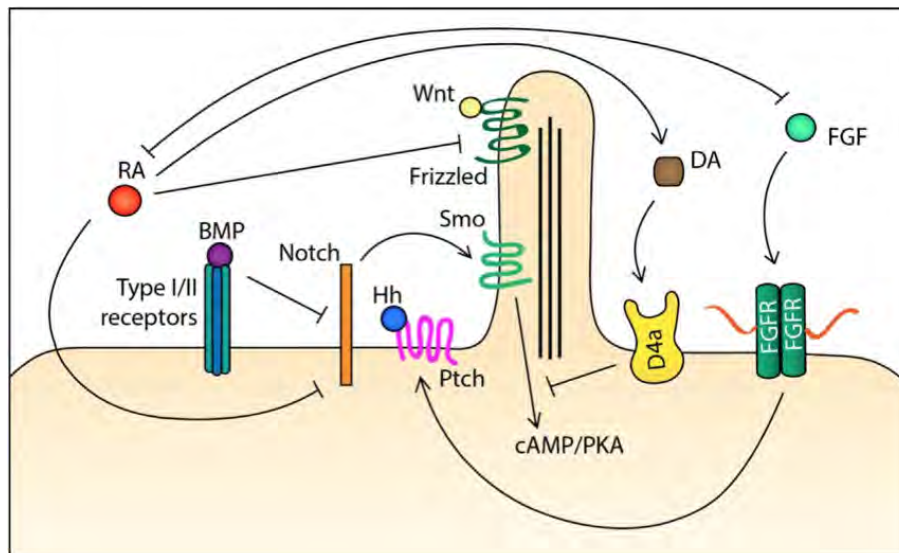


FIGURE 3.4 – Interaction entre les différentes voies de signalisation (image issue de [13])

son inhibition de la voie des FGF.

Nous sommes donc en présence d'un système dynamique complexe dans lequel toutes les cellules sont susceptibles d'émettre et de recevoir des signaux des autres cellules, et d'y réagir en termes de prolifération / différenciation / signalisation en retour.

Enfin, les neurotransmetteurs de type Dopamine et Serotonine ont une action inhibitrice sur la voie Shh [24].

Nous avons donc différentes voies de signalisation qui interviennent dans le contrôle de la balance prolifération/ différenciation et participe à la bonne mise en place d'une moelle épinière fonctionnelle.

En parallèle ou en interaction avec ces voies de signalisation, la dynamique du cycle cellulaire est également connue pour intervenir dans le contrôle de cette balance.

3.1.4 Cycle cellulaire et contrôle de la balance prolifération / différenciation

De nombreuses études ont pu mettre en évidence un lien entre le devenir d'une cellule souche (proliférer ou se différencier) et la dynamique du cycle cellulaire [61, 45]. Une modification de la cinétique du cycle cellulaire (Fig. 3.5) va influencer le destin d'une cellule progénitrice. Par exemple, une modification de la longueur du cycle cellulaire dû à un allongement de la phase G1 est corrélée avec une modification de la balance prolifération / différenciation, en faveur de la différenciation [36]. Les cellules qui ont une phase G1 plus longue ont tendance à faire des divisions différenciatrices tandis que des cellules qui ont une G1 plus courte vont plutôt faire des divisions de type prolifératives [64].

Cette dynamique du cycle cellulaire est régulée par l'activité de kinases serine/threonine, les CDK (Cyclin-Dependent Kinase), qui peuvent se lier à une cycline pour former un complexe cdk/cycline. Ces complexes interviennent à différents moments du cycle cellulaire et leur phosphorylation entraîne leur activation (figure 3.5).

Les CDK4 et 6 se lient à la cyclineD permettant la progression dans la phase G1 (figure 3.5). Une forte activation de la kinase CDK2 va entraîner une inhibition du facteur de transcription E2F et

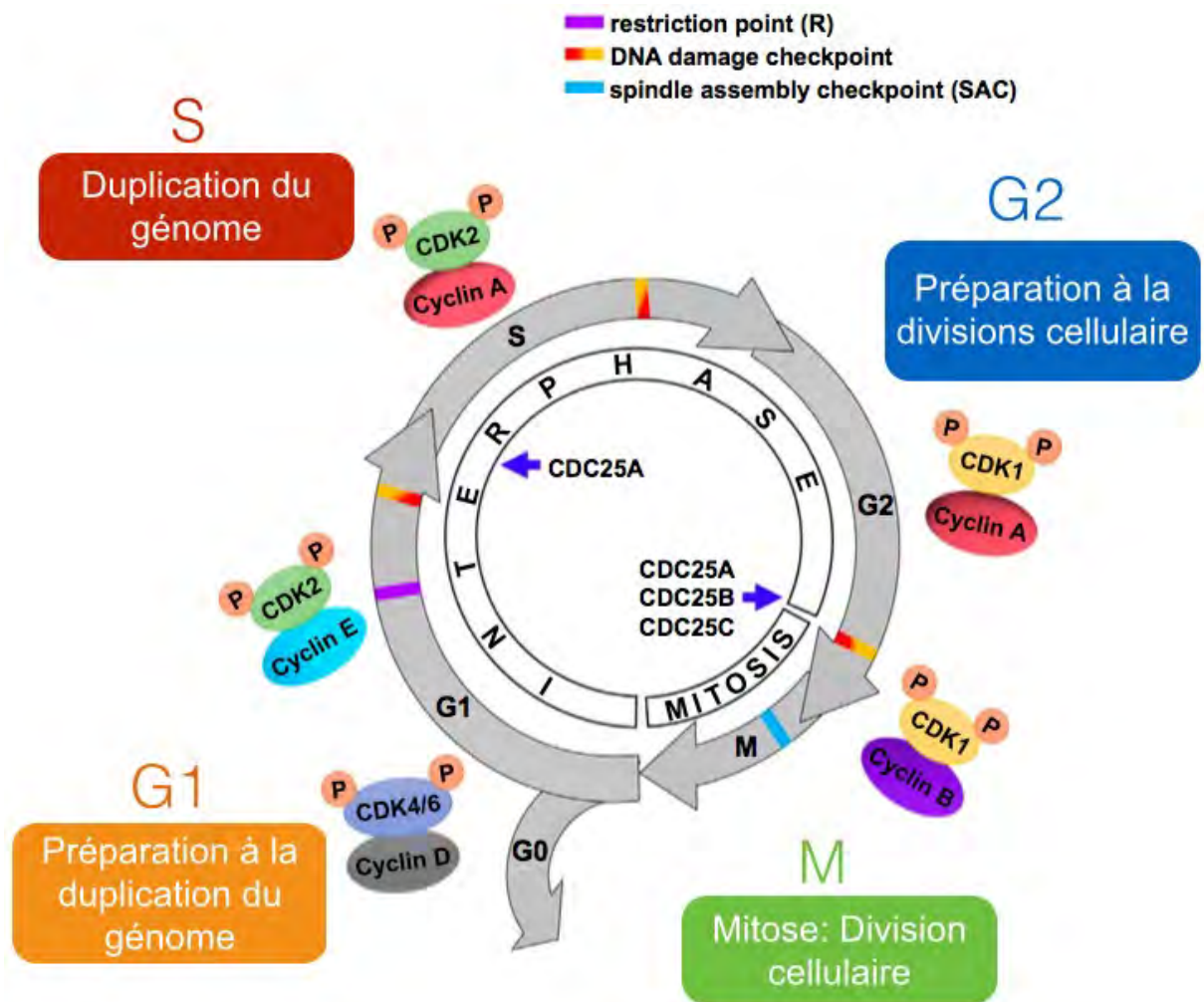


FIGURE 3.5 – **Le cycle cellulaire** chez les eucaryotes est composé de 4 phases — **G1** : lors de cette phase, les cellules décident si elles restent en phase de réplication ou si elles quittent le cycle cellulaire pour entrer en phase G0 ou état quiescent — **S** : est une phase de synthèse au cours de laquelle a lieu la réplication de l'ADN — **G2** : est une phase de préparation à l'entrée en mitose — **M** : est la mitose proprement dite. Au cours de cette phase, les cellules subissent une division cellulaire pour engendrer deux cellules filles. Les principaux complexes contrôlant la dynamique du cycle cellulaire sont indiqués (source [45]).

favoriser la sortie de la phase G1. Cette inhibition va entraîner une inhibition du gène cible string (dont l'homologue chez les mammifères est CDC25B) et une activation des cyclines A et B ainsi que CDK1. Ce complexe CDK2/CyclineE qui agit en fin de G1 est défini comme un *point de restriction* dans le sens où une fois que la cellule dépasse ce point, elle va s'engager en phase S et ne pourra plus revenir en arrière (figure 3.5) : elle est destinée à dupliquer son ADN et à se diviser.

Après la phase de synthèse du nouvel ADN, les complexes CDK1/CyclineA et CDK1/CyclineB permettent la progression dans la phase G2 et le passage de la phase G2 à la phase M respectivement [60, 62] (figure 3.5). Le profil temporel en densité de ces complexes régulent donc la durée de la phase G2, et le moment de l'entrée en mitose [53] (figure 3.5).

La régulation des cycline et cdk va modifier la balance prolifération / différenciation.

Par exemple, une sous-régulation de la cycline D1 diminue le nombre de progéniteurs engagés en différenciation [42].

La voie de signalisation Wnt contrôle la prolifération des progéniteurs en régulant les cyclines D1 et D2 (i.e transition G1-S) permettant ainsi la progression dans le cycle cellulaire, dans ce cas le passage de la phase G1 à la phase S [44, 3]. La surexpression des cyclines D1 et D2 promeut la prolifération et diminue la différenciation dans les stades précoces du développement [41].

Notch est principalement activé lors des phases G2 et M et ajoute un contrôle sur la progression de la balance entre prolifération et différenciation [19, 18, 48].

Une inhibition de SMAD1/5 provoque un raccourcissement de la phase S, corrélé avec une augmentation de la différenciation [4].

Le contrôle de la transition de la phase G2 vers la phase M a aussi fait l'objet de nombreuses études. Cette transition est sous le contrôle de la voie de signalisation Shh via son action sur les cyclines A et B [7, 3].

3.1.5 La phosphatase CDC25B

Cette transition G2/M est aussi sous le contrôle d'une phosphatase (CDC25B, CDC = Cell Division Cycle) qui a été identifiée comme jouant un rôle dans le devenir cellulaire via son action sur le complexe cdk/cycline. L'équipe d'embryologistes avec laquelle nous avons collaboré a mis en évidence un rôle essentiel de la phosphatase CDC25B dans la progression de la balance prolifération / différenciation (les données biologiques sont exposées dans l'article 7.2).

Les CDC25 sont des phosphatases, des enzymes qui enlèvent un groupement phosphate à leur substrat (déphosphorylation). Chez les mammifères, trois gènes de CDC25 ont été identifiés : les CDC25 A, B et C. Deux gènes A et B ont été identifiées chez le poulet.

Le substrat canonique des CDC25 sont les protéines Cdk, qui se retrouvent activées par la déphosphorylation [23]. Les complexes Cycline/Cdk ayant un rôle central dans la progression du cycle cellulaire, plusieurs études ont donc fait le lien entre l'activité des CDC25 et la régulation de la progression du cycle cellulaire [10] (Fig. 3.6).

En phase S et G2 du cycle, CDC25B est localisée dans le noyau mais se transporte dans le cytoplasme juste avant ou lors de la mitose [17, 30, 9]. Un pic de CDC25B a été observé lors de la transition entre la phase G2 et la phase M où il agit sur le complexe CyclineB/CDK1 [29, 35, 25, 10, 1]. Il a donc un rôle central dans la régulation de la transition entre les phases G2 et M du cycle, c'est-à-dire sur les mécanismes qui provoquent l'entrée en mitose. CDC25B est sous le contrôle d'une kinase, CHK1, capable d'inhiber l'activité de CDC25B et d'ainsi retarder l'entrée en mitose [59].

Par ailleurs, plusieurs études ont montré que ce rôle de CDC25B sur le cycle cellulaire avait aussi des conséquences sur le mode de division adopté par la cellule en mitose, et donc un rôle dans le contrôle de la balance prolifération / différenciation, peut-être par son rôle sur la maturation des centrosomes [31] mais aussi peut être par son action sur la durée de la phase G2 [51]. CDC25B intervient en effet sur la durée de la phase G2, et promeut la différenciation et une transition précoce vers la mitose [51].

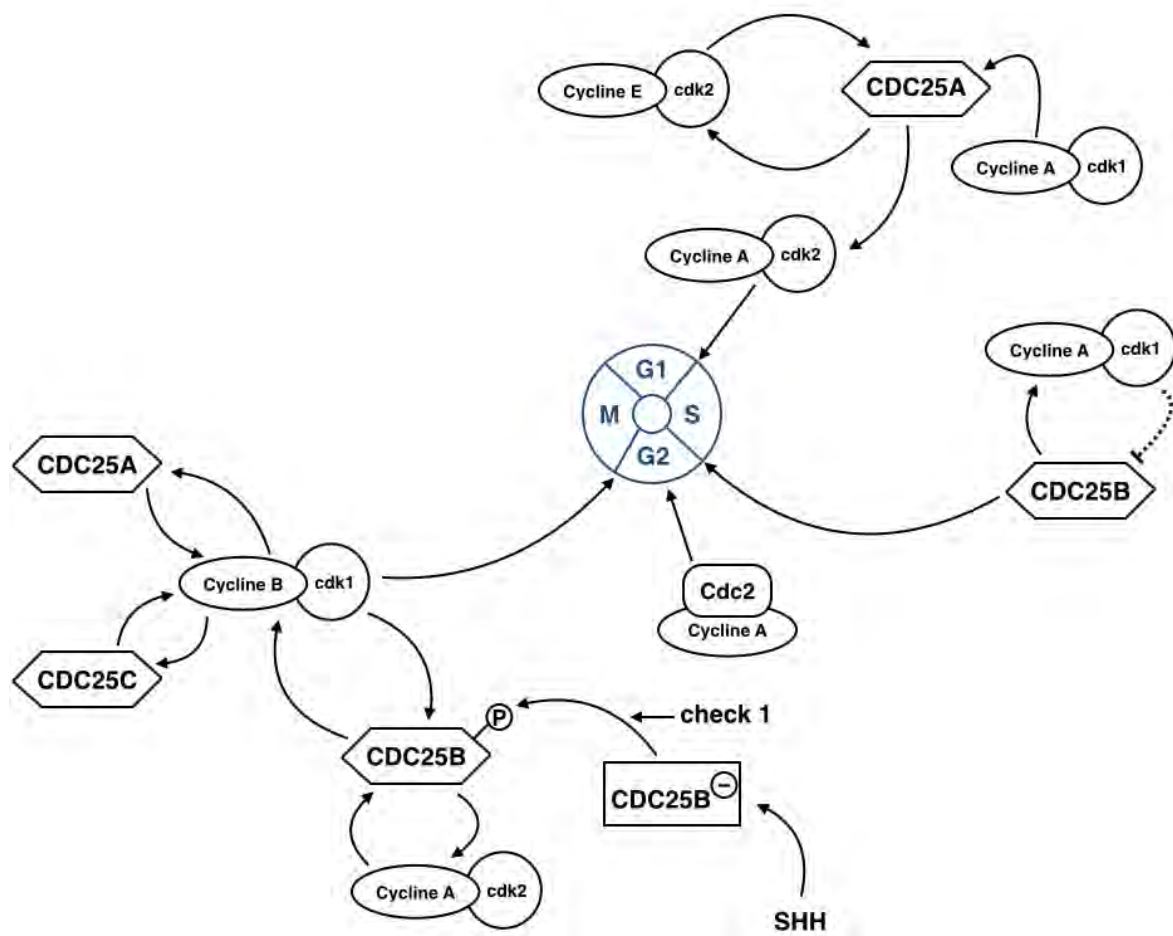


FIGURE 3.6 – Voies de régulation des CDC25.

3.2 Résumé de la question biologique pour un modélisateur : rôle de la phosphatase CDC25B sur le mode de division

La mise en place de la moelle épinière nécessite qu'un nombre déterminé de neurones soient produits aux endroits requis lors de l'embryogenèse. Les populations de neurones qui constitueront les zones ventrale et dorsale sont produites par des pools initiaux de progéniteurs dédiés à cette production (les progéniteurs neuraux). Au début du processus, les progéniteurs vont proliférer en faisant des divisions cellulaires (mitoses) de type symétrique proliférative : un progéniteur donne deux progéniteurs par division : $P \rightarrow (P, P)$. Au cours du temps cependant, certains progéniteurs vont adopter des modes de division différents : certaines divisions vont être de type symétrique terminale, où le progéniteur produit deux cellules ayant perdu le pouvoir de proliférer, et qui se différencient en deux neurones : $P \rightarrow (N, N)$. D'autres divisions vont être de type asymétrique, un progéniteur donnant par division un progéniteur et une cellule différenciée : $P \rightarrow (P, N)$. On observe donc une évolution entre des divisions surtout prolifératives au début du processus, et surtout différenciatrices à la fin, de telle sorte que le pool initial de progéniteurs finit par s'éteindre, et que toutes les cellules finales se différencient en neurones. L'évolution des deux populations de progéniteurs et de neurones dépend donc de l'évolution de la balance entre prolifération et différenciation.

Pour que le nombre adéquat de neurones soit produit, il faut que l'évolution de cette balance soit bien contrôlée. Pour gagner en compréhension sur les mécanismes d'action de CDC25B sur l'évolution de cette balance, l'équipe de F. Pituello a réalisé des expériences consistant à manipuler la quantité de CDC25B.

3.3 Expériences

3.3.1 Principes de la manipulation expérimentale

Trois expériences différentes ont été réalisées, deux expériences consistant à sur-exprimer et à sous-exprimer CDC25B et une troisième consistant à utiliser une forme mutée de CDC25B (CDC25B^{ΔCDK}) où la phosphatase est modifiée de sorte à supprimer son interaction avec Cdk1.

Les deux premières expériences permettent de voir les effets de CDC25B sur la répartition des différents modes de divisions ainsi que sur la production neuronale. La troisième expérience permet de tester si la modification des modes de divisions observée dans l'expérience de sur-expression passe par cette interaction, et donc par l'action de CDC25B sur le cycle cellulaire, en particulier son contrôle de la durée de la phase G2.

La sur-expression de CDC25B a été obtenue par électroporation. Cette technique consiste à injecter un plasmide codant pour CDC25B dans la lumière du tube neural. Par application d'un champ électrique, les plasmides vont entrer dans les cellules progénitrices.

Le détail du protocole est donné en section [Principe du protocole expérimental](#).

La sous-expression de CDC25B a été obtenue en utilisant la technique d'interférence à ARN (RNAi *knockdown*).

Pour chacune des trois expériences, l'utilisation de techniques d'immunomarquages spécifiques des types cellulaires (progéniteurs / neurones) a permis d'estimer la proportion de progéniteurs et de neurones 24h et 48h après l'électroporation. L'utilisation de marqueurs spécifiques du mode de

division a permis d'estimer la proportion des différents mode de division (PP, PN, NN) 24h après électroporation.

La durée de la phase G2 a par ailleurs été estimée pour les divisions dans la zone dorsale.

3.3.2 Principe du protocole expérimental

Préparation des plasmides ADN

L'ADN codant pour CDC25B (ou sa forme mutée) sera électroporé sous la forme d'un plasmide bactérien (un ADN circulaire) dans lequel on a inséré le gène d'intérêt. L'électroporation permettra de faire pénétrer ces plasmides dans les cellules, à travers la membrane cellulaire qui ouvre des pores temporaires sous l'effet du champ électrique. La machinerie cellulaire pourra alors traduire et exprimer le gène d'intérêt. Pour contrôler l'intégration cellulaire de ces plasmides, on y associe des plasmides avec des protéines de fluorescentes.

Préparation des œufs

La première étape est de prélever 5ml de blanc afin de permettre au jaune de descendre et de se coller à la paroi inférieure. Ceci permet de libérer une poche d'air au-dessus du blanc. On peut alors découper la coquille de l'œuf sans risquer de percer le jaune (ce qui entrainerait la mort de l'embryon). Les oeufs sont donc ouverts à l'aide d'un ciseau au niveau de la poche d'air (comme un oeuf à la coque). On injecte alors de l'encre de chine afin de pouvoir observer l'embryon par contraste sur fond noir (sous la loupe binoculaire). Une solution de PBS et d'antibiotiques est déposée en surface pour éviter la dessiccation et la contamination.

Electroporation

Cette étape consiste à injecter l'ADN dans l'embryon de poulet. Une fois l'embryon visible sous la loupe binoculaire, l'ADN est micro-injecté par la vésicule céphalique jusqu'à la moëlle épinière. On laisse l'ADN diffuser dans la lumière du tube neural. Un champ électrique bref et intense est appliqué (5 pulses de 60 volt/cm pendant 50 millisecondes) de part et d'autre de la moelle épinière. L'ADN étant chargé négativement, il migre du côté positif. Cette opération d'électroporation est délicate à faire, et environ la moitié des œufs sont finalement mis à incuber.

On contrôle pour ces derniers que l'opération a bien marché en vérifiant la viabilité de l'embryon et l'expression de la fluorescence 16 heures après l'électroporation (les œufs incubés sont réouverts sous une loupe binoculaire à épifluorescence). Du fait de la technique, on ne peut réduire la grande variabilité du nombre de cellules ayant incorporé l'ADN.

24 heures ou 48 heures après l'électroporation, les embryons sont fixés et découpés au microtome. Les tranches obtenues sont analysées au microscope confocal où un dénombrement des cellules selon le type de marquage que l'on analyse est réalisé.

Les oeufs ont été électroporé à E1,5, soit un jour et demi après la ponte de l'oeuf.

Marquages

Les expérimentateurs ont relevé, à E2.5 soit 24h après, la fraction de cellules qui expriment le marqueur sox2p (pour les progéniteurs) ou tis21p (pour les neurones) ou les deux. Des cellules qui

expriment uniquement le marqueur sox2p sont des cellules en train de faire une divisions proliférative (PP). Les cellules qui expriment uniquement le marqueur tis21p sont des cellules en train de faire une division terminale (NN). Les cellules qui expriment les deux marqueurs sont des cellules en train de faire une division asymétrique (PN). A E3.5, soit 48h après électroporation, ils ont réalisé une immunohistochimie avec des anticorps dirigés contre la protéine HUCD (pour marquer les neurones) et contre la protéine Sox2 (pour marquer les progéniteurs). Ils relèvent ainsi la fraction de neurones et de progéniteurs présents dans le système .

3.3.3 Résultats des observations

S'agissant des modes de division, la sur-expression de CDC25B a pour effet de promouvoir les divisions différenciatrices au détriment des divisions prolifératives (la sous-expression de CDC25B a l'effet inverse). Dans la zone ventrale, ce sont surtout les divisions de type NN qui sont augmentées alors que ce sont surtout les divisions de type PN qui sont augmentées dans la zone dorsale (Fig.3.7A). La première conclusion est donc que l'apport "artificiel" de CDC25B favorise (par rapport au contrôle) la différenciation des progéniteurs en neurones. La forme mutée de CDC25B incapable d'interagir avec CDK1 montre un effet identique dans la zone dorsale, mais favorise plutôt les divisions PN dans la zone ventrale. La seconde conclusion est donc que le rôle de CDC25B sur la balance prolifération / différenciation devrait être indépendant de son interaction avec les complexes régulant le cycle cellulaire. Cette seconde conclusion est renforcée par l'observation que la forme mutée n'affecte pas la durée de la phase G2. La conclusion générale est donc l'hypothèse que CDC25B agirait sur la balance par une fonction supplémentaire qui ne passerait pas par la modification du cycle cellulaire.

S'agissant des proportions progéniteurs / neurones à 24h et 48h après électroporation, on observe une augmentation de la proportion de neurones en accord qualitatif avec la promotion des divisions différenciatrices (Fig.3.7B). Pour tester l'accord quantitatif des deux types de grandeurs estimées (modes de division et proportion des deux populations), nous avons explicité complètement le modèle le plus simple en accord avec les embryologistes.

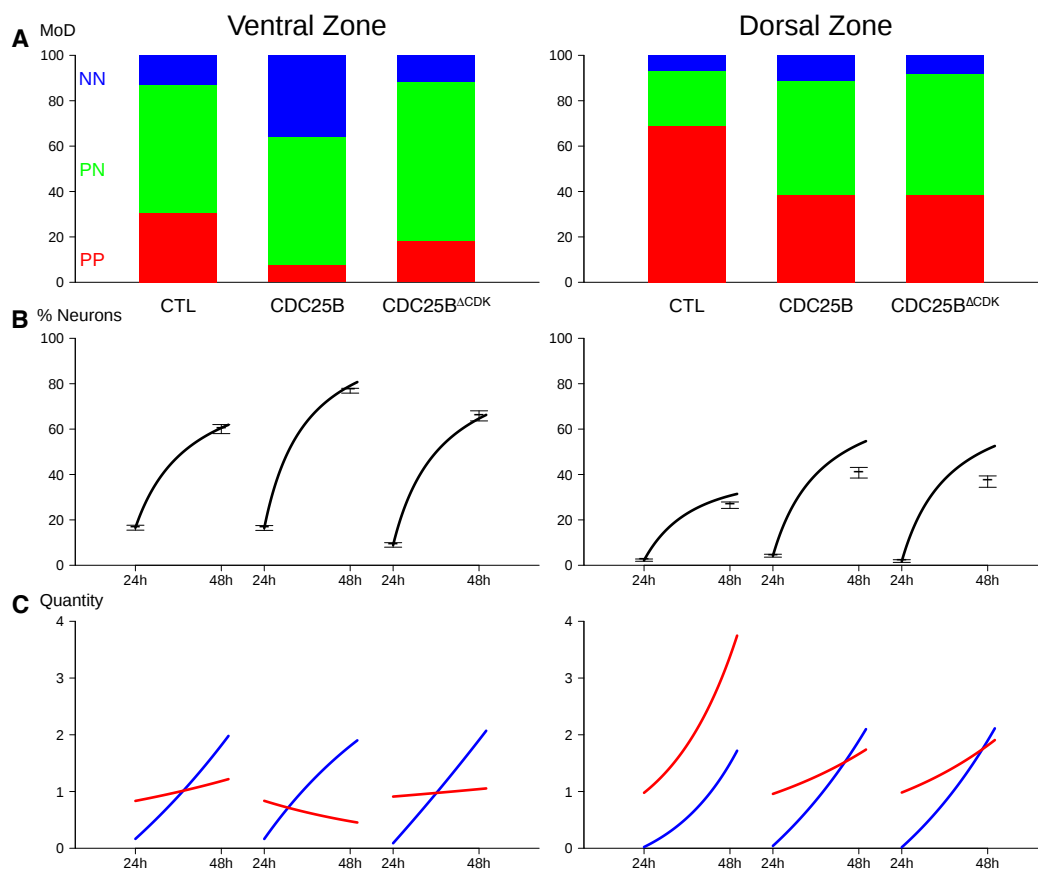


FIGURE 3.7 – Résumé des données et des prédictions. (A) Distribution observée des modes de divisions (MoD) pour les trois conditions et les deux zones. (B) Les points représentent les fractions de neurones observées à 24h et 48h. Les lignes représentent l'évolution de la fraction de neurone prédite par le modèle, en partant de la donnée à 24h et de la distribution observée des MoD. (C) Evolution théorique correspondante pour les deux populations en nombre pour une population initiale de 1 à 24h (Rouge : progéniteurs, Bleu : neurones).

3.4 Modélisation de la dynamique des populations de cellules

Cette section est destinée aux lecteurs biologistes qui ne sont pas familiers avec la manipulation d'un modèle sous forme d'équations formelles. Nous allons construire un modèle à l'échelle de la population à partir d'une description comportementale à l'échelle cellulaire correspondant au paradigme fondamental des processus d'embryogenèse : des progéniteurs se multiplient en d'autres progéniteurs (prolifération) ou se différencient en cellules fonctionnelles (différenciation). Nous présentons cette construction, pas à pas, et nous obtiendrons un modèle de type "dynamique des populations".

3.4.1 A l'échelle individuelle

Nous considérons la cellule progénitrice comme l'entité de base de notre système, et nous résumons tous les processus moléculaires sous-jacents en termes de comportement de cette unité de base. Le comportement de la cellule peut, de ce fait, se résumer à deux phénomènes : un phénomène de croissance (le cycle cellulaire) qui demande une certaine durée, et un phénomène de division (la mitose) dont la durée est suffisamment petite devant la durée du cycle qu'on peut la considérer comme instantanée. On peut donc considérer la division comme un *évènement*, c'est-à-dire un changement d'état instantané dont on peut définir la date. La division donne deux cellules (qui partagent plus ou moins en deux le volume que la cellule avait avant division). Nous considérons que les deux cellules-filles peuvent avoir deux types de comportement : soit elles adoptent le comportement de la cellule-mère, c'est-à-dire qu'elles s'engagent elles-mêmes dans un cycle jusqu'à se diviser, soit elles adoptent un comportement de cellule différenciée, c'est-à-dire qu'elles reconstituent un état interne stable et viable, mais sans poursuivre une croissance jusqu'à se diviser de nouveau (elles "sortent" du cycle).

Il est en général considéré que les cellules-filles qui sortiront du cycle le font, en fait, à la fin d'une phase du cycle (G1), juste avant la phase pendant laquelle l'ADN cellulaire est répliqué (la phase S). Quand une cellule-fille sort du cycle, des jeux alternatifs d'expression génétique deviennent actifs, et détermineront le type fonctionnel que ces cellules adopteront (maturation). Dans notre cas, on simplifie la description en considérant que les cellules qui sortent du cycle deviendront des neurones, même si elles n'expriment pas forcément tous les marqueurs génétiques neuronaux dès la sortie du cycle, et que le type de neurone produit dépend des expressions génétiques induites par les voies de signalisation telle que Shh.

Cette description comportementale simplifiée nécessite deux paramètres pour décrire quantitativement ce comportement : la durée d'un cycle, et une fonction de décision qui détermine si les cellules-filles repartent à faire un cycle, ou sortent du cycle.

Ce choix d'une description *comportementale* des cellules n'exclut pas, bien sûr, toute l'énorme complexité de la machinerie cellulaire et des expressions génétiques sous-jacentes, telles que décrites en section 3.1. Nous faisons seulement ici le choix de résumer le phénomène à l'échelle de la cellule individuelle en termes de comportement en vue de construire une description du phénomène à l'échelle de la population.

Temps de cycle

Il est établi expérimentalement que les temps de cycle peuvent varier d'une région à l'autre de l'embryon, dépendre du type de progéniteurs considérés, et varier au cours du temps pour un même type de progéniteur et dans une même zone. Pour un même type de progéniteurs au même moment et dans une même zone, peu d'informations sont disponibles sur la distribution de leurs temps de cycle. Il existe nécessairement un temps de cycle minimal, et les mesures expérimentales donnent seulement accès à un temps de cycle moyen parce qu'elles se fondent sur des proportions de progéniteurs ayant incorporé un marqueur spécifique entre deux instants. Il n'y pas encore de données à l'échelle cellulaire qui permettraient d'estimer la variance et la forme de la distribution des temps de cycle. Le choix le plus simple est alors de considérer cette variance comme nulle, c'est-à-dire d'attribuer à tous les progéniteurs un même temps de cycle.

3.4.2 Passage en population

A l'échelle de la population, nous décrivons l'état du système par le nombre de cellules de chaque type : nos descripteurs seront donc deux nombres P et N . Ces deux nombres sont continus et peuvent être considérés comme les moyennes du nombre de cellules de chaque type estimées sur un (grand) nombre de répliquions expérimentales (ils dénotent l'espérance du processus). Nous ne nous intéressons en premier lieu qu'à leur évolution temporelle, sans tenir compte des distributions spatiales : on ne regarde donc que leur dépendance au temps $P(t)$ et $N(t)$.

Exemple standard : la prolifération pure avec durée de cycle fixe

Pour illustrer la construction de l'équation d'évolution de la densité $P(t)$, nous commençons par considérer le cas le plus simple : tous les progéniteurs cyclent indéfiniment (prolifération pure), avec le même temps de cycle τ_m , et sans phénomène de synchronisation des mitoses (les événements de mitoses sont répartis uniformément dans le temps). L'image intuitive est bien entendu la croissance exponentielle sans limite. Notre objectif est de la formaliser en détails.

Nous commençons à regarder le phénomène à un instant initial arbitraire $t = 0$, où il existe une population de progéniteurs $P_1(0)$. Sous l'hypothèse que chaque cycle dure exactement τ_m , et en l'absence de synchronisation, les dates de dernière mitose de ces progéniteurs sont réparties uniformément entre $t = 0 - \tau_m$ et $t = 0$. Ils vont donc tous produire leur prochaine mitose dans l'intervalle de temps $[0 .. 0 + \tau_m]$. Comme les mitoses sont réparties uniformément dans le temps, le nombre de mitoses ayant lieu pendant un intervalle de temps Δt est donc proportionnel à celui-ci, et au nombre de progéniteurs présents initialement. Le changement de progéniteurs de la population P_1 entre t et $t + \Delta t$ est donc :

$$P_1(t + \Delta t) - P_1(t) = -P_1(0)\Delta t / \tau_m \quad (3.1)$$

Si $t = 0$ et $\Delta t = \tau_m$, on a :

$$P_1(\tau_m) - P_1(0) = -P_1(0)\tau_m / \tau_m \implies P_1(\tau_m) = 0 \quad (3.2)$$

Toute la population $P_1(0)$ initialement présente a disparu par mitose entre 0 et τ_m .

On peut réécrire l'équation 3.1 sous la forme :

$$\frac{P_1(t + \Delta t) - P_1(t)}{\Delta t} = -P_1(0)/\tau_m \quad (3.3)$$

et prendre la limite $\Delta t \rightarrow 0$ donne :

$$\frac{dP_1(t)}{dt} = -P_1(0)/\tau_m \quad (3.4)$$

dont la solution :

$$\begin{aligned} P_1(t) &= P_1(0) - (P_1(0)/\tau_m) t \\ &= P_1(0)(1 - t/\tau_m) \end{aligned} \quad (3.5)$$

est une décroissance linéaire de $P_1(0)$ jusqu'à 0 à $t = \tau_m$.

Par ailleurs, les mitoses qui ont lieu pendant l'intervalle de temps $[0 .. 0 + \tau_m]$ produisent deux cellules chacune, de la génération suivante, $P_2(t)$, qui augmente donc deux fois plus vite que P_1 disparaît, jusqu'à atteindre $2P_1(0)$ à l'instant $t = \tau_m$. A partir de cet instant, les plus anciennes cellules de la deuxième génération vont entrer en mitose pour produire la génération P_3 , etc. (fig 3.8).

En mélangeant les générations dans une seule population de progéniteurs, cette croissance linéaire par morceau peut être approximée très bien par une fonction exponentielle croissante de paramètre η :

$$P(t) = P_0 \exp(\eta t) \quad (3.6)$$

où η est tel que :

$$e^{\eta \tau_m} = P_2(\tau_m) = 2 \implies \eta = \ln 2 / \tau_m \quad (3.7)$$

et qui est solution de l'équation d'évolution :

$$\frac{dP(t)}{dt} = \eta P(t) \quad (3.8)$$

avec la condition initiale P_0 .

Progéniteurs avec deux modes de division

Nous introduisons maintenant la prise en compte du choix de mode de division avec une probabilité α_{nn} que cette division conduise à une différenciation (division $P \rightarrow NN$) et donc une probabilité de continuer à cycler $\alpha_{pp} = 1 - \alpha_{nn}$ (division $P \rightarrow PP$). En toute généralité, nous considérons que le mode de division peut évoluer dans le temps, et nous l'écrivons donc comme une fonction du temps : $\alpha_{pp}(t)$ et $\alpha_{nn}(t)$.

En adoptant la description effective 3.8 établie dans la section précédente, l'introduction de deux sorties possibles pour la mitose se traduit par l'ajout d'une population dans le système ($N(t)$ pour les neurones), et des équations bilan modifiées. Ce bilan peut s'écrire :

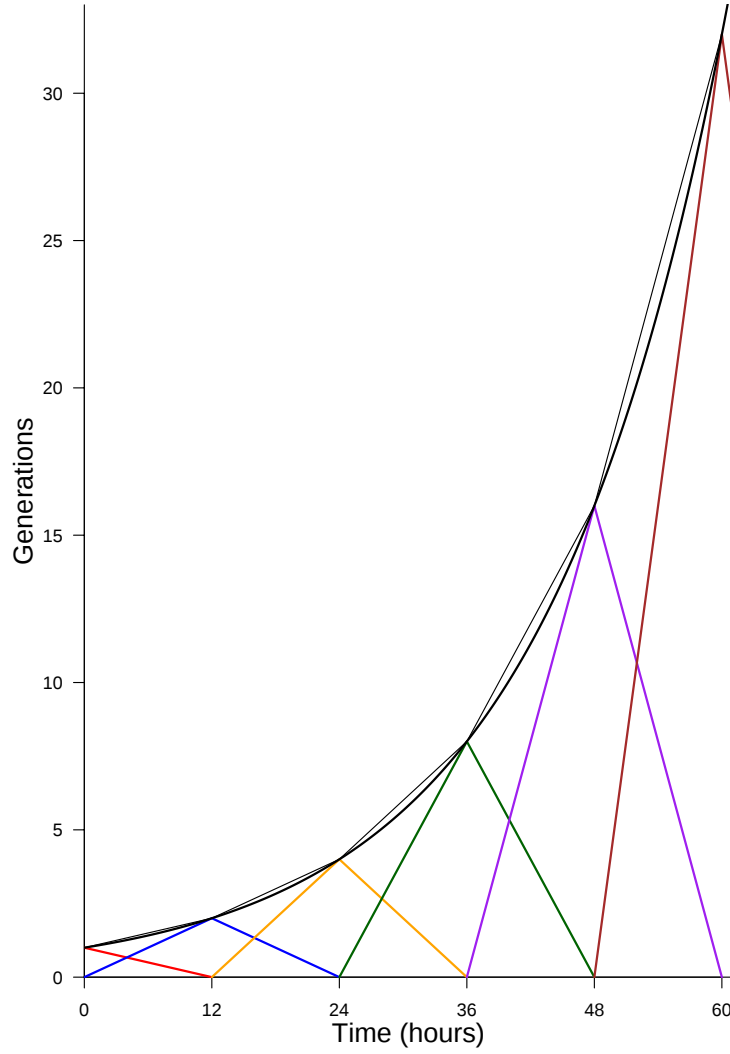


FIGURE 3.8 – **Générations produites par une population de progéniteurs, avec $P_1(0) = 1$** , sous l'hypothèse que le temps de cycle est fixe : $\tau_m = 12$ h. Chaque génération est reportée par une couleur. La courbe noire fine indique la population totale (la somme sur les deux générations présentes à chaque instant. Elle est linéaire par morceau.). La courbe noire épaisse représente l'approximation $\exp(\ln 2 \ t/\tau_m)$ (eq. 3.6).

$$\begin{cases} \frac{dP}{dt} = -\eta P(t) & +2\alpha_{pp}(t)\eta P(t) \\ \frac{dN}{dt} = & +2\alpha_{nn}(t)\eta P(t) \end{cases} \quad (3.9)$$

Cette formulation en équations différentielles peut être lue plus facilement en considérant qu'elle décrit l'évolution des deux populations sur un intervalle de temps dt (infinitésimal) entre t et $t + dt$. Elle donne donc les variations (infinitésimales) de population dP et dN entre ces deux instants :

$$\begin{cases} dP &= -\eta P(t)dt & +2\alpha_{pp}(t)\eta P(t)dt \\ dN &= & +2\alpha_{nn}(t)\eta P(t)dt \end{cases} \quad (3.10)$$

Ces deux équations décrivent donc simplement le bilan des changements entre ces deux instants : la variation dP entre t et $t + dt$ est la somme de ce qui disparaît (compté négativement) et de ce qui apparaît (compté positivement) entre ces deux instants :

- $[\eta P(t)dt]$ est la quantité de progéniteurs qui disparaît du fait des divisions. Elle est donc comptée négativement.
- $\alpha_{pp}(t)[\eta P(t)dt]$ est la fraction de cette quantité qui disparaît par une division de type PP. Comme chaque division de ce type donne deux progéniteurs, il apparaît $2\alpha_{pp}(t)\eta P(t)dt$.

Le même type de bilan est fait pour la variation dN de la population de neurones :

- $\alpha_{nn}(t)[\eta P(t)dt]$ est la quantité de progéniteurs qui disparaît par une division de type NN. Comme chaque division de ce type donne deux neurones, il apparaît $2\alpha_{nn}(t)\eta P(t)dt$.

Pour résumer, le premier terme à droite dans la première équation correspond à la perte de progéniteurs par mitose, et le second terme à droite dans la première équation représente l'accroissement en progéniteurs dû aux divisions PP. La population de neurones s'accroît de la quantité complémentaire.

Balance prolifération / différenciation

Nous posons un paramètre résumant la balance entre la prolifération et la différenciation :

$$\gamma(t) = \alpha_{pp}(t) - \alpha_{nn}(t)$$

La prolifération pure considérée à la section précédente correspond à $\gamma = 1$, et la pure différenciation correspond au cas $\gamma = -1$.

Le système 3.9 peut alors être réécrit comme ² :

$$\begin{cases} \dot{P}(t) = \gamma \eta P(t) \\ \dot{N}(t) = (1 - \gamma) \eta P(t) \end{cases} \quad (3.11)$$

et donc la dynamique est entièrement déterminée par ce paramètre dénotant la balance prolifération/différenciation (pour un taux de division η donné).

Solutions à paramètres constants

Si on considère que la balance γ ne varie pas dans le temps (sur la période d'observation), alors les solutions sont de la forme :

$$\begin{cases} P(t) = P(0)e^{\gamma \eta t} \\ N(t) = N(0) + \int_0^t (1 - \gamma) \eta P(u) du \end{cases} \quad (3.12)$$

soit, en injectant la première dans la seconde :

2. Pour simplifier l'écriture, nous écrirons à partir de maintenant la dérivée temporelle $\frac{dP}{dt}$ sous la forme $\dot{P}(t)$.

$$\begin{cases} P(t) = P(0)e^{\gamma\eta t} \\ N(t) = N(0) + (1-\gamma)\eta P(0) \int_0^t e^{\gamma\eta u} du \end{cases} \quad (3.13)$$

Pour trouver les solutions explicitement, il faut considérer deux cas : $\gamma = 0$ et $\gamma \neq 0$.

Pour $\gamma = 0$, on obtient :

$$\begin{cases} P(t) = P(0) \times 1 \\ N(t) = N(0) + \eta P(0) \int_0^t 1 du \end{cases}$$

et donc

$$\begin{cases} P(t) = P(0) \\ N(t) = N(0) + \eta P(0)t \end{cases} \quad (3.14)$$

Ce cas correspond à $\alpha_{pp} = \alpha_{nn} = 1/2$, c'est-à-dire la moitié des mitoses donnent deux progéniteurs, et l'autre moitié consomme deux progéniteurs. En moyenne, le nombre de progéniteurs reste donc constant. La population de neurones s'accroît linéairement avec le temps.

Pour $\gamma \neq 0$, l'intégrale de la seconde équation donne :

$$\begin{cases} P(t) = P(0)e^{\gamma\eta t} \\ N(t) = N(0) + (1-\gamma)\eta P(0) \left(\frac{1}{\eta\gamma} (e^{\eta\gamma t} - e^{\eta\gamma 0}) \right) \end{cases} \quad (3.15)$$

soit :

$$\begin{cases} P(t) = P(0)e^{\gamma\eta t} \\ N(t) = N(0) + P(0) \frac{1-\gamma}{\gamma} (e^{\eta\gamma t} - 1) \end{cases} \quad (3.16)$$

Dans ce cas, l'évolution du système dépend du signe de γ . Pour $\gamma > 0$, on a plus de divisions PP que de divisions NN, de sorte que les deux populations vont croître exponentiellement (avec des temps caractéristiques qui dépendent de γ). Pour $\gamma < 0$, on a plus de divisions NN que de divisions PP, de sorte que la population de progéniteurs finira par s'éteindre, et la quantité de neurones produites dépendra de γ .

Dynamique avec balance prolifération/différenciation évoluant dans le temps

Si la balance change au cours du temps, la dynamique des deux populations dépend de la forme de cette évolution et on ne peut rien résoudre sans avoir fixé cette forme.

3.4.3 Modèle avec mode de division asymétrique : le scénario PN

Nous ajoutons maintenant un mode de division supplémentaire : la division neurogénique asymétrique où le progéniteur donne un progéniteur et un neurone (avec une probabilité α_{pn}). De ce fait, le bilan devient :

$$\begin{cases} \dot{P}(t) = -\eta P(t) & +2\alpha_{pp}\eta P(t) + 1\alpha_{pn}\eta P(t) \\ \dot{N}(t) = & +2\alpha_{nn}\eta P(t) + 1\alpha_{pn}\eta P(t) \end{cases} \quad (3.17)$$

Nous appellerons ci-après ce modèle à trois modes de division le modèle PN.

Impact du mode de division asymétrique

En factorisant les termes η et $P(t)$, on obtient :

$$\begin{cases} \dot{P}(t) = (-1 + 2\alpha_{pp} + \alpha_{pn})\eta P(t) \\ \dot{N}(t) = (\alpha_{pn} + 2\alpha_{nn})\eta P(t) \end{cases} \quad (3.18)$$

Par rapport au modèle avec deux modes de division (PP et NN), il s'avère en fait que l'introduction de la division asymétrique est neutre sur l'évolution des deux populations de progéniteurs et de neurones, puisque :

$$\alpha_{pp} + \alpha_{pn} + \alpha_{nn} = 1 \implies -1 + 2\alpha_{pp} + \alpha_{pn} = \alpha_{pp} - \alpha_{nn} = \gamma \quad (3.19)$$

et

$$\alpha_{pp} + \alpha_{pn} + \alpha_{nn} = 1 \implies \alpha_{pn} + 2\alpha_{nn} = 1 - (\alpha_{pp} - \alpha_{nn}) = 1 - \gamma \quad (3.20)$$

L'évolution des deux populations est donc simplement pilotée par :

$$\begin{cases} \dot{P}(t) = \gamma\eta P(t) \\ \dot{N}(t) = (1 - \gamma)\eta P(t) \end{cases} \quad (3.21)$$

qui est identique au système d'équations pour le modèle à deux modes de division. Les solutions analytiques sont donc les mêmes.

La dynamique du système à trois modes de division est donc exactement la même que celle à deux modes de divisions, seule compte la balance prolifération / différenciation γ . On trouve là une illustration qu'un même modèle à l'échelle de la population peut correspondre à des modèles très différents en termes de comportements à l'échelle cellulaire. Les valeurs observables expérimentalement pour α_{pp} et α_{nn} peuvent dépendre du modèle, mais seule leur différence importe pour la dynamique. A l'échelle des populations, les deux modèles sont indistinguables. Du point de vue expérimental, cela implique qu'on ne peut pas déterminer l'existence du mode de division asymétrique si on n'observe que les évolutions des populations de progéniteurs et de neurones : il faut, pour cela, caractériser les modes de division indépendamment des marquages progéniteurs / neurones.

3.5 Estimation des paramètres du modèle

On peut résoudre analytiquement le modèle en se donnant une condition initiale et un jeu de paramètres. Sous les hypothèses introduites plus haut (modes de divisions fixe et taux de division fixe et commun), les mesures expérimentales contraignent complètement le jeu de paramètres (il n'y a pas de paramètres libres qu'on pourrait ajuster pour obtenir la meilleure adéquation entre les prédictions du modèle et les mesures). Le modèle a donc été utilisé pour tester la consistance logique (sous l'hypothèse du modèle) des deux types de mesures obtenues expérimentalement (modes de division d'une part, fractions progéniteurs / neurones d'autre part).

Comme le mode de division asymétrique est neutre sur l'évolution des populations, le premier point a été de déterminer l'ensemble des combinaisons de modes de division (c'est-à-dire les triplets $(\alpha_{pp}, \alpha_{pn}, \alpha_{nn})$ compatibles avec les fractions progéniteurs/neurones mesurées à 24h et 48h après électroporation. Considérant pour chaque condition expérimentale (contrôle, CDC25B et CDC25B^{ΔCDK}) et pour chaque zone (ventrale / dorsale) les mesures de ces fractions et leur intervalle de confiance, nous avons déterminé les intervalles de confiance pour ces triplets (voir l'Appendix 4 de l'article 7.2). Pour les trois séries de mesures dans la zone ventrale, les mesures expérimentales des modes de division sont en parfait accord avec ces intervalles de confiance prédits par le modèle. Pour la zone dorsale, seule la mesure contrôle est compatible avec les prédictions.

Complémentairement, le modèle a été utilisé pour dériver les prédictions des fractions progéniteurs / neurones à 48h, à partir des fractions mesurées à 24h et des mesures de mode de divisions (Fig. 3.7B). On retrouve le parfait accord entre prédictions et mesures pour la zone ventrale, et le désaccord pour les surexpressions dans la zone dorsale (où le modèle prédit des fractions de neurones supérieures à celles observées).

L'accord quantitatif pour les trois conditions expérimentales (contrôle, et sur-expression de CDC25B et de sa forme mutée) dans la zone ventrale a été une (bonne) surprise : il indique que le modèle simple est suffisamment puissant pour capturer l'essentiel de la dynamique (au moins dans la zone ventrale et la courte période considérée). C'est la première fois qu'un modèle rend compte de la dynamique dans la zone ventrale *sans ajustement de paramètres libres*.

Le désaccord pour les expériences de sur-expression dans la zone dorsale est, de son côté, tout aussi intéressant : il pourrait indiquer qu'il manque une composante au modèle, ou que l'une des hypothèses est inadéquate (des hypothèses biologiques sont suggérées dans la partie Discussion de l'article 7.2).

3.6 Interprétation des données sous l'éclairage du modèle

3.6.1 Progéniteurs hétérogènes avec durées de cycle spécifiques au mode de division

Un point important que le modèle a permis d'éclairer est que la dynamique des populations observée et formalisée est en fait compatible avec deux modèles de comportement à l'échelle cellulaire (les deux modèles comprenant les trois modes de division). Le premier modèle (qu'on a utilisé jusqu'ici pour construire le modèle PN) est de considérer que tous les progéniteurs sont homogènes en termes de temps de cycle, et que leur mode de division est distribué de façon aléatoire à la fin du cycle : on considère donc que le temps de cycle est identique pour tous les progéniteurs et que le choix du mode

de division à l'issue du cycle est stochastique à l'échelle cellulaire. Une autre façon d'interpréter le modèle en population est de considérer que la population de progéniteurs est en fait constituée de trois populations hétérogènes, chacune effectuant un mode de division et un seul (de façon déterministe, donc) à la fin d'un temps de cycle qui dépend lui, en revanche, du mode de division : on considère donc là que le choix du mode de division est déterministe, et que le temps de cycle dépend de celui-ci. Dans ce dernier cas, la distribution expérimentale des modes de divisions contraint complètement les temps de cycle associés à chaque mode de division (une présentation détaillée est donnée dans l'Appendix 3 de l'article 7.2). L'explicitation de ce modèle alternatif nous a permis d'exclure ce scénario parce qu'il impliquerait des temps de cycle très longs (irréalistes) pour les modes de division les moins représentés (par exemple 172h pour les divisions NN).

3.6.2 Evolution des densités vs. évolution des fractions

Le modèle a permis, par ailleurs, de faire le lien entre les observables sur les populations et les grandeurs sous-jacentes explicitées dans le modèle. En effet, expérimentalement, seules les fractions progéniteurs / neurones sont observables et non les effectifs de chaque population parce que la méthode de marquage par électroporation ne garantit pas que toutes les cellules soient marquées : on ne peut donc observer que les fractions de progéniteurs et de neurones parmi les cellules effectivement électroporées. Sous l'hypothèse du modèle en revanche, ce sont bien les effectifs des populations qui peuvent être calculés (par progéniteur initialement présent, Fig. 3.7C) et les fractions prédites (Fig. 3.7B) ont été déduites de ces effectifs.

En promouvant les divisions de type neurogéniques (PN ou NN), la surexpression de CDC25B a deux conséquences opposées : elle promeut la production de neurones à partir des progéniteurs présents, mais, ce faisant, elle diminue l'augmentation du nombre de progéniteurs susceptibles de produire des neurones par la suite. Elle est donc neurogénique à court terme, et anti-neurogénique à long terme.

Quand on observe expérimentalement une augmentation de la proportion de neurones sous l'effet d'une sur-expression de CDC25B, cela peut donc résulter de deux tendances : une augmentation plus rapide de la population de neurones (par rapport au contrôle) sans que l'évolution de la population de progéniteurs change beaucoup (et d'autant moins que les divisions promues sont de type PN), ou une augmentation de la population de neurones identique au contrôle et une diminution de la population de progéniteurs (et d'autant plus que les divisions promues sont de type NN).

Les évolutions en effectifs reportées sur la figure 3.7C montrent un effet différent de la surexpression de CDC25B selon la zone considérée. Dans la zone ventrale, l'évolution de la population de neurones est à peu près inchangée par la surexpression de CDC25B alors qu'on a bien plus de divisions de type NN et que la fraction de neurones augmente fortement sur les 24h : c'est en fait surtout la prolifération des progéniteurs qui est affectée (jusqu'à faire décroître la population de progéniteurs). Dans la zone dorsale, la population de progéniteurs continue à croître (bien que plus lentement), et l'augmentation de la population de neurones est dans ce cas augmentée par rapport au contrôle. Il faut considérer que les deux zones ne sont pas dans le même état en termes de balance prolifération / différenciation au moment de l'observation, la zone dorsale étant plus proliférative (plus précoce dans le processus de différenciation) que la zone ventrale. L'effet de la sur-expression sur la dynamique est donc différent selon l'état de la balance prolifération / différenciation au moment où l'électroporation

est effectuée. On notera en particulier qu'il aurait été raisonnable de tester l'effet neurogénique de CDC25B en décidant de ne suivre expérimentalement que l'effectif de la population de neurones (un effet neurogénique prédisant *a priori* une sur-augmentation de cette population par rapport au contrôle) : les prédictions du modèle montrent qu'à ce stade dans la zone ventrale, la promotion des divisions neurogéniques par la surexpression de CDC25B n'affecte pas la quantité de neurones produite sur la période de temps d'observation. En ne regardant que les évolutions des populations (en l'absence d'observation sur la répartition des modes de division), l'interprétation des données aurait donc suggéré une absence d'effet neurogénique de la sur-expression de CDC25B dans la zone ventrale...

3.6.3 Sensibilité sur les prédictions

Le modèle donne des prédictions incorrectes dans la zone dorsale, ce qui suggère d'incorporer des hypothèses supplémentaires ou de modifier les hypothèses faites sur les temps de cycle et la stationarité des modes de division. Avant de modifier la structure du modèle cependant, le modèle en l'état peut être utilisé pour estimer la sensibilité des prédictions aux paramètres. En particulier, la fraction de neurones prédite à 48h après électroporation, $f_N(48)$, ne dépend que de deux paramètres : la balance prolifération / différenciation γ , et la fréquence de division η selon :

$$f_N(48) = \frac{\left[f_N(24) + (1 - f_N(24)) \frac{1-\gamma}{\gamma} (e^{24\eta\gamma} - 1) \right]}{\left[f_N(24) + (1 - f_N(24)) \frac{1-\gamma}{\gamma} (e^{24\eta\gamma} - 1) \right] + \left[(1 - f_N(24)) e^{24\eta\gamma} \right]} \quad (3.22)$$

où $f_N(24)$ est la fraction de neurones à 24h (l'établissement de cette formule est donnée au début de l'Appendix 4 de l'article).

Comme la zone dorsale est à ce stade dans un mode fortement prolifératif, la prédiction est plus sensible au paramètre γ que pour la zone ventrale où la différenciation a déjà bien commencé. Cette sensibilité est illustrée Fig. 3.9, qui reporte la prédiction (point noir) pour le cas de la surexpression de CDC25B dans la zone dorsale (où la prédiction est 0.53 alors que la limite supérieure de l'intervalle de confiance de la fraction observée est 0.43). Si on impose la valeur observée pour γ (0.27), la fraction de neurones observée est compatible avec un temps de cycle de 20h (ce qui est beaucoup). Si on impose un temps de cycle de 12h, la fraction de neurones observée est compatible avec une valeur de $\gamma = 0.44$ (assez éloignée de 0.27). La sensibilité croisée aux deux paramètres indique cependant une compatibilité de la fraction de neurones observée avec un couple $\gamma = 0.35$ et un temps de division de 16h (point rouge). Un temps de division de 16h n'étant pas incompatible avec les informations connues sur les temps de cycle (qui tendent à être plus longs dans la phase proliférative, comme dans la zone dorsale à ce stade), la valeur de $\gamma = 0.35$ (plutôt que 0.27) correspondrait à un écart positif de α_{pp} de 0.04 points de pourcentage par rapport à la valeur mesurée (de 0.38 à 0.42) et, corrélativement, à un écart négatif de α_{nn} (de 0.11 à 0.07), de sorte que la différence entre les deux augmente des 0.08 points de pourcentage manquants. Ces écarts s'avérant de fait assez faibles, l'étude de sensibilité suggère donc de conforter le jeu de données avant de rejeter le modèle simple et d'envisager des mécanismes supplémentaires à y introduire...

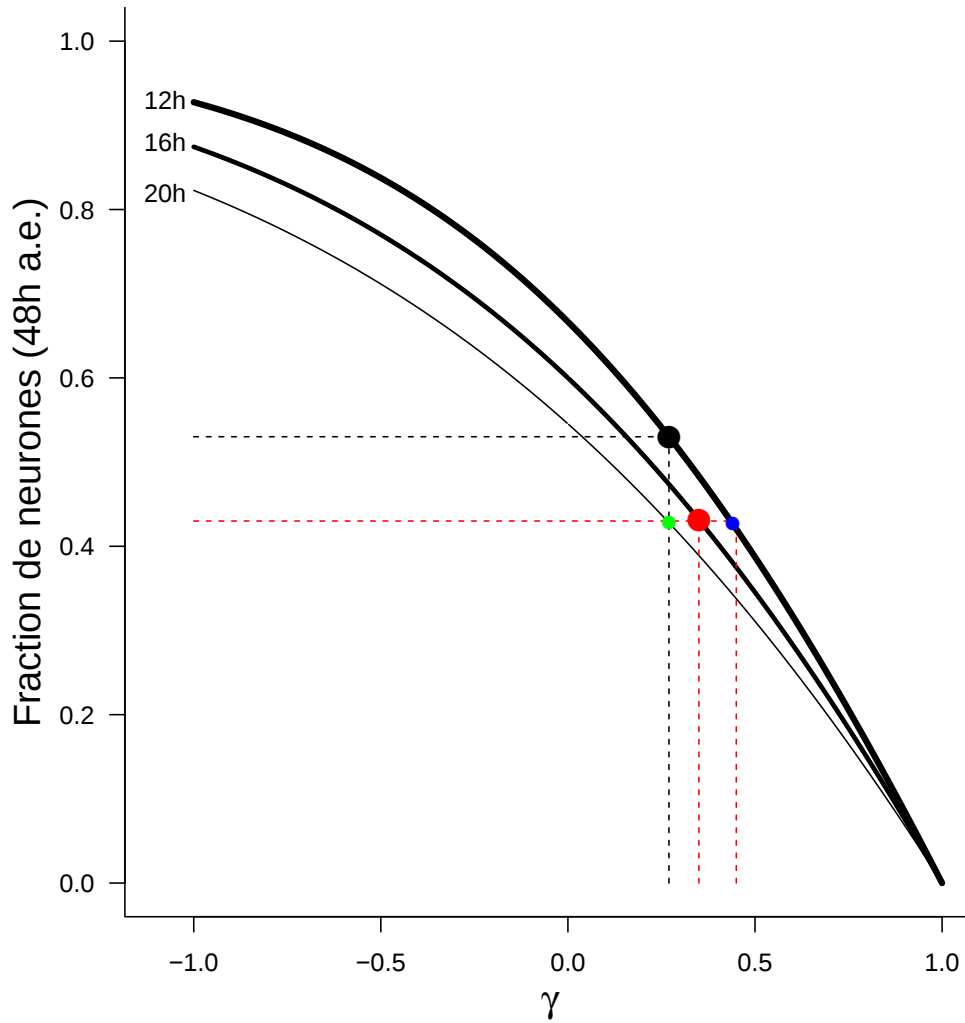


FIGURE 3.9 – Sensibilité de la fraction de neurones prédite à 48h en fonction de γ et η . La courbe noire la plus épaisse reporte la prédiction en fonction de γ pour un temps de division de 12h, la courbe noire fine pour 20h, et la courbe intermédiaire pour 16h. La valeur observée de $\gamma = 0.27$ donne la fraction prédite 0.53 (point noir) alors que la limite supérieure pour la valeur observée est 0.43 (ligne pointillée horizontale rouge). Cette valeur est compatible avec la valeur observée de γ mais un temps de division de 20h (point vert), avec un temps de division de 12h mais avec $\gamma = 0.44$ (point bleu), et avec un couple $\gamma = 0.35$ / temps de division de 16h (point rouge).

3.7 Conclusions

Ce premier travail de modélisation de la dynamique des populations progéniteurs / neurones dans la moelle épinière a été conduit dans un dialogue quotidien avec les embryologistes. Une phase très importante de ce type de travail est de fixer le vocabulaire pour faire l'explicitation complète du modèle, qui seule permet sa formalisation. En retenant les hypothèses les plus simples, le modèle permet de s'assurer de la consistance des données, d'étudier la sensibilité aux paramètres, d'éclairer les principaux aspects de la dynamique et de soutenir l'interprétation des effets de la manipulation expérimentale.

Pour ce premier travail de modélisation, nous avons commencé par adopter un modèle de dyna-

mique des populations progéniteurs/neurones le plus simple possible étant donnée la description qualitative exprimée par les embryologistes. La modélisation est donc utilisée ici pour confronter ce modèle aux données, en le formalisant avec le moins d'hypothèses *ad hoc* : nous considérons que les modes de division sont stables pendant la période expérimentale de 24h, et que le temps entre deux divisions est fixe et commun à toutes les cellules (estimé à 12h à l'échelle de la population).

En considérant les modes de division constants sur la période d'observation, ce premier modèle est cependant limité dans son pouvoir de prédiction et d'interprétation. Il faut bien en effet que la balance prolifération / différenciation évolue au cours du temps. Nous allons donc considérer dans le chapitre suivant l'extension de ce modèle à toute la durée du processus.

Chapitre 4

Proposition 1 : Restriction des modes de division

4.1 Extension du modèle PN à l'ensemble du processus

Nous reprenons le modèle PN présenté au chapitre précédent et nous l'étendons à toute la durée du processus.

Rappelons que nous considérons une population de progéniteurs tous identiques, et qui peuvent faire trois types de division : $P \rightarrow (P, P)$, $P \rightarrow (P, N)$ et $P \rightarrow (N, N)$ avec les probabilités respectivement α_{pp} , α_{pn} et α_{nn} .

Nous avons établi son équation d'évolution au chapitre précédent pour une distribution figée des modes de division et cette évolution est déterminée par $\gamma = \alpha_{pp} - \alpha_{nn}$ pour un taux de division η fixé.

Nous la reportons ici en explicitant que γ est maintenant une fonction du temps (à ce stade, nous négligeons la variation du taux de division η au cours du temps) :

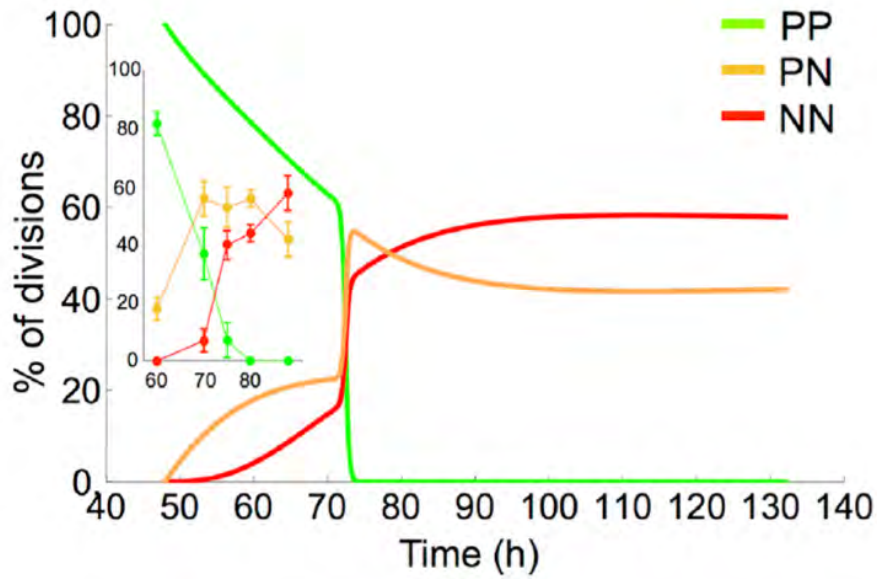
$$\begin{cases} \dot{P}(t) = \gamma(t)\eta P(t) \\ \dot{N}(t) = (1 - \gamma(t))\eta P(t) \end{cases} \quad (4.1)$$

Pour étendre le modèle sur la durée du processus, nous avons utilisé les données publiées par le groupe d'E. Marti [58] qui a mesuré la distribution des modes de divisions à différents stades du processus, ainsi que l'évolution des populations de progéniteurs et de neurones.

L'article [58] contient une interprétation des données par un modèle de l'évolution des modes de division montrant un changement abrupt (*a sharp transition, a switch*) autour de 73 hpf sous l'induction de la voie Shh (voir figure ci-dessous).

Cette interprétation nous semble incorrecte au vu des données (rappelées dans leur inset). De plus, du fait de la chute brutale de la prolifération à cet instant, leur modèle ne peut redonner une évolution quantitative des deux populations qu'en ajoutant un terme source.

Ce dernier permettant d'ajuster à volonté une augmentation artificielle de la population de progéniteurs, leur modèle n'est donc pas contraint par les données.



Modèle de Saade et al. pour les modes de division (tirée de [58], fig. 3d). Le graphique principal rapporte leur proposition de modèle pour l'évolution des modes de division PP, PN et NN. Ce modèle met en avant une transition brutale au temps 73 hpf. La sous-figure montre les points de données.

Nous avons repris ces données sur les modes de division, et nous avons simplement ajusté une forme fonctionnelle pour l'évolution de $\alpha_{pp}(t)$ et $\alpha_{nn}(t)$ (en utilisant des tanh pour les divisions PP et NN, Fig. 4.1a)). En incorporant ces formes fonctionnelles dans le système 4.1, nous montrons qu'on retrouve une dynamique très proche de celle observée sur les deux populations (Fig. 4.1c). Le modèle PN étendu à l'ensemble du processus montre donc qu'un changement abrupt des modes de division à l'échelle des populations n'est pas du tout nécessaire pour interpréter leurs données.

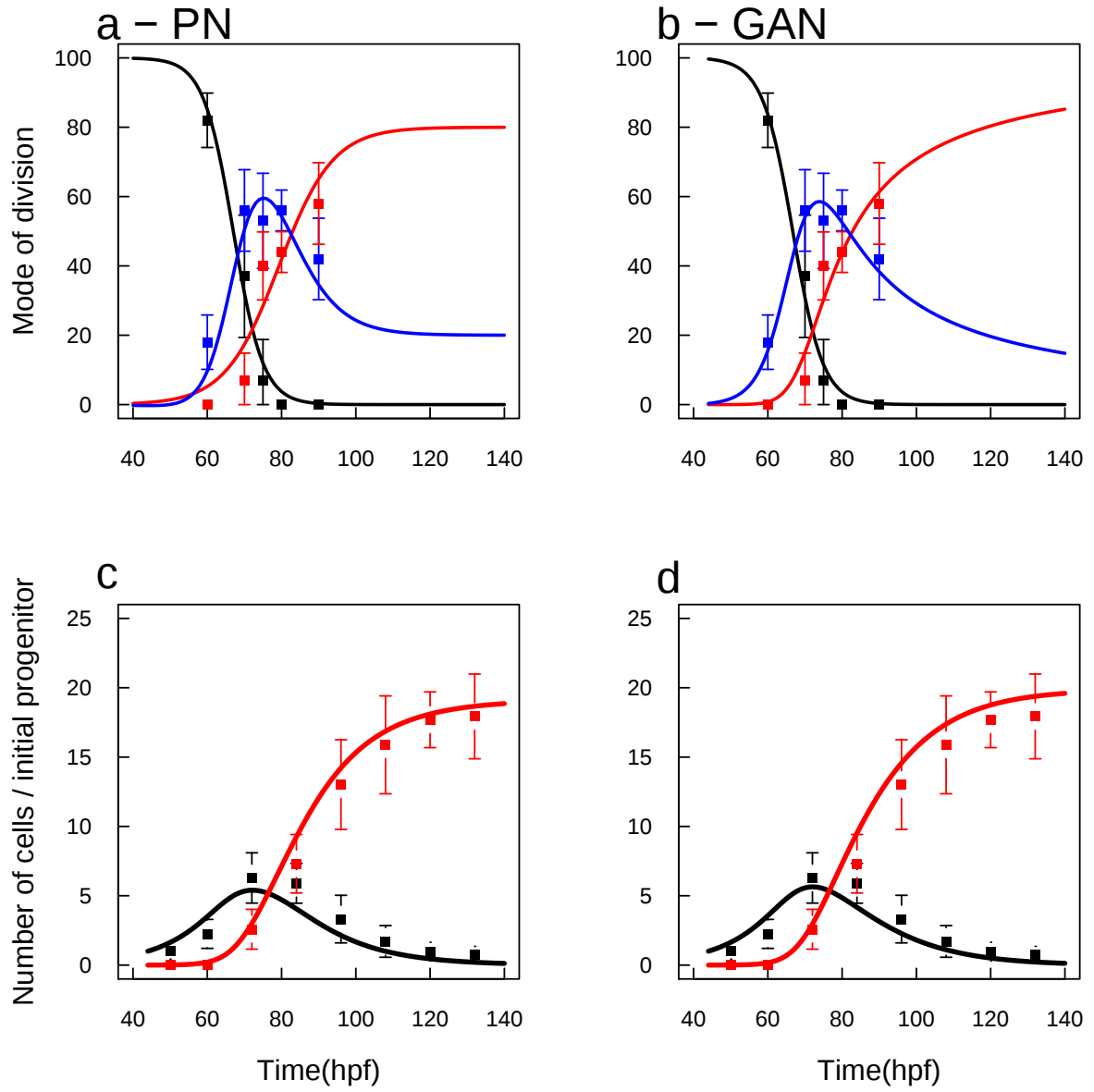


FIGURE 4.1 – Modèles PN et GAN. A gauche, le modèle PN avec en a) les formes fonctionnelles ajustées aux données sur les modes de division (noir :PP, bleu :PN, rouge :NN), et en c) les évolutions prédites pour les progéniteurs (courbe noire) et les neurones (courbe rouge). Les points sont les données rapportées par [58]. A droite, le modèle GAN avec en b) les profils observables des modes de division (reconstruits à partir de la dynamique reportée fig. 4.2.2), et en d) la prédiction pour l'évolution des deux populations.

4.2 Hypothèse d'une restriction des modes de division

A ce stade, nous remettons au premier plan la différence entre un modèle énoncé à l'échelle des populations et un modèle énoncé à l'échelle cellulaire. Le modèle PN est énoncé à l'échelle des populations, et l'évolution des modes de division incorporée dans le système 4.1 est le reflet des mesures effectuées à l'échelle de la population de progéniteurs. Le modèle PN est en fait un modèle qui fait le lien entre des *données* observées à l'échelle des populations, et ses variables sont les reflets directs de ces données.

Dans le modèle PN, nous observons une dynamique non monotone des divisions $P \rightarrow (P, N)$, qui appelle des mécanismes compliqués en terme de dynamique intra-cellulaire.

Nous explorons maintenant un modèle alternatif où nous considérons que cette évolution non monotone des divisions asymétriques observables pourrait en fait émerger d'une dynamique sous-jacente (non observable en l'état des outils expérimentaux à disposition) où les progéniteurs sont en fait constitués de deux types cellulaires ayant des comportements différents.

Nous considérons à l'échelle cellulaire qu'un progéniteur issu d'une division asymétrique ($P \rightarrow (P, N)$) ne peut pas refaire par la suite une division purement proliférative ($P \rightarrow (P, P)$). Formellement, cela se traduit par l'existence de deux populations de progéniteurs, où les "P" issus d'une division PN deviennent de type "A", et ne peuvent plus faire que des divisions de type AN ou NN. Nous utiliserons la lettre "G" pour nommer les progéniteurs qui gardent le pouvoir de proliférer afin d'éviter les confusions avec la variable P du modèle PN, et nous avons toujours $P(t) = G(t) + A(t)$.

4.2.1 Les trois scénarios possibles

Nous avons exploré trois modes comportementaux compatibles avec cette restriction des modes de divisions.

Dans les trois scénarios, les progéniteurs de type A peuvent se diviser pour donner un neurone et un progéniteur de type A ou deux neurones (ils ne peuvent donc proliférer).

Dans les trois scénarios, les progéniteurs de type G peuvent proliférer par une division symétrique donnant deux progéniteurs G.

Les scénarios se distinguent par le mode alternatif de division pour les progéniteurs G :

1. Modèle GAA : $G \rightarrow (G, G)$, $G \rightarrow (A, A)$, $A \rightarrow (A, N)$, $A \rightarrow (N, N)$

Le mode alternatif pour les progéniteurs de type G est de se diviser en deux progéniteurs de type A.

2. Modèle GAG : $G \rightarrow (G, G)$, $G \rightarrow (A, G)$, $A \rightarrow (A, N)$, $A \rightarrow (N, N)$

Le mode alternatif pour les progéniteurs de type G est de se diviser pour donner un progéniteur de type G et un progéniteur de type A.

3. Modèle GAN : $G \rightarrow (G, G)$, $G \rightarrow (A, N)$, $A \rightarrow (A, N)$, $A \rightarrow (N, N)$

Le mode alternatif pour les progéniteurs de type G est de se diviser pour donner un progéniteur de type A et un neurone.

Nous avons caractérisé complètement ces trois modèles, et évalué leur pertinence.

Le modèle GAG s'est avéré structurellement incompatible avec les observations.

Le modèle GAA apparaît structurellement compatible avec les données, mais donne des prédictions moins proches des données que le modèle GAN.

Nous retenons donc le modèle GAN comme notre proposition principale.

Pour garder le fil de la présentation, nous choisissons de présenter ici seulement les résultats obtenus pour ce modèle GAN. L'ensemble de l'exploration des trois modèles est rapportée, avec ses résultats et ses détails techniques, sous forme d'un [Article : Timing the spinal cord development with neural progenitor cells losing their proliferative capacity : a theoretical analysis](#), Azaïs et al. , en révision à *Neural Dev.* 2019.

4.2.2 Le scénario GAN

Les deux comportements sont donc :

pour les progéniteurs de type G $G \rightarrow (G, G)$ ou $G \rightarrow (A, N)$

pour les progéniteurs de type A $A \rightarrow (A, N)$ ou $A \rightarrow (N, N)$

Sous l'hypothèse de cette différenciation comportementale, l'équation d'évolution du modèle GAN est donnée par :

$$\left\{ \begin{array}{l} \dot{G}(t) = \eta [-G(t) + 2\alpha_{GGG}(t)G(t)] \\ \dot{A}(t) = \eta [-A(t) + \alpha_{GAN}(t)G(t) + \alpha_{AAN}(t)A(t)] \\ \dot{N}(t) = \eta [\alpha_{GAN}(t)G(t) + 2\alpha_{ANN}(t)A(t) + \alpha_{AAN}(t)A(t)] \\ \alpha_{GGG}(t) + \alpha_{GAN}(t) = 1 ; \alpha_{AAN}(t) + \alpha_{ANN}(t) = 1 \end{array} \right. \quad (4.2)$$

où les modes de division sont maintenant indicés par le type comportemental d'origine et le type de division effectué (α_{GGG} indique par exemple un progéniteur de type G effectuant une division de type $G \rightarrow (G, G)$).

On peut, par ailleurs, reconstruire les descripteurs du modèle PN à partir des descripteurs du modèle GAN par :

$$\left\{ \begin{array}{l} P(t) = G(t) + A(t), \quad (N_{GAN}(t) = N_{PN}(t) = N(t)) \\ \alpha_{pp}(t) = \alpha_{GGG}(t) \frac{G(t)}{G(t) + A(t)} \\ \alpha_{pn}(t) = \alpha_{GAN}(t) \frac{G(t)}{G(t) + A(t)} + \alpha_{AAN}(t) \frac{A(t)}{G(t) + A(t)} \\ \alpha_{nn}(t) = \alpha_{ANN}(t) \frac{A(t)}{G(t) + A(t)} \end{array} \right. \quad (4.3)$$

On voit alors que l'évolution du mode de division asymétrique observable $\alpha_{pn}(t)$ peut se comprendre comme un mélange des divisions asymétriques par les G et des divisions asymétriques par les A, pondéré par les fractions relatives des deux populations.

Il est, de plus, possible d'inverser ce système 4.3, c'est-à-dire de contraindre complètement les évolutions des modes de division du modèle GAN à partir des modes de division du modèle PN, c'est-à-dire à partir des données d'observation. Cette inversion donne alors l'évolution des modes de division dans le modèle GAN (Fig. 4.2.2a) compatibles avec les modes de divisions observés (Fig. 4.1b). On peut alors utiliser le système 4.2 pour reconstruire numériquement les évolutions des trois populations G, A et N. L'évolution prédite pour les deux populations observables $P(t) = G(t) + A(t)$ et $N(t)$ est parfaitement compatible avec les données (Fig. 4.2.2b et Fig. 4.1d).

Une caractéristique remarquable du modèle GAN est que l'évolution des modes de division est monotone, de forme simple et pratiquement identique pour les progéniteurs des deux types (Fig. 4.2.2a).

En termes de contrôle, ce modèle appelle donc simplement un unique mécanisme pour assurer la transition vers des divisions neurogéniques (de $G \rightarrow (G, G)$ vers $G \rightarrow (A, N)$ pour les progéniteurs de type G, et de $A \rightarrow (A, N)$ vers $A \rightarrow (N, N)$ pour les progéniteurs de type A).

On peut également comprendre ce scénario à l'échelle cellulaire. Si l'on regarde une lignée cellulaire issue d'un premier progéniteur, ce scénario indique que les cellules filles perdent les unes après les autres leur pouvoir prolifératif : une fois engagée dans un mode neurogénique, une branche de la lignée ne peut que continuer dans le mode neurogénique (AN ou NN). On retrouve donc l'existence d'un mécanisme de *switch*, mais à l'échelle cellulaire. Ces *switches* successifs à l'échelle cellulaire se traduisent, via le système 4.3 et la dynamique 4.2, par les évolutions lentes observées des modes de division à l'échelle de la population (fig. 4.1b où ces évolutions des modes de division sont reconstruites à partir des évolutions montrées fig. 4.2.2a et b).

Enfin, ce modèle GAN appelle une interprétation plus simple des expériences de gains de fonction de CDC25b : le gain de fonction de la phosphatase non modifiée (Fig. 4.2.2c et d) a pour effet de faire advenir plus tôt la transition neurogénique dans les deux populations de progéniteurs (c'est-à-dire de favoriser les *switches* à l'échelle cellulaire). Le gain de fonction avec la phosphatase modifiée Δ CDK (Fig. 4.2.2e et f) n'affecterait pas le comportement des progéniteurs G, et aurait pour effet de retarder seulement les *switches* des progéniteurs de type A vers la division terminale NN.

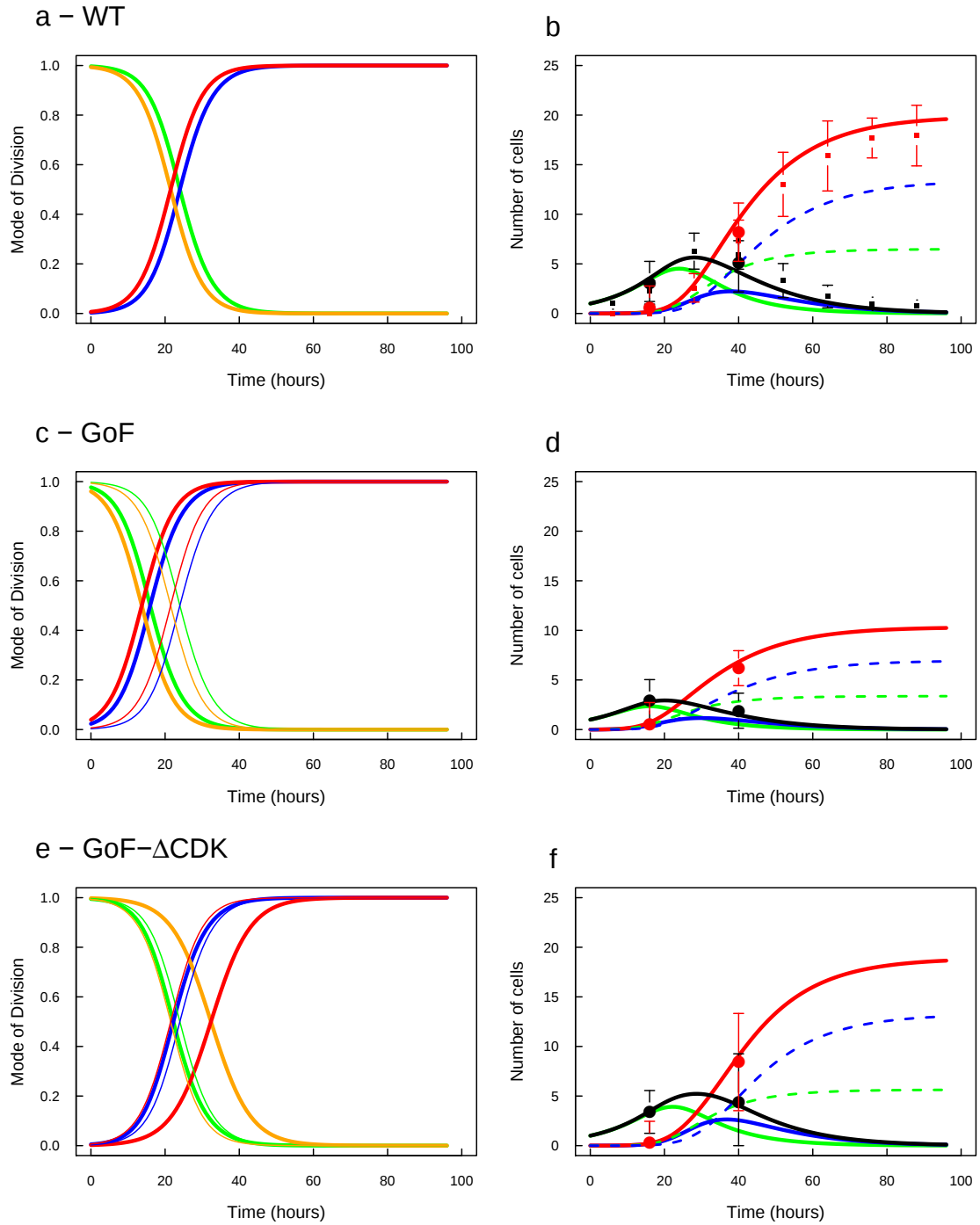


FIGURE 4.2 – Modèle GAN et expériences de gains de fonction.

A gauche : évolution des modes de divisions reconstruits par inversion du système 4.3 (vert : $G \rightarrow (G, G)$, orange : $A \rightarrow (A, N)$ et leurs compléments respectifs : bleu : $G \rightarrow (A, N)$, rouge : $A \rightarrow (N, N)$). Ces évolutions sont reconstruites pour les trois conditions expérimentales du chapitre 3 : WT : wild type (contrôle) ; GoF : gain de fonction en CDC25B non modifiée ; GoF- Δ CDK : gain de fonction en CDC25B modifiée. Les lignes fines en c et e sont les rappels des profils montrés en a, pour comparaison.

A droite : évolutions prédites pour les trois populations (vert : $G(t)$, bleu : $A(t)$, noir : $G(t) + A(t)$, rouge : $N(t)$, les points sont les données). Les lignes pointillées indiquent l'origine des neurones : en vert, le pool de neurones issus de divisions $G \rightarrow (A, N)$, et en bleu, le pool de neurones issus de divisions $A \rightarrow (A, N)$.

L'origine des temps correspond à 44 hpf.

Chapitre 5

Proposition 2 : L'état du système comme stimulus du changement comportemental

Dans les propositions de modèle énoncées dans les chapitres précédents, nous avons considéré que l'évolution de la balance prolifération / différenciation était imposée "de l'extérieur du système" constitué par les deux populations (progéniteurs et neurones).

Deux grandes pistes biologiques sont évoquées pour rendre compte de cette régulation temporelle des modes de divisions.

La première repose sur une régulation intrinsèque à chaque progéniteur. Dans ce cas, nous considérons que chaque progéniteur a sa propre horloge interne, et que le programme génétique change l'expression des gènes au cours des générations, ce qui influe sur le mode de division. Sous cette hypothèse générale, le mode de division évolue intrinsèquement et indépendamment de l'environnement de la cellule. Une telle approche considère que cette évolution est programmée intrinsèquement dans le programme génétique de chaque cellule, et que ce programme se déroule indépendamment du nombre de progéniteurs et de neurones présents. Ce mécanisme pourrait manquer de robustesse si le système est perturbé. Cette hypothèse implique aussi qu'il faut définir un temps absolu sur lequel régler l'horloge interne.

La deuxième repose sur une régulation de cette évolution par le système lui-même. En effet, dans les systèmes qui sont fortement contrôlés comme la morphogenèse de la moelle épinière, l'existence de voies de signalisation par des morphogènes, tel que Shh, suggère une régulation de l'évolution des modes de division par l'environnement. La régulation du destin individuel par l'environnement implique l'existence de paramètres de couplage entre la population et l'individu (ici la cellule).

La question qui se pose à ce stade est donc d'explorer les possibilités d'incorporer dans le système un mécanisme pour cette évolution, c'est-à-dire un contrôle de cette évolution par l'état du système.

Dans le présent chapitre, nous explorons, par la modélisation, les différentes possibilités de couplage où l'évolution du mode de division est pilotée par l'état du système à chaque instant. Pour cela, nous partons des mesures à l'échelle des populations, et nous explorons les couplages possibles sous la forme d'un rétro-contrôle de la population sur la pondération entre modes de division.

A l'échelle cellulaire, cela correspondrait à un pilotage de la probabilité de choisir un mode de division sous l'influence d'une voie de signalisation correspondant à ce rétro-contrôle.

En introduisant un couplage entre les paramètres et les observables, notre système va devenir non-linéaire. Ce type de dynamique où les paramètres contrôlant la dynamique des populations sont

sous le contrôle de l'état du système peut être favorable à la robustesse du processus. Cette robustesse dépend de la sensibilité aux paramètres de couplage ainsi qu'aux conditions initiales.

Du point de vue de l'implémentation biologique, ce couplage peut reposer sur un gradient de morphogène produit par certaines cellules, par contact avec d'autres cellules, ou encore par des effets plus "mécaniques" de type forces de compression ou encombrement. Indépendamment du mécanisme de son implémentation biologique, un tel système de rétro-contrôle peut se modéliser à l'échelle de la population. Le choix de modélisation porte alors sur le couplage que l'on décide d'introduire entre les paramètres et nos variables d'états.

Notre démarche part des données expérimentales (les dynamiques des populations, et les dynamiques des paramètres). Dans un premier temps, nous cherchons des formes analytiques ajustées aux données, de sorte à manipuler des fonctions du temps plutôt que des séries de données à intervalles de temps discrets. Dans un second temps, nous formulons le système d'équations différentielles correspondant à un modèle sans couplage, pour vérifier la cohérence entre l'évolution des paramètres et l'évolution des populations. Nous obtenons des fonctions du temps pour les paramètres et pour les observables. Dans un troisième temps, nous cherchons les formes de couplage possibles qui permettent de retrouver la dynamique des observables sans imposer de l'extérieur l'évolution des paramètres. Pour cela, nous examinons les évolutions des paramètres en fonction des observables (et de sommes des observables), nous en déduisons une dépendance fonctionnelle, nous introduisons cette dépendance fonctionnelle dans le système d'équations différentielles (qui devient donc non linéaire), et nous résolvons le système pour confronter sa dynamique prédite à la dynamique observée. En testant systématiquement tous les couplages possibles, cela permet de faire le tri entre les couplages pertinents et les couplages qui ne marchent pas. La modélisation est donc utilisée ici pour gagner en clarté sur l'ensemble des possibles.

5.1 Exposé de la démarche dans un système à deux modes de division

Pour illustrer la démarche, nous la mettons en oeuvre sur le système le plus simple : une population de progéniteurs P qui peut se multiplier par auto-amplification (et donner deux P avec une probabilité $\alpha_{pp}(t)$) ou se consumer par division terminale (et donner deux N avec une probabilité $\alpha_{nn}(t) = 1 - \alpha_{pp}(t)$).

Dénotons $\phi(t) = \alpha_{nn}(t) - \alpha_{pp}(t)$ comme indice de différenciation¹. Les divisions sont purement prolifératives pour $\phi(t) = -1$ et purement terminales pour $\phi(t) = 1$.

En reprenant le formalisme des chapitres précédents, notre système est donc gouverné par :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dP(t)}{dt} = \eta(t) P(t) (-\phi(t)) \\ \frac{dN(t)}{dt} = \eta(t) P(t) (1 + \phi(t)) \\ \phi(t) = \text{non défini} \end{array} \right. \quad (5.1)$$

1. $\phi(t)$ correspond donc ici à $-\gamma(t)$ utilisée dans les chapitres précédents.

où $\eta(t)$ est le taux de division, et $\phi(t)$ est piloté par un processus non défini à ce stade.

Notons, pour fixer le vocabulaire, que si $\phi(t)$ est donné de l'extérieur du système, il s'agira d'un système linéaire non autonome ; si $\phi(t)$ est donné comme une fonction uniquement de $(P(t), N(t))$, il s'agira d'un système non linéaire autonome si η est constant, ou non linéaire non autonome du fait de l'évolution de $\eta(t)$ sinon.

5.1.1 Formulation par un système sans couplage

Dans un modèle sans couplage, nous considérons que l'évolution de $\phi(t)$ résulte d'un processus indépendant de l'état du système $P(t), N(t)$, c'est-à-dire indépendant du nombre (ou de la densité) de progéniteurs et de neurones.

Pour mettre cet exemple dans un contexte biologique, nous utiliserons les données récoltées par Nowakowski et al. [49] sur l'évolution du taux de différenciation pendant l'intervalle neurogénique du développement du cortex de la souris. Nowakowski et al. [49] rapportent deux observables : d'une part la fraction des P produisant une division terminale (*quitting fraction*) en fonction du nombre de cycles cellulaires ($q(CC)$, Nowakowski et al. [49]), et d'autre part la durée des cycles cellulaires successifs (Nowakowski et al. [49]). En combinant les deux séries de mesures, nous pouvons reconstruire la *quitting fraction* estimée $\hat{q}(t)$ en fonction du temps.

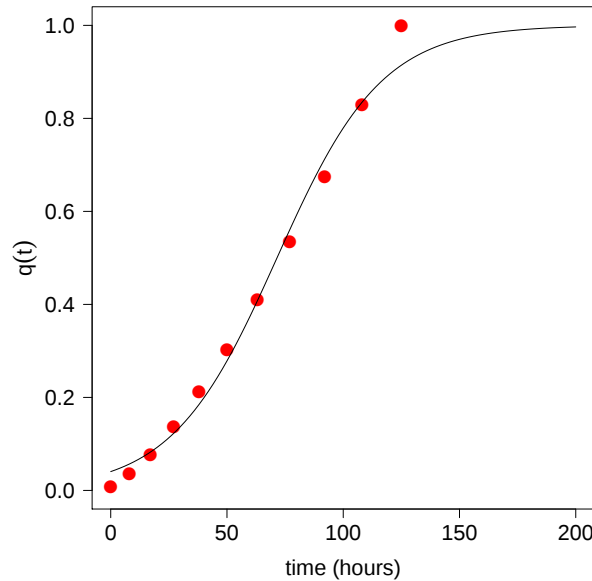


FIGURE 5.1 – Estimation de la *quitting fraction* $\hat{q}(t)$ reconstruite en fonction du temps d'après Nowakowski et al. [49] (points rouges). Le temps 0 correspond au début de la formation du cortex, ce qui correspond à E11 chez la souris. La courbe noire représente la forme fonctionnelle (5.2) de $q(t)$ ajustée par moindres carrés.

Considérer que cette évolution est pilotée par un processus indépendant de $P(t), N(t)$ consiste alors à simplement identifier la variable $\phi(t)$ à l'observable $2q(t) - 1$: $\phi(t) \equiv 2q(t) - 1$, où $q(t)$ est le processus dont $\hat{q}(t)$ est une estimation. Au regard de la forme de son évolution (Figure 5.1), nous proposons la forme fonctionnelle suivante :

$$q(t) = 0.5 + 0.5 \tanh\left(\frac{t - \tau_{nn}}{\sigma_{nn}}\right) \quad (5.2)$$

ce qui donne donc simplement :

$$\phi(t) = \tanh\left(\frac{t - \tau_{nn}}{\sigma_{nn}}\right) \quad (5.3)$$

L'estimation des paramètres par les moindres carrés sur $\hat{q}$ donne $\tau_{nn} = 71.5$ (heures) et $\sigma_{nn} = 45.2$ (heures).

Cette forme fonctionnelle apparaît bien convenir (Figure 5.1) sauf pour le dernier point où $\hat{q}$ est donné à 1, mais ce devrait être sans grande conséquence puisqu'il s'agit de la fin du processus, quand il reste peu de progéniteurs concernés.

On considère l'évolution des populations de progéniteurs et de neurones pour chaque progéniteur initialement présent : la condition initiale est donc fixée à $(P(0) = 1, N(0) = 0)$. En tenant compte de l'évolution des temps de cycle, la résolution numérique du système (5.1) donne l'image classique attendue (Fig. 5.2).

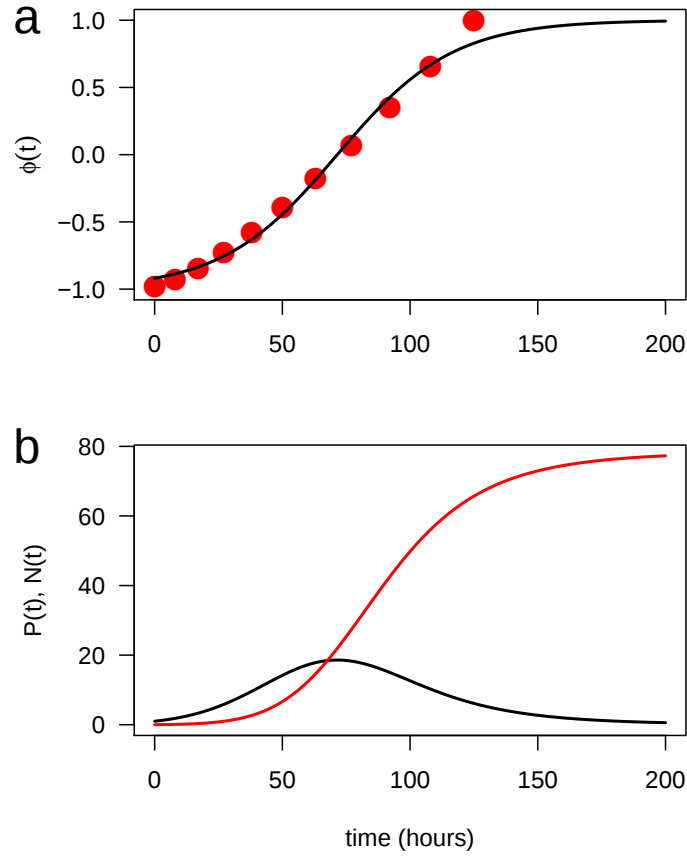


FIGURE 5.2 – (a) Evolution de l'indice de différenciation ajustée aux données de Nowakowski et al. [49] (voir Fig.5.1). (b) Evolution des populations de progéniteurs (courbe noire) et des cellules différenciées (courbe rouge) par la résolution numérique du système (5.1) avec $\phi(t) \equiv 2q(t) - 1$.

5.1.2 Introduction d'un couplage

Le principe du couplage est de considérer que l'indice de différenciation est sous la dépendance des variables d'état du système à chaque instant. Ce taux devient donc une fonction de ces variables : $\phi(t) \equiv \phi(P(t), N(t))$.

En principe, il y a trois couplages possibles : une dépendance à $P(t)$ seulement, une dépendance à $N(t)$ seulement, ou une dépendance aux deux. Pour examiner ces possibles, nous reprenons les évolutions prédites par le système linéaire pour $P(t)$ et $N(t)$ et, pour chaque couplage, nous reportons la valeur de $\phi(t)$ en fonction de la série temporelle concernée par le couplage. Nous tentons alors de trouver une forme fonctionnelle pour le couplage, et nous testons la prédiction du système non linéaire correspondant.

Rétro-contrôle de ϕ par P

La première possibilité est un contrôle par un rétro-contrôle de la population de progéniteurs $P(t)$ sur l'indice de différenciation ϕ . Intuitivement, un rétro-contrôle positif permettrait en particulier de favoriser la différenciation au fur et à mesure que la population de progéniteurs augmente, et donc de diminuer et finalement stopper la prolifération. En fait, si nous traçons $\phi(t)$ en fonction de $P(t)$, nous observons que la dépendance n'a pas de forme fonctionnelle (Fig. 5.3a), puisque deux valeurs de ϕ correspondent à une même valeur de P . Au début du processus, la densité de progéniteurs est faible et l'indice de différenciation est faible afin de permettre l'amplification des progéniteurs. A la fin du processus, la densité de progéniteurs est également faible mais l'indice de différenciation est fort afin de finir de dépler les progéniteurs. Une densité faible de progéniteurs correspond donc à deux valeurs de ϕ .

Si nous forçons cependant un rétro-contrôle positif pour la première partie du processus (de type $\phi(t) = -1 + k P(t)$ (fig. 5.3a, où $k = 1/25$), nous retrouvons le début de la dynamique, et le pool de progéniteurs augmente. Cependant, lorsque ce pool atteint la valeur critique $1/k$, le système change de nature. En effet, avec ce rétro-contrôle, le système non linéaire serait :

$$\begin{cases} \frac{dP(t)}{dt} = \eta(t) P(t) (1 - k P(t)) \\ \frac{dN(t)}{dt} = \eta(t) P(t) (k P(t)) \end{cases} \quad (5.4)$$

mais, quand $P(t)$ atteint la valeur $1/k$ (soit ici 25), il dégénère en :

$$\begin{cases} \frac{dP(t)}{dt} = \eta(t) P(t) (1 - 1) = 0 \\ \frac{dN(t)}{dt} = \eta(t) P(t) (k P(t)) = \eta(t) \frac{1}{k} \end{cases} \quad (5.5)$$

et donc, le pool de progéniteurs ne change plus alors que le pool de neurones croît linéairement avec le temps. Un contrôle de ϕ par la seule densité de P semble donc exclu.

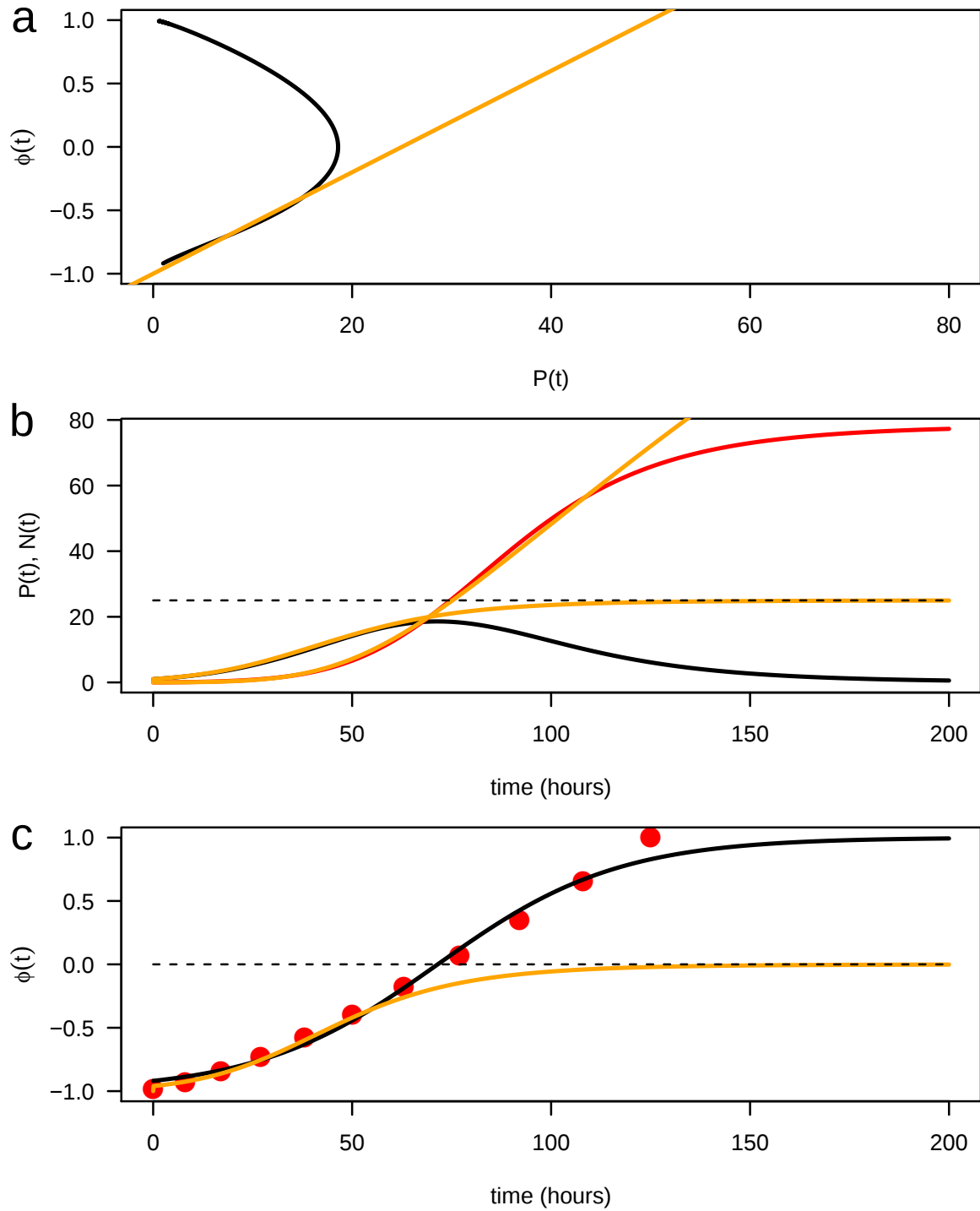


FIGURE 5.3 – Régulation de ϕ par P . (a) En noir : dépendance de $\phi(t)$ à $P(t)$ dans le système linéaire. Cette dépendance n'est pas une fonction. La droite orange indique un ajustement linéaire sur la première partie du temps. (b) Evolution des populations de P et de N sous l'hypothèse de cet ajustement linéaire (courbes oranges; les courbes noire et rouge sont les prédictions du système linéaire, rappelé pour référence). On observe que le rétro-contrôle positif initial permet de retrouver le début de la dynamique, mais que le pool de progéniteurs ne présente plus de décroissance après avoir atteint sa valeur stationnaire (ligne pointillée). A partir de ce moment, l'indice de différenciation (c, courbe orange) s'annule, et le système est piégé dans un mode de production infinie de neurones.

Rétro-contrôle de ϕ par N

La seconde possibilité est un contrôle de l'indice de différenciation ϕ par un rétro-contrôle par la population de neurones $N(t)$. Intuitivement, un rétro-contrôle positif permettrait en particulier de favoriser la différenciation au fur et à mesure que la population de neurones augmente, et donc de diminuer et finalement stopper la prolifération.

En examinant la dépendance de $\phi(t)$ à $N(t)$ (Fig. 5.4a), nous pouvons proposer la forme suivante pour une fonction $\phi_n(N)$:

$$\phi_n(N) = \phi_{min} + \beta_n N^{\sigma_n} \quad (5.6)$$

On observe que ϕ_{min} ne peut pas être minimale ($\phi_{min} = -1$, purement proliférative) à l'instant initial si on garde la condition initiale $N(0) = 0$. En effet, avec la forme proposée pour $\phi_n(N)$, le système devient :

$$\begin{cases} \frac{dP(t)}{dt} = \eta(t) P(t) (-\phi_{min} - \beta_n N(t)^{\sigma_n}) \\ \frac{dN(t)}{dt} = \eta(t) P(t) (1 + \phi_{min} + \beta_n N(t)^{\sigma_n}) \end{cases} \quad (5.7)$$

Avec la condition initiale ($P(0) = 1, N(0) = 0$), on a :

$$\begin{cases} \left. \frac{dP(t)}{dt} \right|_{t=0} = \eta(0) P(0) (-\phi_{min} - \beta_n N(0)^{\sigma_n}) = \eta(0) \\ \left. \frac{dN(t)}{dt} \right|_{t=0} = \eta(0) P(0) (1 + \phi_{min} + \beta_n N(0)^{\sigma_n}) = 0 \end{cases} \quad (5.8)$$

et donc, la production de neurones ne commence jamais : le système est piégé en mode purement prolifératif. En prenant $\phi_{min} = -0.9$, et en ajustant $\phi_n(N)$ sur $\phi(t)$ par moindres carrés, on obtient : $\beta_n = 0.146$ et $\sigma_n = 0.590$. En utilisant ces paramètres, la dynamique non linéaire se superpose parfaitement à la dynamique attendue (Fig. 5.4).

Un contrôle de l'indice de différenciation par la densité de neurones est donc possible en principe. Nous notons que la forme fonctionnelle de ce contrôle est très particulière, et peut appeler des explications compliquées en termes de mécanismes biologiques. Nous avons vérifié qu'une approximation par une fonction affine ne marche pas (Fig. 5.4, courbes vertes). Nous notons également que la structure logique de ce contrôle requiert une probabilité de différenciation "spontanée" au début du processus quand le nombre de neurones est nul. Il faut donc imaginer un processus biologique qui commencerait par un signal externe pour initier la différenciation, le rétro-contrôle par la densité de neurones produits prenant ensuite le relais.

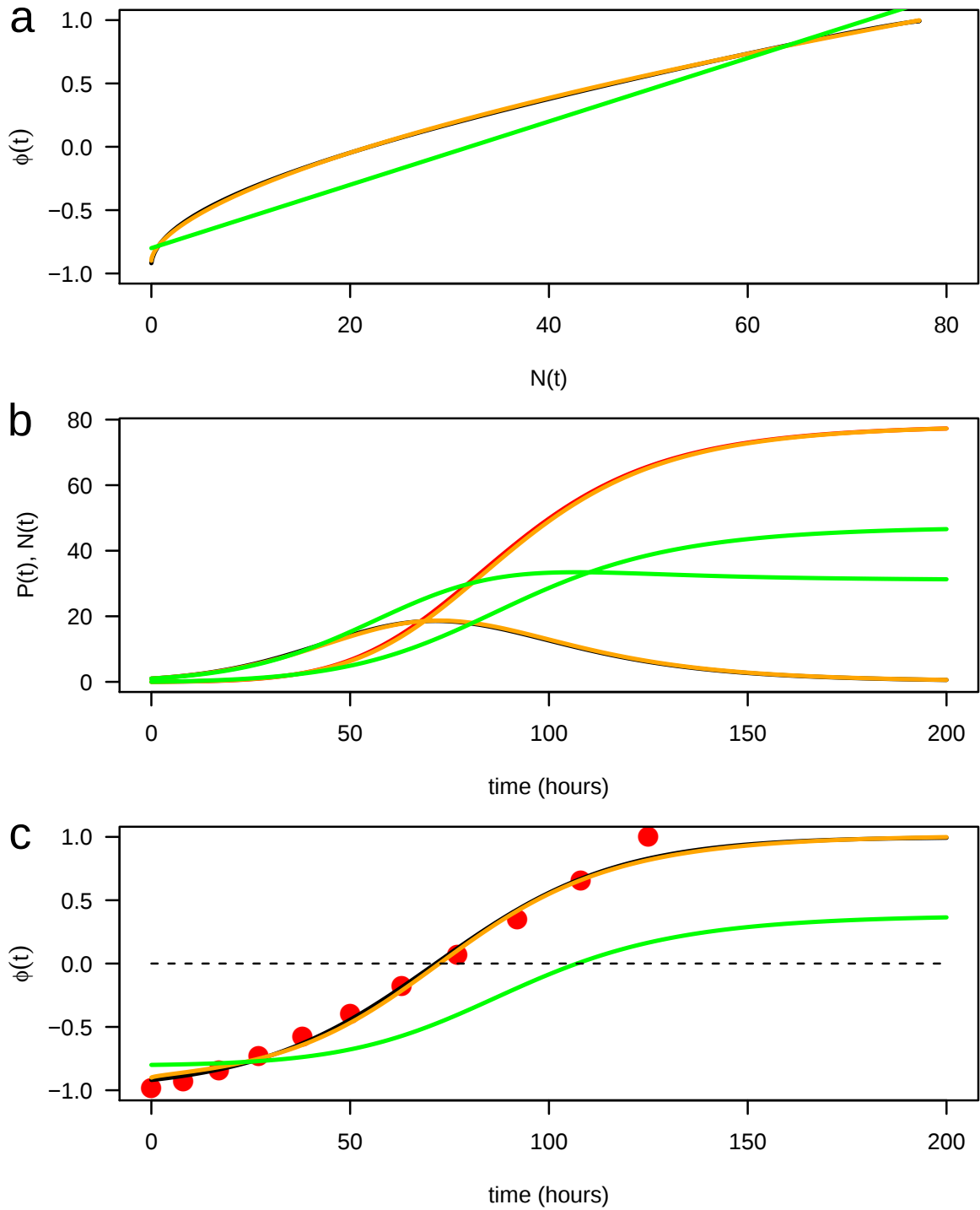


FIGURE 5.4 – Régulation de ϕ par N . (a) Dépendance de $\phi(t)$ à $N(t)$ dans le système linéaire. La courbe orange indique l'ajustement de la fonction $\phi_n(N)$ par moindres carrés. (b) Evolution des populations de P et de N sous l'hypothèse de cet ajustement (courbes oranges; les courbes noire et rouge sont les prédictions du système linéaire, rappelées pour référence). La dynamique est parfaitement reconstruite, de même que l'évolution de $\phi(t)$ (c, courbe noire : $\phi(t)$, courbe orange : $\phi_n(N)$ au cours du temps). Une approximation de $\phi_n(N)$ par une fonction affine ne marche pas (courbes vertes).

Rétro-contrôle de ϕ par $P + N$

La troisième possibilité est un contrôle de l'indice de différenciation ϕ par un rétro-contrôle par les deux populations. En premier choix, nous regardons un rétro-contrôle par la population totale $P(t) + N(t)$. En examinant la dépendance fonctionnelle de $\phi(t)$ à $P(t) + N(t)$, nous observons une remarquable dépendance linéaire (Fig. 5.5). Une expression simple pour $\phi_{pn}(P, N)$ est donc :

$$\phi_{pn}(P, N) = \phi_{min} + \beta_{np} (P + N) \quad (5.9)$$

Par ajustement (régression linéaire), nous obtenons : $\phi_{min} = -0.952$ et $\beta_{np} = 0.0247$. Nous retrouvons alors une dynamique non linéaire qui se superpose à la dynamique linéaire (Fig. 5.5, courbes oranges).

La valeur minimale de ϕ_{min} est également supérieure à -1, mais ici le taux de différenciation à l'instant initial est donné par $\phi_{min} + \beta_{np}$, et le système ne peut donc pas se retrouver piégé dans un mode prolifératif. Enfin, si nous forçons cette valeur à $\phi_{min}^* = -1$, la régression linéaire correspondante donne $\beta_{np}^* = 0.0254$, et la dynamique non linéaire reconstruite est très proche de l'attendu (Fig. 5.5, courbes vertes). Ce rétro-contrôle marche donc très bien sans mécanisme de différenciation spontanée.

Avec $\phi_{min}^* = -1$, le système devient :

$$\begin{cases} \frac{dP(t)}{dt} = \eta(t) P(t) (1 - \beta (P(t) + N(t))) \\ \frac{dN(t)}{dt} = \eta(t) P(t) \beta (P(t) + N(t)) \end{cases} \quad (5.10)$$

c'est-à-dire :

$$\begin{cases} \frac{dP(t)}{dt} = \eta(t) [P(t) - \beta P(t)^2 - \beta P(t) N(t)] \\ \frac{dN(t)}{dt} = \eta(t) [\beta P(t)^2 + \beta P(t) N(t)] \end{cases} \quad (5.11)$$

où $\beta \equiv \beta_{np}^*$.

Nous notons la puissante simplicité de ce type de contrôle.

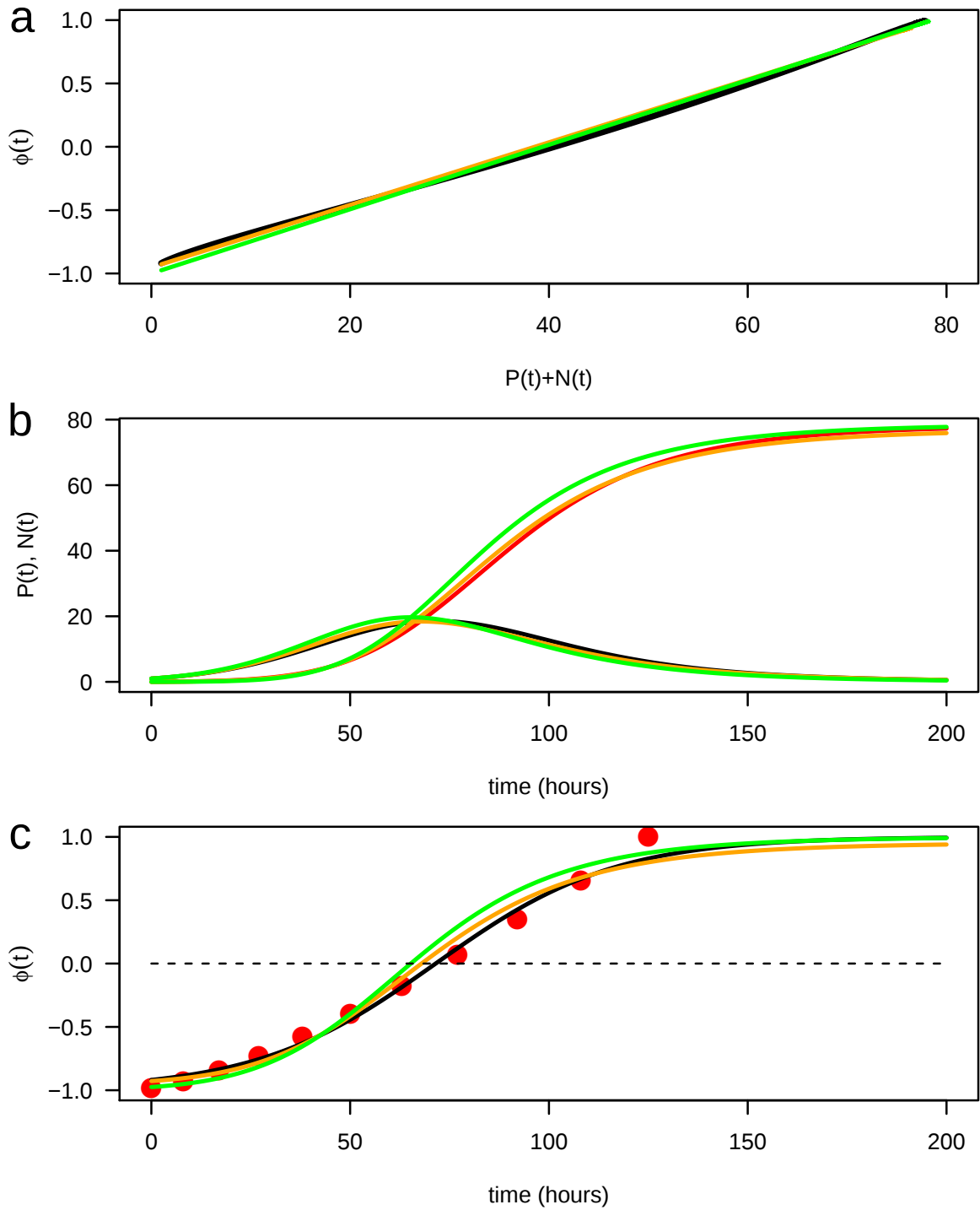


FIGURE 5.5 – Régulation de ϕ par $P+N$. (a) Dépendance de $\phi(t)$ à $P(t)+N(t)$ dans le système linéaire. La courbe orange indique l'ajustement de la fonction $\phi_{pn}(P, N)$ par moindres carrés (régression linéaire). (b) Evolution des populations de P et de N sous l'hypothèse de cet ajustement (courbes oranges; les courbes noire et rouge sont les prédictions du système linéaire, rappelées pour référence). La dynamique est parfaitement reconstruite, de même que l'évolution de $\phi(t)$ (c, courbe noire : $\phi(t)$, courbe orange : $\phi_{pn}(P, N)$ au cours du temps). Les courbes vertes correspondent au système (5.11).

5.2 Rétro-contrôles dans le modèle PN

Nous nous tournons maintenant vers le modèle PN incluant les trois types de division : PP (avec une probabilité $\alpha_{pp}(t)$), PN ($\alpha_{pn}(t)$) et NN ($\alpha_{nn}(t)$).

Reprenant les mêmes notations que dans le chapitre précédent, nous rappelons que le système est :

$$\begin{cases} \frac{dP(t)}{dt} = \gamma(t)\eta(t)P(t) \\ \frac{dN(t)}{dt} = (1 - \gamma(t))\eta(t)P(t) \end{cases} \quad (5.12)$$

Nous cherchons une forme pour $\gamma(t)$ comme une fonction de $P(t)$ et $N(t)$.

Plusieurs types de rétro-contrôle peuvent être là encore envisagés : soit par les progéniteurs, soit par les neurones, soit par les deux. Nous suivons donc la même démarche que celle exposée dans la section précédente : nous reprenons les évolutions des modes de divisions et des deux populations, nous construisons systématiquement tous les graphes de dépendances, nous regardons lesquels sont pertinents, et pour ceux qui sont retenus, nous ajustons une forme fonctionnelle que nous réintroduisons dans le système initial afin de comparer le comportement du système non linéaire correspondant aux évolutions mesurées.

Pour examiner les couplages, nous devons décider d'un type de contrôle pour deux des modes de divisions. Nous considérons donc deux boucles de rétro-contrôles par les variables d'états P et N sur deux modes de divisions. Pour choisir les modes de divisions, nous commençons par tracer toutes les dépendances possibles (Fig. 5.6) et nous choisissons celles qui paraissent les plus pertinentes.

A l'examen des couplages, nous avons choisi de considérer un contrôle de $\alpha_{pp}(t)$ et $\alpha_{nn}(t)$.

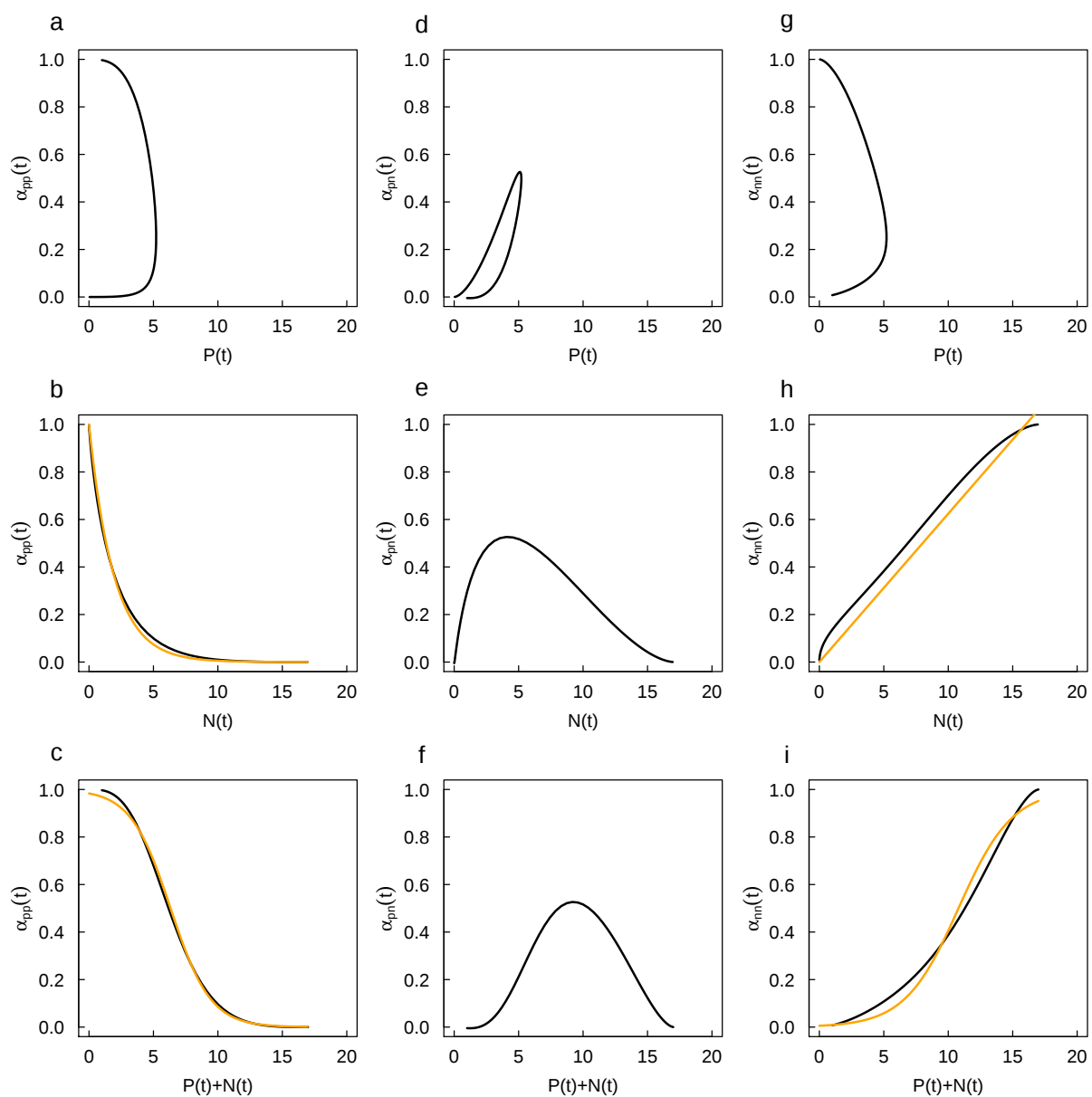


FIGURE 5.6 – Evolution de α_{pp} , α_{pn} , α_{nn} en fonction des variables d'état $P(t)$ et $N(t)$. Les courbes noires représentent les couplages donnés par le système linéaire. Les courbes oranges correspondent aux ajustements que nous avons retenus pour examen : rétro-contrôle par le nombre de neurones (b, h) ou par la population totale ($P+N$) (c, i) sur α_{pp} et α_{nn} .

5.2.1 Dépendances de $\alpha_{pp}(t)$

La dépendance de $\alpha_{pp}(t)$ à P n'étant pas ici non plus une fonction, nous l'excluons d'emblée (figure 5.6a).

La dépendance de α_{pp} à N peut être capturée par une forme fonctionnelle de type exponentielle (Figure 5.6b) :

$$\alpha_{pp}(t) = \exp(-aN) \quad (5.13)$$

En ajustant notre paramètre par la méthode des moindres carrés, nous trouvons $a = 0.54$. La dépendance de α_{pp} à la population totale ($P + N$) (Figure 5.6c) correspond à une forme de type tangente hyperbolique :

$$\alpha_{pp}(P, N) = 0.5 - \tanh \left[\frac{P + N - \tau_{pp}}{\sigma_{pp}} \right] 0.5 \quad (5.14)$$

Par ajustement, nous obtenons $\tau_{pp} = 3.39$ et $\sigma_{pp} = 3.17$.

Nous retenons donc deux rétro-contrôles possibles pour l'évolution de α_{pp} : soit par le seul pool de neurones (N), soit par l'ensemble de la population ($P+N$).

5.2.2 Dépendances de $\alpha_{nn}(t)$

La dépendance à la population de progéniteurs (Figure 5.6g) n'est pas une fonction : nous excluons cette possibilité.

La dépendance à la population de neurones peut être capturé par une droite (Figure 5.6h) de la forme $\alpha_{nn}(t) = \frac{1}{\alpha} N$, avec $\alpha = 21,52$.

La dépendance à la population totale est de type tangente hyperbolique (Figure 5.6i) :

$$\alpha_{nn}(P(t), N(t)) = \left[1 + \tanh \left(\frac{P + N - \tau_{nn}}{\sigma_{nn}} \right) \right] 0.5 \quad (5.15)$$

Après ajustement, nous obtenons $\tau_{nn} = 13.15$ et $\sigma_{nn} = 7.34$.

Nous avons donc deux rétro-contrôles possibles pour l'évolution de α_{nn} : soit par le seul pool de neurones (N), soit par l'ensemble de la population ($P+N$).

5.2.3 Combinaisons examinées

Nous avons donc quatre combinaisons possibles :

1. α_{pp} et α_{nn} sont contrôlés négativement et positivement par le pool de neurones
2. α_{pp} est contrôlé négativement par le pool de neurones et α_{nn} est contrôlé positivement par l'ensemble de la population.
3. α_{pp} est contrôlé négativement par l'ensemble de la population et α_{nn} est contrôlé par le pool de neurones.
4. α_{pp} et α_{nn} sont contrôlés négativement et positivement par l'ensemble de la population.

5.2.4 Contrôle de α_{pp} et α_{nn} par N

Dans ce cas $\gamma = e^{-aN} - \frac{1}{\alpha} N$.

Si nous remplaçons l'expression de $\gamma(N)$ dans le système (5.12), nous obtenons le système suivant :

$$\begin{cases} \frac{dP(t)}{dt} = \eta(t) P e^{-aN} - \frac{1}{\alpha} \eta(t) P N \\ \frac{dN(t)}{dt} = \eta(t) P - \eta(t) P e^{-aN} + \frac{1}{\alpha} \eta(t) P N \end{cases} \quad (5.16)$$

Après résolution numérique du système (5.16), nous constatons qu'un contrôle par le seul pool de neurones ne suffit pas à produire une dynamique de progéniteurs et de neurones proche de ce que nous observons (figure 5.7a).

5.2.5 Contrôle de $\alpha_{pp}(t)$ par N et $\alpha_{nn}(t)$ par $P + N$

Après résolution numérique, nous obtenons la dynamique des progéniteurs et des neurones reportée figure 5.7b. Nous constatons que nous obtenons des profils proches des données.

5.2.6 Contrôle de α_{pp} par $P + N$ et α_{nn} par N

Dans ce cas, nous obtenons également des profils proches de ceux obtenus dans le cas du linéaire. Nous surestimons légèrement la densité de neurones (figure 5.7c).

5.2.7 Contrôle de α_{pp} et de α_{nn} par $P + N$

La dynamique des progéniteurs et des neurones obtenue correspond parfaitement aux profils donnés par le système linéaire (figure 5.7d).

Le rétro-contrôle qui nous permet au mieux de rendre compte de la dynamique des progéniteurs et des neurones est donc là encore un rétro-contrôle par l'ensemble de la population. Notons que les rétro-contrôles présentés dans les points 5.2.5 et 5.2.6 nous donne des résultats satisfaisants également.

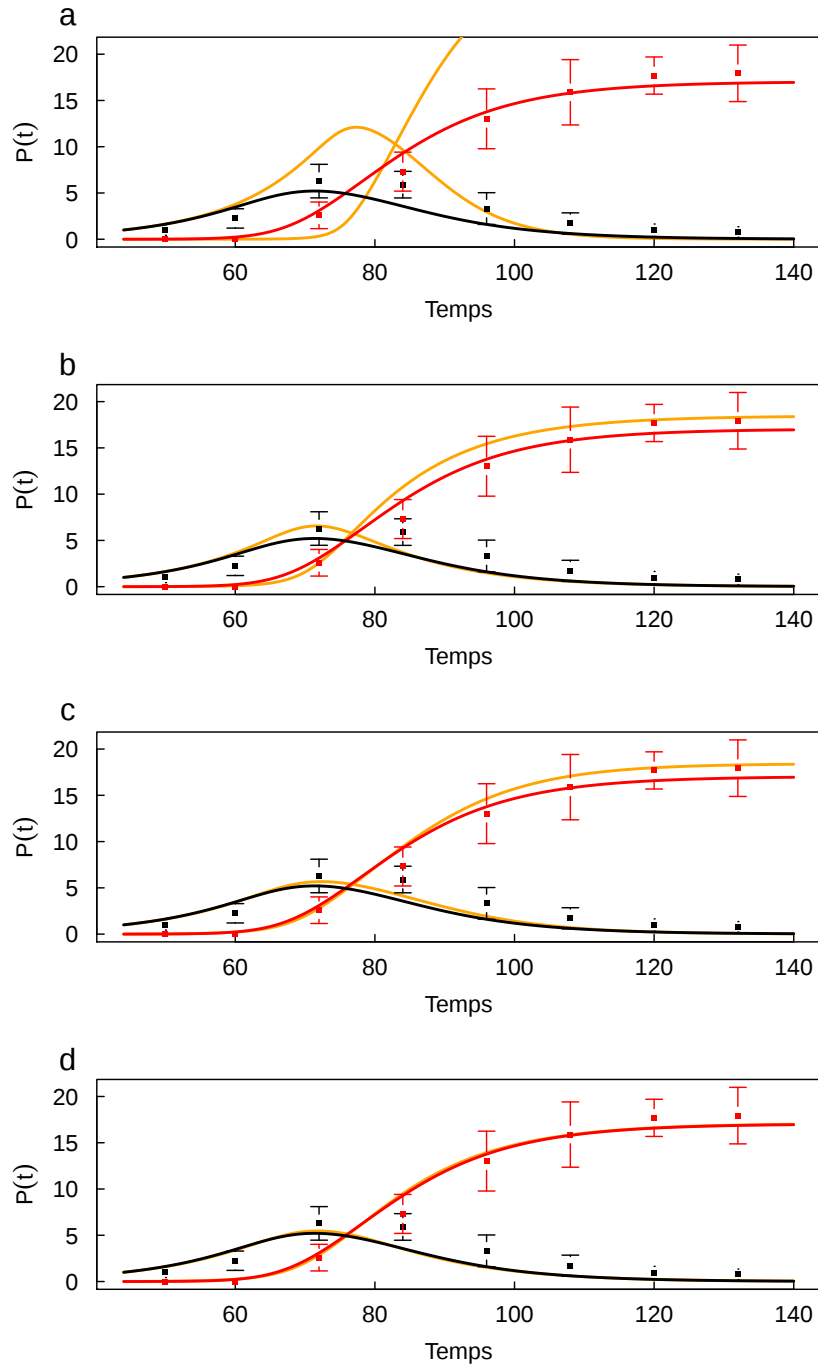


FIGURE 5.7 – Evolution des progéniteurs et des neurones en fonction du couplage introduit dans le système PN. Les courbes noires et rouges correspondent à l'évolution des progéniteurs et des neurones respectivement dans le cas du système linéaire. Le cas non-linéaire est représenté par les courbes oranges. (a) Contrôle des divisions de type PP et de type NN par la population de neurones. (b) Contrôle des divisions de type PP par le nombre de neurones et des divisions de type NN par la population (P+N). (c) Contrôle des divisions de type PP par la population totale et des divisions de type NN par le nombre de neurones. (d) Contrôle des divisions de type PP et NN par la population totale.

5.3 Rétro-contrôles dans le modèle GAN

Nous reprenons le modèle GAN exposé au chapitre précédent pour faire, de même, l'examen des couplages possibles.

Rappelons que :

- les progéniteurs de type G peuvent se diviser pour donner deux G avec une probabilité α_{ggg} ou un A et un N avec une probabilité α_{gan} .
- les progéniteurs de type A peuvent réaliser deux type de division, soit ils donnent un A et un N avec une probabilité α_{aan} soit ils peuvent donner deux N avec une probabilité α_{ann} .

Pour examiner les couplages, nous devons décider d'un type de contrôle pour deux des modes de divisions. Nous considérons donc deux boucles de rétro-contrôles par les variables d'états G, A et N sur deux modes de divisions. Pour choisir les modes de divisions, nous procédons de la même manière que dans la section 5.2, nous commençons par tracer toutes les dépendances possibles et nous choisissons celles qui paraissent les plus pertinentes.

Plusieurs types de rétro-contrôle peuvent être envisagés : soit par les progéniteurs de type G, soit par les progéniteurs de type A, soit par les neurones soit par la somme des G et des A soit par la somme des G et des N soit par la somme des A et des N soit par la population (G+A+N), nous avons donc 7 couplages possibles. Nous construisons systématiquement tous les graphes de dépendances, nous regardons lesquels sont pertinents, et pour ceux qui sont retenus, nous ajustons une forme fonctionnelle que nous réintroduisons dans le système initial afin de comparer le comportement du système non linéaire correspondant aux évolutions mesurées.

Nous choisissons de considérer un contrôle de $\alpha_{ggg}(t)$ (Fig. 5.8) et $\alpha_{ann}(t)$ (Fig. 5.9).

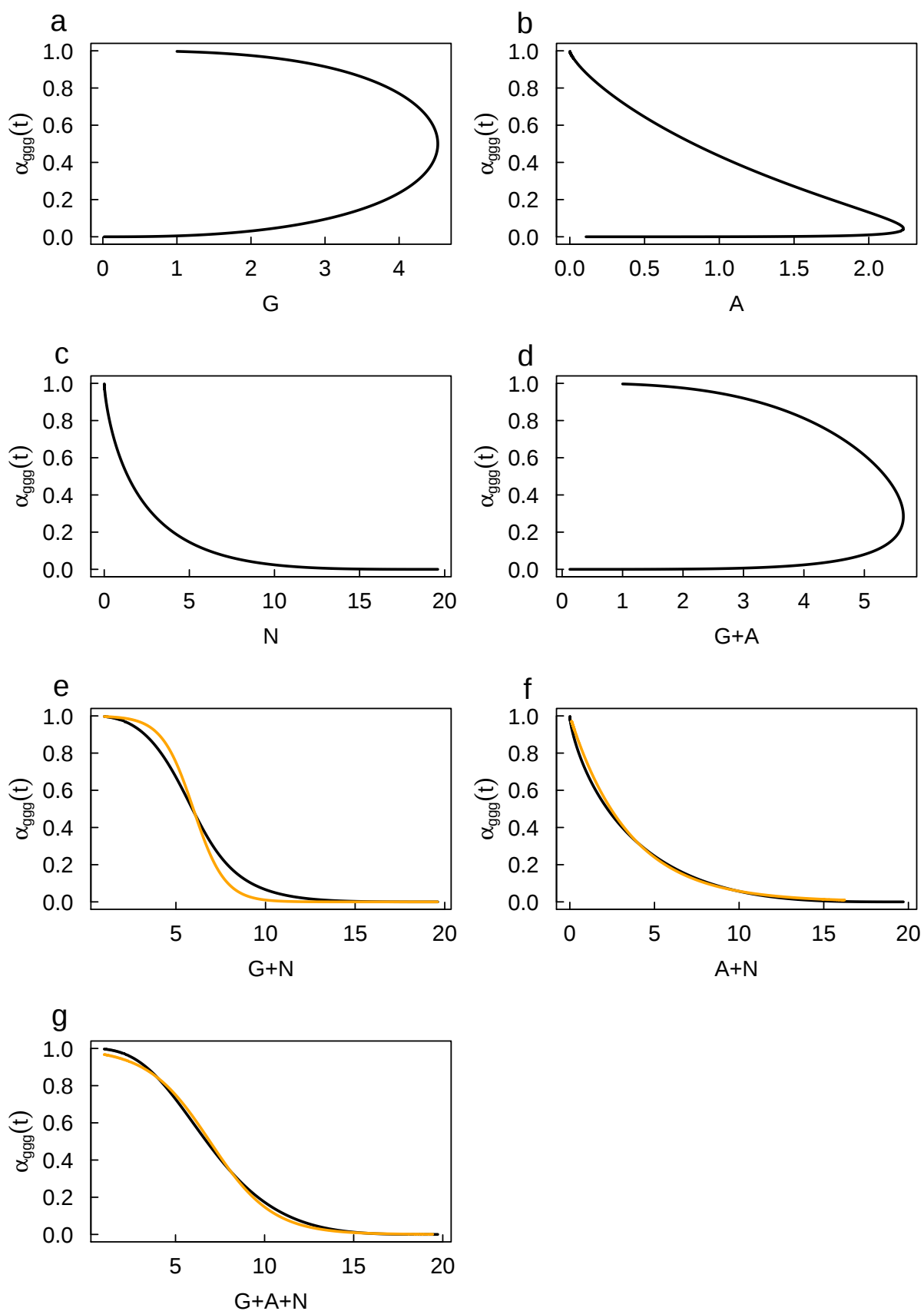


FIGURE 5.8 – Rétro-contrôles possibles pour l volution de α_{GGG} dans le cas du scénario GAN. Les courbes oranges indiquent les scénarios retenus.

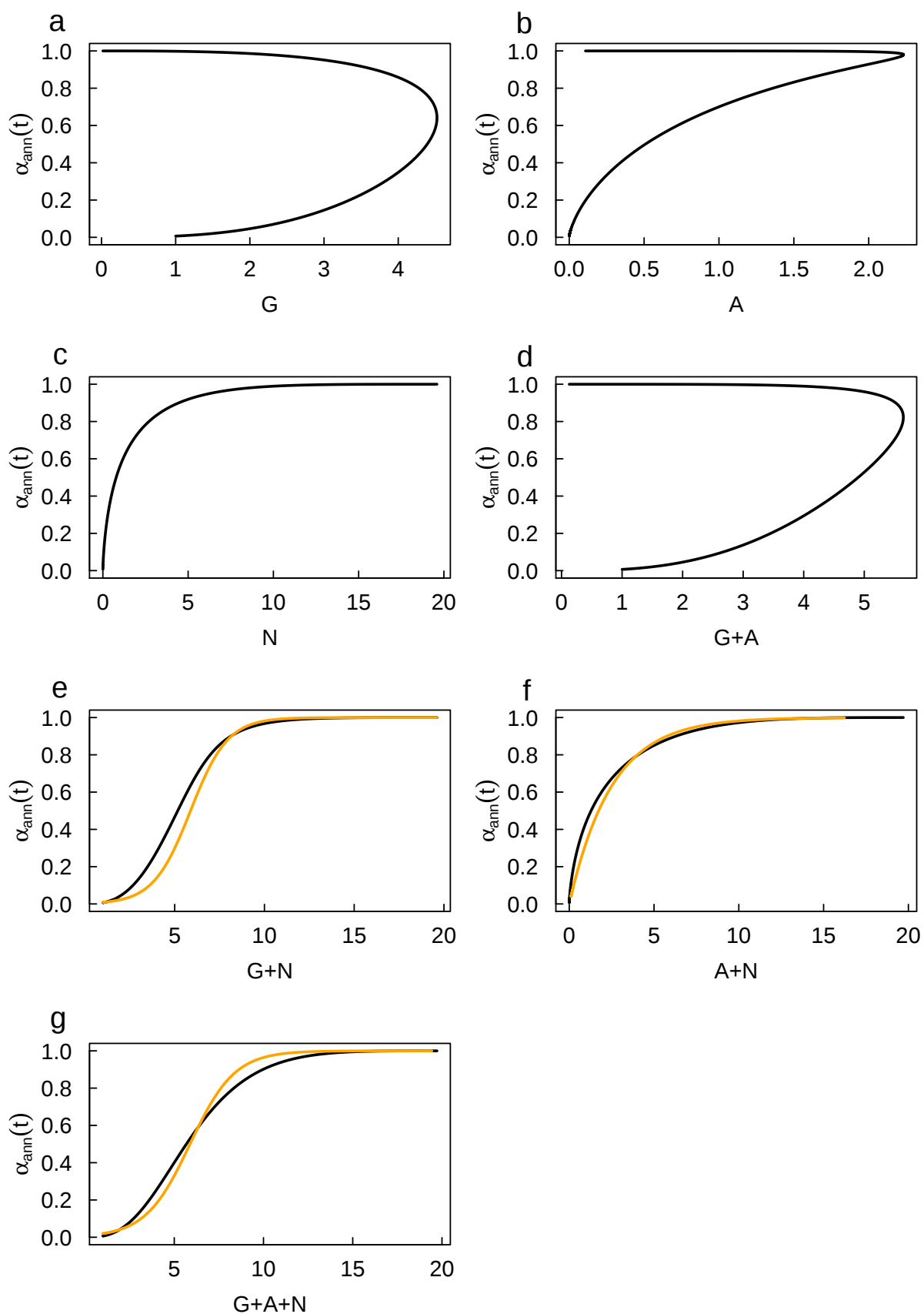


FIGURE 5.9 – Rétro-contrôles possibles pour l volution de α_{ANN} dans le cas du scénario GAN. Les courbes oranges indiquent les scénarios retenus.

5.3.1 Dépendances de $\alpha_{ggg}(t)$

La dépendance de $\alpha_{ggg}(t)$ à G , A ou la somme de ces deux derniers ne nous donne pas une fonction, nous décidons de les exclure (figure 5.8 a,b,d).

La dépendance de $\alpha_{ggg}(t)$ à $G + N$ peut être ajustée par une forme fonctionnelle de type tangente hyperbolique (figure 5.8e) :

$$\alpha_{ggg}(G, N) = 0.5 - \tanh \left[\frac{G + N - \tau_{gggGN}}{\sigma_{gggGN}} \right] 0.5 \quad (5.17)$$

Par ajustement, nous obtenons $\tau_{gggGN} = 5.9$ et $\sigma_{gggGN} = 1.8$

La dépendance de $\alpha_{ggg}(t)$ à $A + N$ peut être capturée par une forme fonctionnelle de type exponentielle (figure 5.8f) :

$$\alpha_{ggg}(A, N) = \exp \left(-\frac{1}{\tau_{ggg}} (A + N) \right) \quad (5.18)$$

Où $\tau_{ggg} = 3.5$ par la méthode des moindres carrés.

La dépendance de $\alpha_{ggg}(t)$ à $G + A + N$ peut être capturée par une forme fonctionnelle de type tangente hyperbolique (figure 5.8g) :

$$\alpha_{ggg}(G, A, N) = 0.5 - \tanh \left[\frac{G + A + N - \tau_{gggGAN}}{\sigma_{gggGAN}} \right] 0.5 \quad (5.19)$$

Par la méthode des moindres carrés, nous obtenons $\tau_{gggGAN} = 6.9$ et $\sigma_{gggGAN} = 3.5$

5.3.2 Dépendances de $\alpha_{ann}(t)$

La dépendance de $\alpha_{ann}(t)$ à G , A ou à la somme de ces deux derniers ne nous donne pas une fonction, nous décidons de les exclure (figure 5.9 a,b,d).

La dépendance de $\alpha_{ann}(t)$ à $G + N$ peut être ajustée par une forme fonctionnelle de type tangente hyperbolique (figure 5.9e) :

$$\alpha_{ann}(G, N) = 0.5 + \tanh \left[\frac{G + N - \tau_{annGN}}{\sigma_{annGN}} \right] 0.5 \quad (5.20)$$

Par ajustement, nous obtenons $\tau_{annGN} = 6$ et $\sigma_{annGN} = 1.5$

La dépendance de $\alpha_{ann}(t)$ à $A + N$ peut être capturée par une forme fonctionnelle de type exponentielle (figure 5.9f) :

$$\alpha_{ann}(A, N) = 1 - \exp(-\tau_{ann}(A + N)) \quad (5.21)$$

Où $\tau_{ann} = 0.4$ par la méthode des moindres carrés.

La dépendance de $\alpha_{ann}(t)$ à $G + A + N$ peut être capturée par une forme fonctionnelle de type tangente hyperbolique (figure 5.8g) :

$$\alpha_{ann}(G, A, N) = 0.5 + \tanh \left[\frac{G + A + N - \tau_{annGAN}}{\sigma_{annGAN}} \right] 0.5 \quad (5.22)$$

Par la méthode des moindres carrés, nous obtenons $\tau_{annGAN} = 6$ et $\sigma_{annGAN} = 2.5$

5.3.3 Examen des prédictions des rétro-contrôles

Nous présentons, parmi toute la combinatoire, seulement les résultats où le rétro-contrôle est de même nature sur les deux modes de divisions : le rétro-contrôle par G+N, celui par A+N et celui par G+A+N.

Pour chaque type de rétro-contrôle, nous injectons dans notre système général 4.2 les expressions correspondantes présentées ci-dessus, et nous résolvons numériquement le système non-linéaire, dont nous superposons les prédictions aux évolutions données par le système linéaire. Nous rappelons, en haut de chaque figure, le type de rétro-contrôle injecté.

Rétro-contrôle par G+N

Nous obtenons une dynamique très compatible avec les données de Saade et de Pituello (figure 5.10), avec peut-être une surestimation de la population de neurones. Nous observons par ailleurs une convergence remarquable des évolutions des deux modes de division.

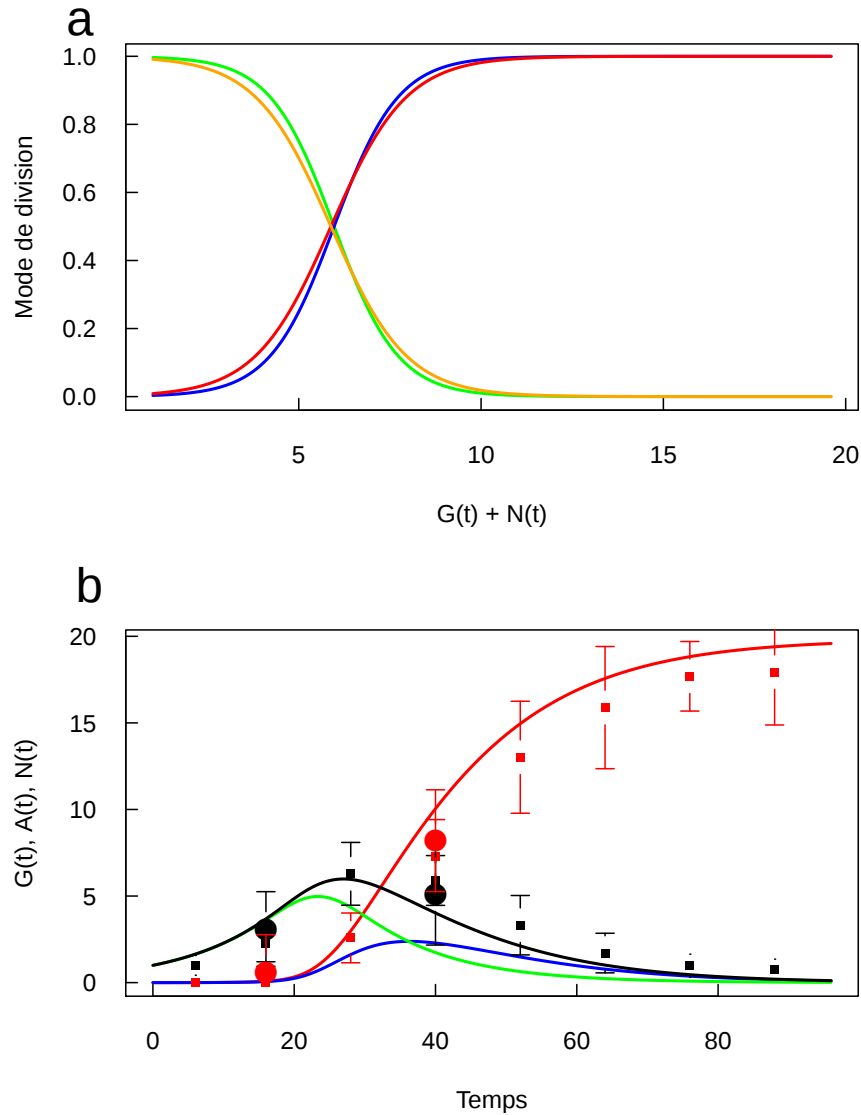


FIGURE 5.10 – Modèle GAN avec rétro-contrôle par G+N. a) Rétro-contrôle injecté dans le système (vert : $G \rightarrow (G, G)$, orange : $A \rightarrow (A, N)$ et leurs compléments respectifs : bleu : $G \rightarrow (A, N)$, rouge : $A \rightarrow (N, N)$). b) Evolution prédite pour les trois populations (vert : $G(t)$, bleu : $A(t)$, noir : $P(t) = G(t) + A(t)$, rouge : $N(t)$). Les points sont les données de Saade et de Pituello.

Rétro-contrôle par A+N

La dynamique produite paraît moins compatible avec les données, même si elle rentre dans les intervalles de confiance. Ce rétro-contrôle par A+N prédit des quantités de neurones et de progéniteurs inférieures à celles mesurées (figure 5.11).

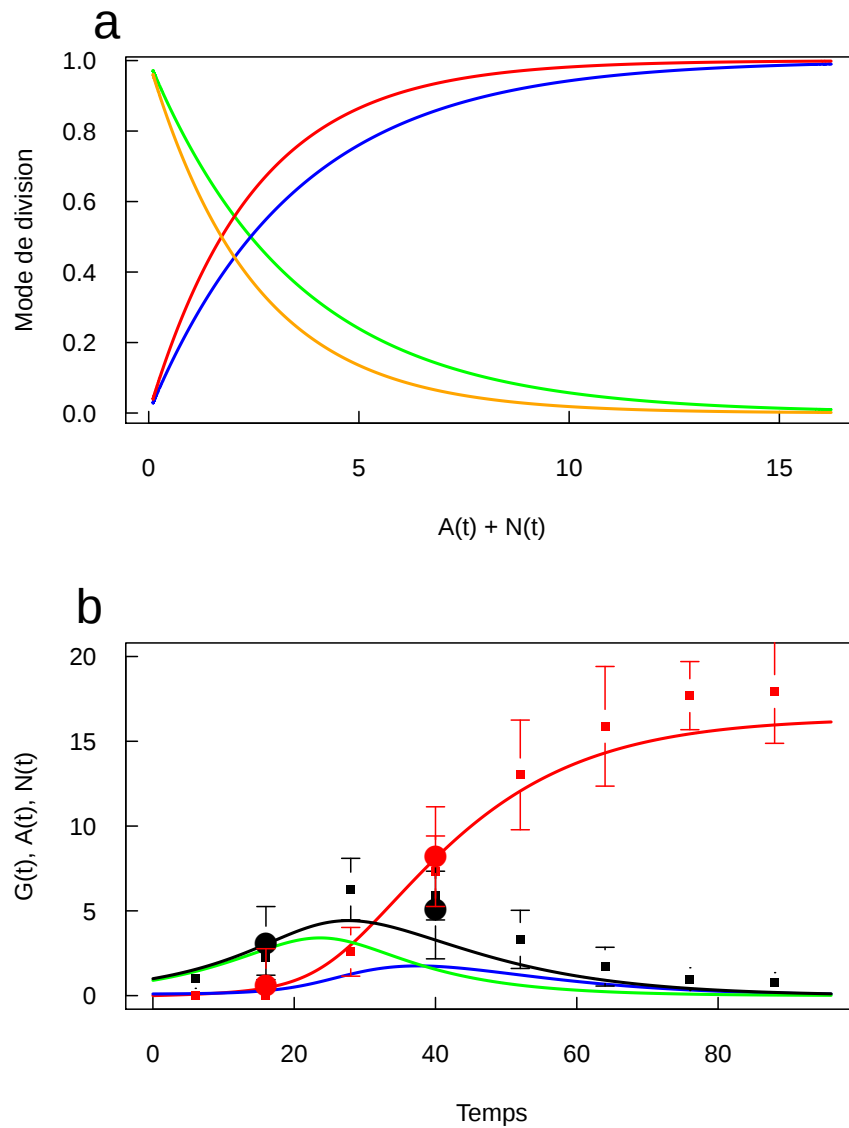


FIGURE 5.11 – Modèle GAN avec rétro-contrôle par A+N.

Rétro-contrôle par G+A+N

La dynamique produite est la plus compatible avec les données pour l'évolution des populations G et N (figure 5.12).

On retrouve, par ailleurs, une évolution des modes de division très proche de celle ajustée au chapitre 4 (Fig. 4.2.2).

C'est ce rétro-contrôle que nous gardons comme proposition principale.

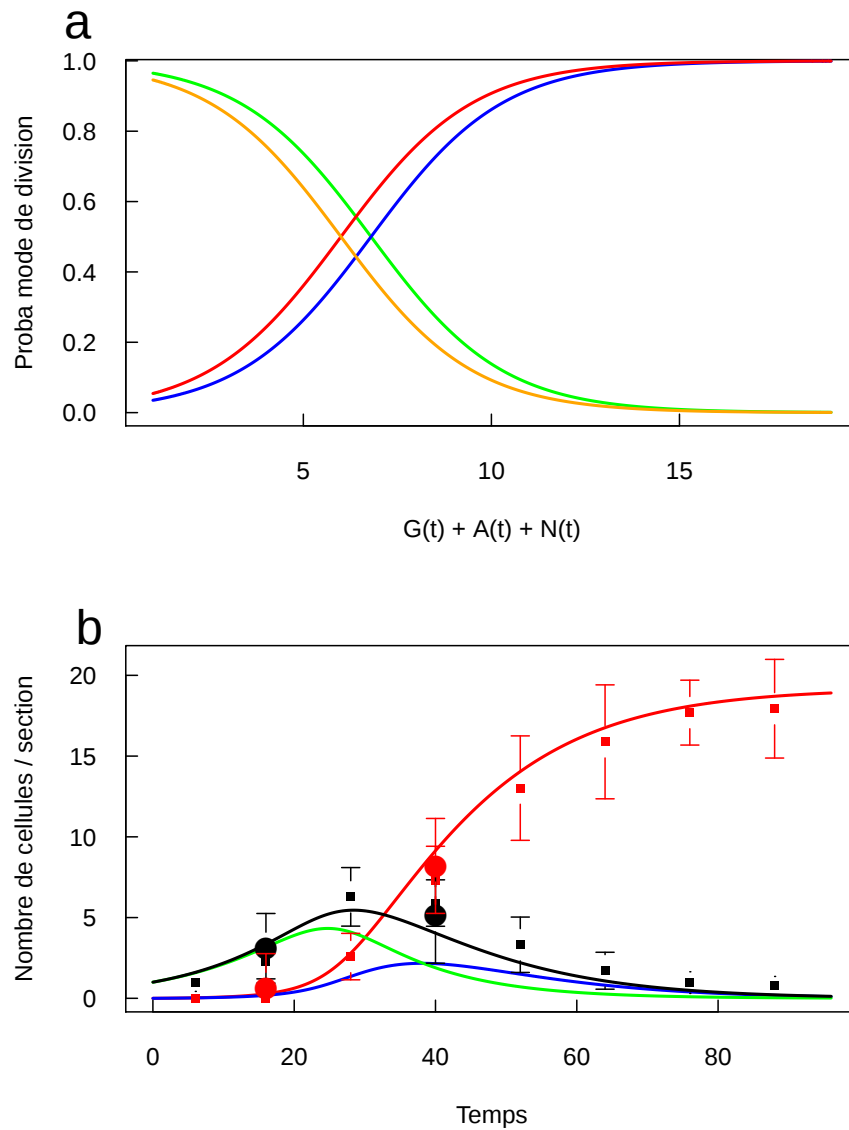


FIGURE 5.12 – Modèle GAN avec rétro-contrôle par G+A+N.

5.3.4 Sensibilité aux conditions initiales

Afin de mettre en évidence la robustesse acquise par le rétro-contrôle, nous regardons la sensibilité aux conditions initiales pour les systèmes PN et GAN, sans rétro-contrôle et avec rétro-contrôle par la population totale.

Pour ce faire, nous traçons les trajectoires des évolutions dans l'espace des variables d'état P, N en variant le nombre de progéniteurs initialement présents. Nous choisissons des conditions initiales de 1, 2, 3, 4 et 5 progéniteurs.

Dans le cas du modèle PN, nous voyons de manière claire que le nombre final de neurones produits par le système linéaire est proportionnel à la quantité de progéniteurs présents initialement (ce qui est une propriété de sa linéarité, fig. 5.13 a). La robustesse à une variation de la condition initiale est donc nulle : si la deuxième division d'une lignée est de type PP plutôt que NN, la population finale sera multipliée par deux.

On voit, en revanche, que le système non-linéaire (celui avec rétro-contrôle par $P+N$) est à peu près insensible à des variations de la condition initiale (figure 5.13 b) : le système converge toujours vers une population finale d'environ 20 neurones quelle que soit la condition initiale (figure 5.13 b). Ce système présente donc une grande robustesse à des variations aléatoires dans les premiers instants.

La même comparaison s'applique dans le cas du système GAN. Le système non-linéaire (celui avec rétro-contrôle par $G+A+N$) est à peu près insensible à la condition initiale (figure 5.13 d) alors que le système linéaire (figure 5.13 c) peut produire une population du simple au double selon la condition initiale.

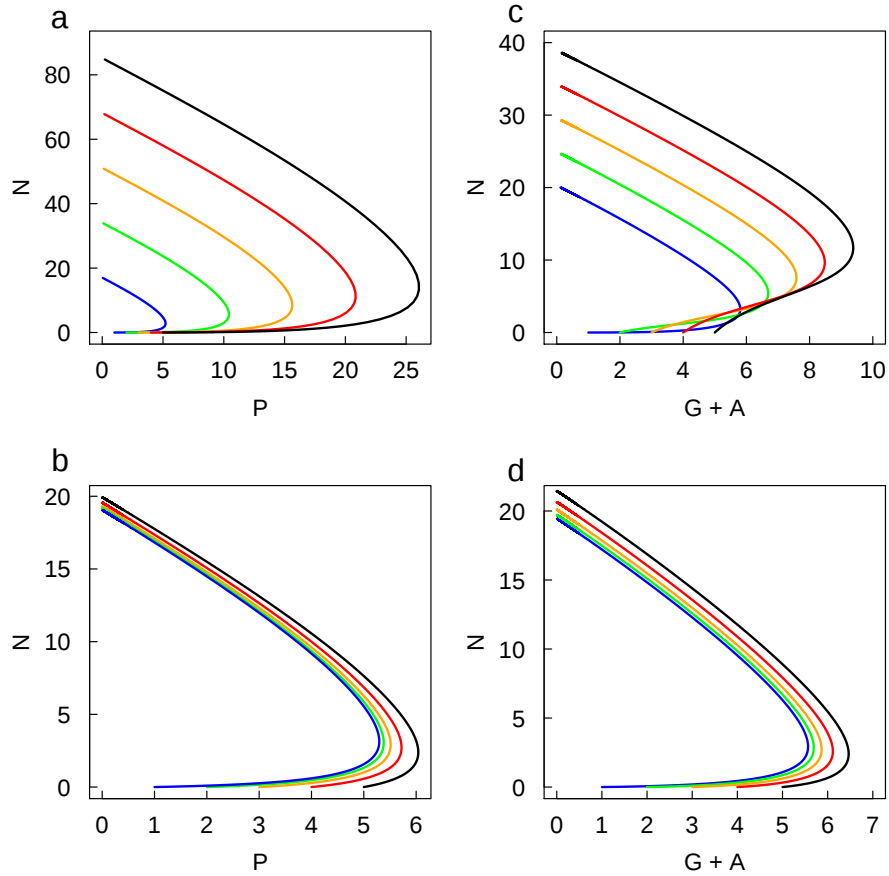


FIGURE 5.13 – Trajectoires dans l'espace P, N pour différentes conditions initiales. Les courbes bleus, vertes, oranges, rouges et noires représentent l'évolution du système pour des conditions initiales de 1, 2, 3, 4 et 5 progéniteurs respectivement. Lecture : la courbe bleue en a) part du point $P = 1, N = 0$. L'évolution du système commence par une augmentation des progéniteurs, suivie d'une diminution jusqu'à l'extinction au point final où $P = 0, N \approx 19$. (a) système PN sans rétro-contrôle. (b) système PN avec rétro-contrôle. (c) système GAN sans rétro-contrôle. (d) système GAN avec rétro-contrôle.

5.4 Rétro-contrôle et CDC25B

Nous pouvons examiner ces couplages dans les deux systèmes PN et GAN en présence des gains de fonction en CDC25B et CDC25B- Δ CDK afin de voir si on peut interpréter leur effet en termes de modulation de ce couplage.

5.4.1 Gains de fonction dans le système PN

GoF en CDC25B

Pour commencer, nous avons tracé tous les couplages possibles à partir des évolutions que nous avons obtenues en présence du gain de fonction en CDC25B pour le système PN (figure 2 de l'article 7.3).

A l'examen des couplages possibles (figure 5.14), nous choisissons de nous placer dans le cas d'un rétrocontrôle par l'ensemble de la population ($P + N$). Nous constatons que le gain de fonction se traduit par un rétro-contrôle plus fort (figure 5.14 c et i), qui induit une transition de l'état prolifératif vers l'état neurogène pour un nombre total de cellules plus faible.

GoF en CDC25B- Δ CDK

Là aussi, nous avons tracé tous les couplages possible à partir des évolutions obtenues dans ce cas (figure 3 de l'article 7.3).

Nous retenons de la même façon le cas d'un rétrocontrôle par l'ensemble de la population ($P + N$). Nous constatons qu'une suppression de l'interaction entre cdk et sa cycline se traduit par un rétro-contrôle un peu plus fort nous faisant ainsi quitter l'état prolifératif pour un nombre total de cellule plus faible (figure 5.15 c et i). Remarquons tout de même que nous sommes très proches du cas contrôle.

Effets apparents sur le rétro-contrôle

Le gain de fonction en CDC25B se manifeste alors sous la forme d'une suractivation du rétro-contrôle de $P+N$ sur la balance prolifération / différenciation γ (la pente est plus forte). La conséquence de ce gain est un basculement plus précoce vers la neurogenèse, ayant pour effet une production de progéniteurs plus faible, ce qui entraîne un nombre de neurones finaux plus faible également (figure 5.16 b).

Le gain de fonction en CDC25B- Δ CDK apparaît avoir un effet faible sur ce rétro-contrôle, sauf pour une population ayant déjà atteint la moitié de sa taille finale (figure 5.16 c), et s'il existe, cet effet se manifeste tardivement (figure 5.16 d).

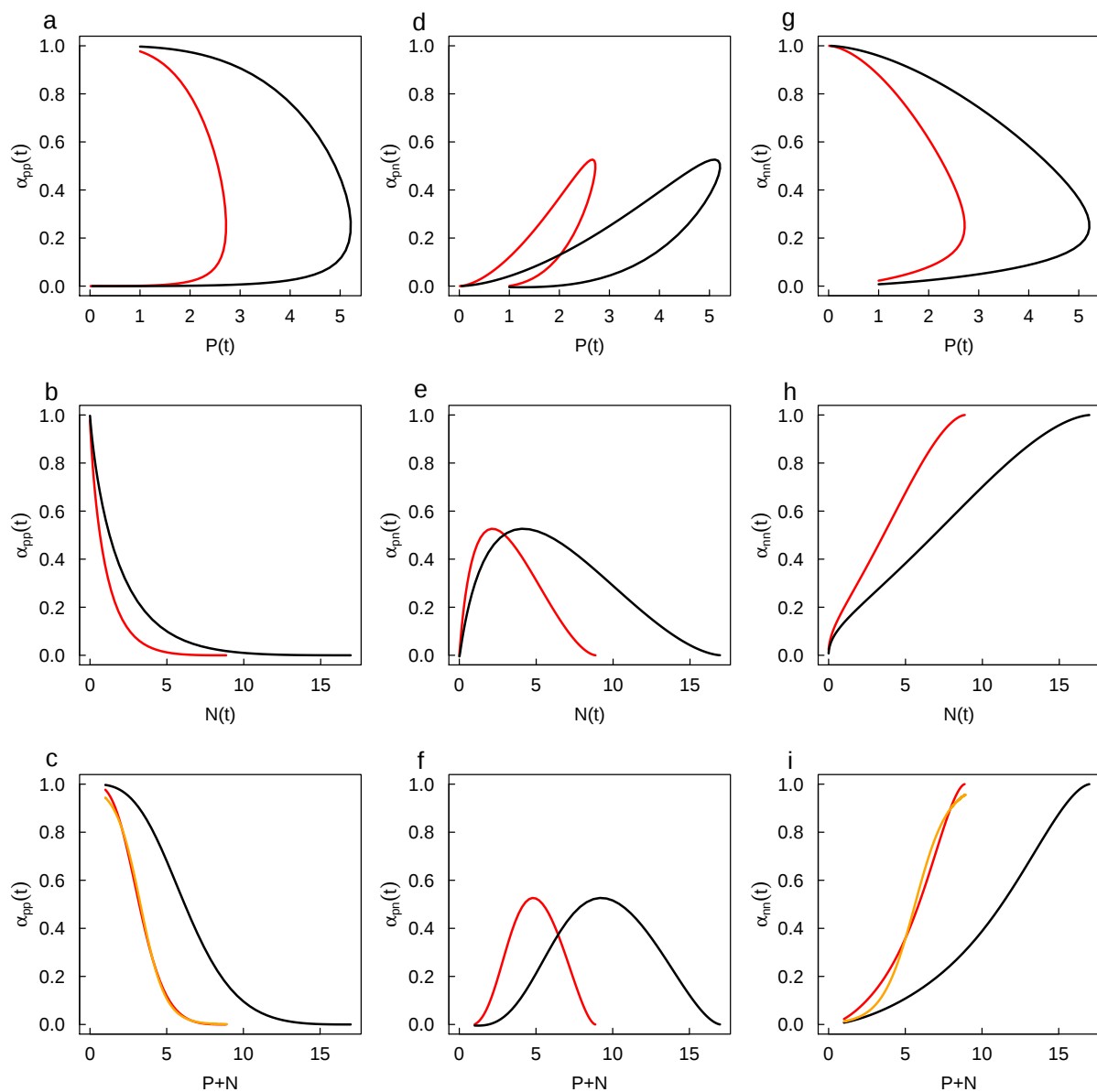


FIGURE 5.14 – Couplages en présence du Gain de Fonction en CDC25B dans le système PN. Les courbes rouges représentent le gain de fonction, les courbes noires le contrôle. Les courbes oranges correspondent à l'ajustement fonctionnel que nous avons retenu.

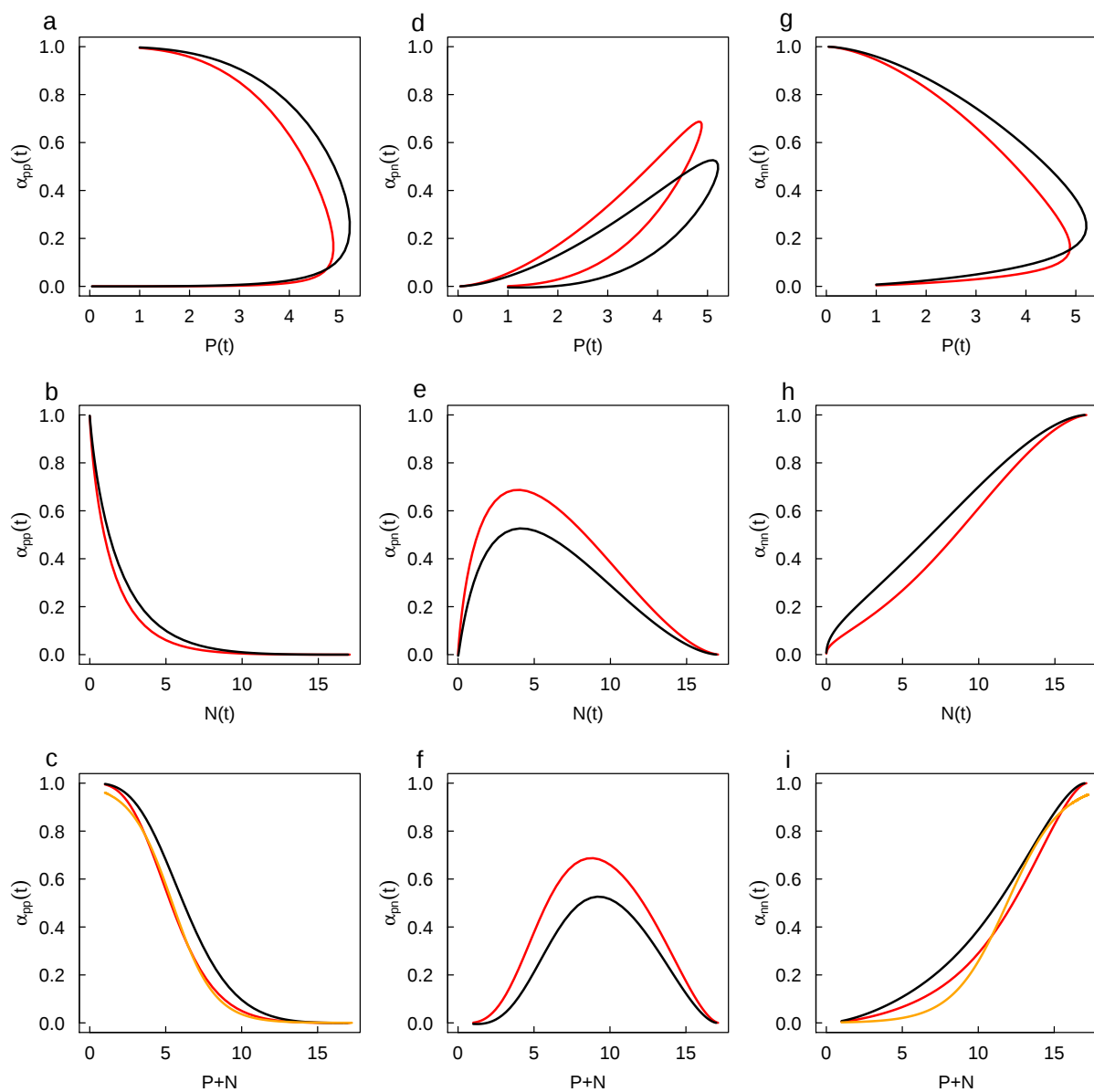


FIGURE 5.15 – Couplages en présence du GoF en CDC25B- Δ CDK dans le système PN. Mêmes conventions que la figure 5.14.

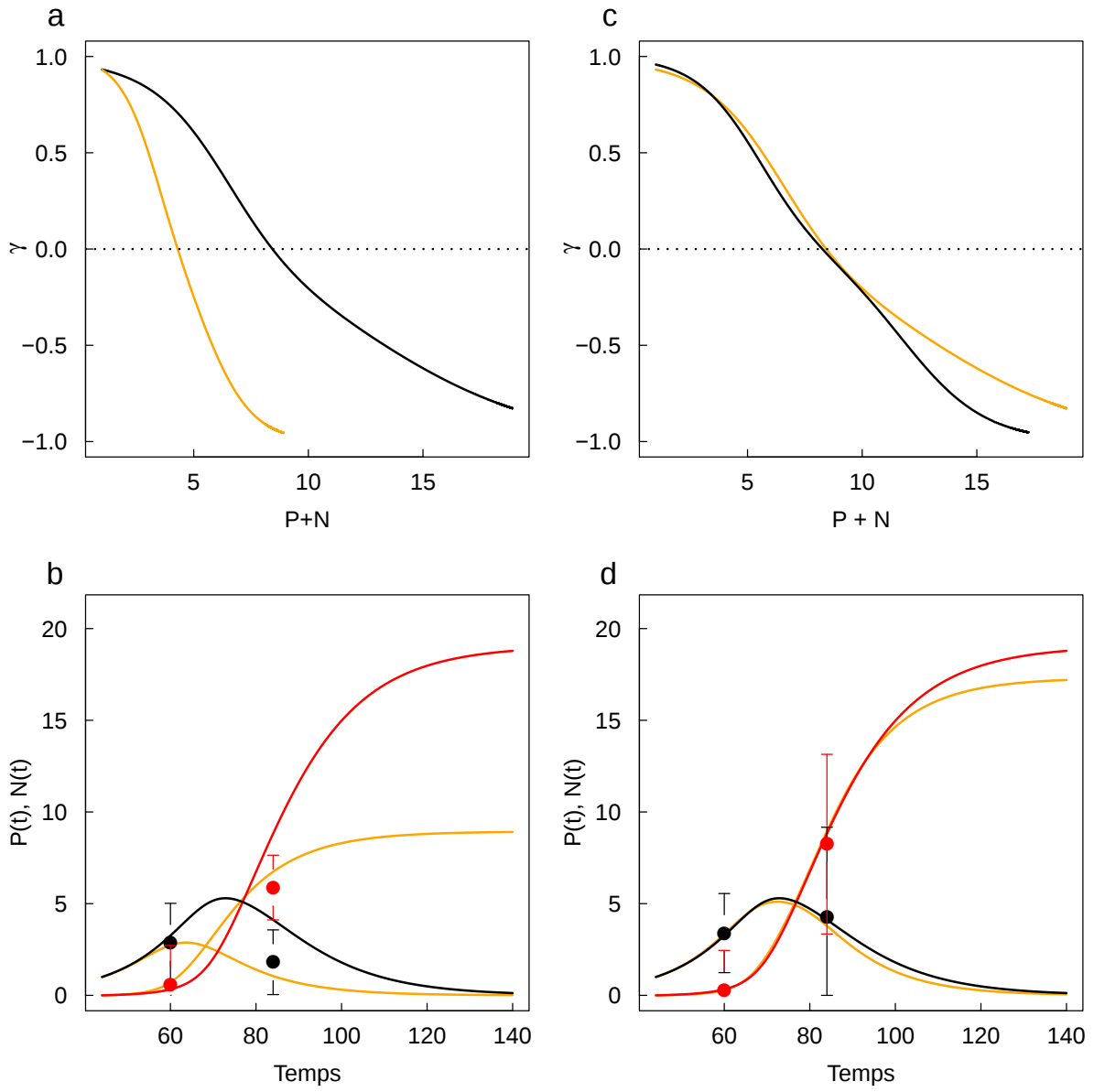


FIGURE 5.16 – Effet d'un gain de fonction et d'une suppression de l'interaction entre CDK et sa cycline dans le système PN. Les courbes noires et rouges représentent le cas contrôle et les courbes oranges le cas du GOF ou du Δ CDK. Les graphiques (a) et (b) représentent le cas du GOF et les graphiques (c) et (d) représentent le cas du Δ CDK. Les graphiques (a) et (c) représentent l'évolution de la balance prolifération / différenciation et les graphiques (b) et (d) représentent l'évolution des progéniteurs et des neurones. Les points sont les données issues de l'article 7.2.

5.4.2 Gains de fonction dans le système GAN

Nous procédons de la même façon pour le système GAN, pour lequel nous ne rapportons que l'effet obtenu sous l'hypothèse d'un rétro-contrôle par l'ensemble de la population ($G + A + N$).

GoF en CDC25B

Nous constatons le même type de forçage apparent du rétro-contrôle (pentes plus fortes) qui tend à favoriser les transitions vers les divisions neurogéniques pour une population totale plus faible (figure 5.17a et b). Les deux rétro-contrôles apparaissent affectés de la même façon.

Ces rétro-contrôles plus forts se traduisent de la même façon que dans le système PN par une diminution forte du nombre de neurones finalement produits, par déplétion précoce des progéniteurs (figure 5.17c).

GoF en CDC25B- Δ CDK

Contrairement au cas ci-dessus, nous observons dans cette condition un effet différencié sur les rétro-contrôles : le rétro-contrôle sur l'évolution des modes de division chez les progéniteurs de type *G* semble très peu affecté (figure 5.18a), alors que celui portant sur les progéniteurs de type *A* est très adouci (pente plus faible pour une population totale en début de croissance, figure 5.18b). La dynamique des populations est peu affectée, comme dans le cas PN, parce le pool de progéniteurs *A* apparaissant tardivement, la modulation précoce du rétro-contrôle l'affecte peu (figure 5.18c).

Commentaires

L'examen de la modulation des rétro-contrôles par la manipulation expérimentale en CDC25B ouvre la possibilité que ce régulateur du cycle cellulaire soit impliqué dans la chaîne de signalisation qui porterait ce rétro-contrôle. Deux possibilités sont compatibles avec un tel scénario : que CDC25B agisse effectivement comme un modulateur d'un signal qui porterait aux progéniteurs l'information sur la quantité totale en cellule, ou que CDC25B soit directement impliqué dans la traduction de ce signal en changement comportemental.

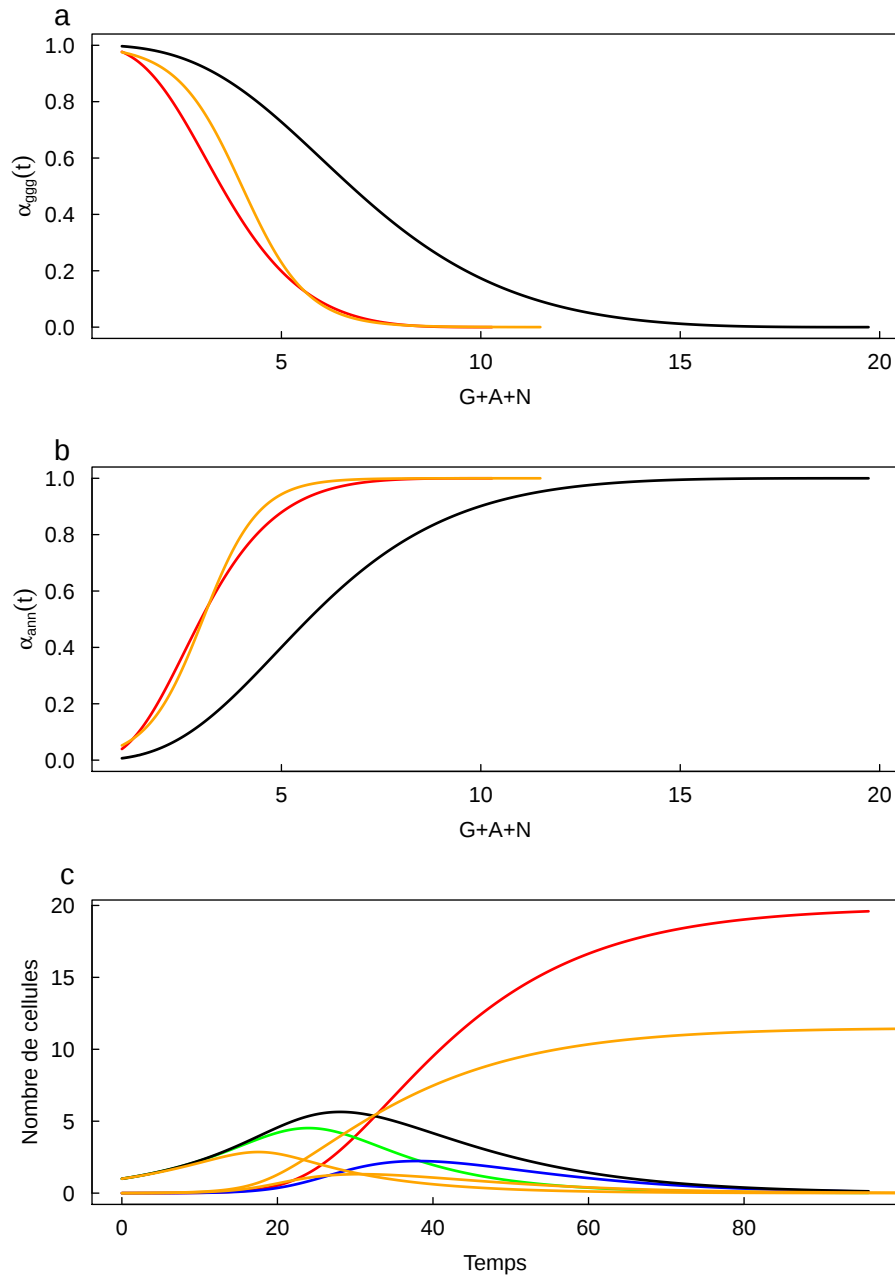


FIGURE 5.17 – Effet d'un GOF en CDC25B sur le système GAN. (a et b) Evolution des modes de divisions en fonction de l'ensemble de la population. Les courbes noires représentent le contrôle et les courbes rouges le GOF. Les courbes oranges représentent les formes fonctionnelles retenues. (c) Evolution des populations de cellules en fonction du temps. La courbe rouge représente le nombre de neurones dans le cas contrôle, la courbe noire représente l'évolution des progéniteurs et les courbes bleues et vertes représentent l'évolution du nombre de G et de A respectivement. Les courbes oranges représentent l'évolution du nombre de neurones, G, A et P sous l'influence du GOF.

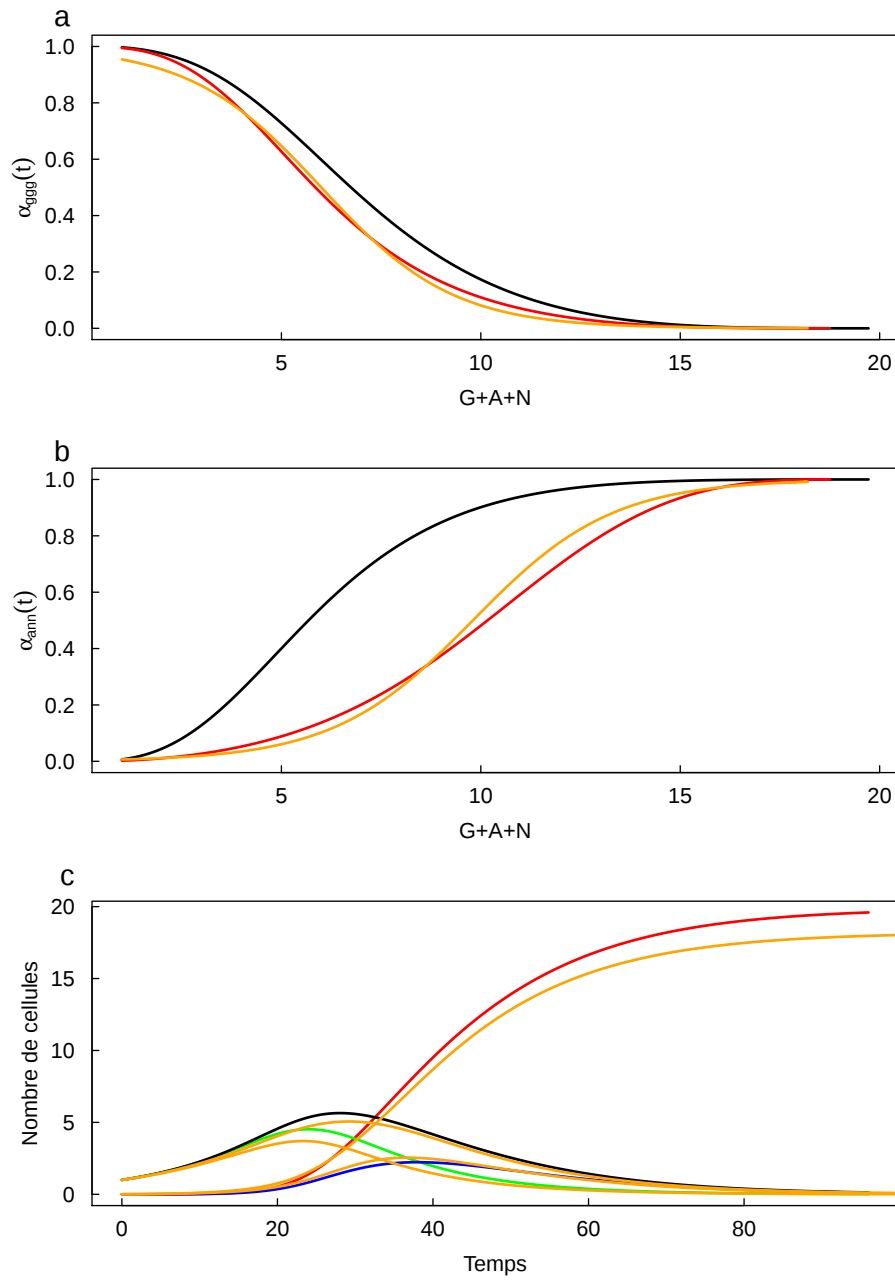


FIGURE 5.18 – Effet d'un GoF en CDC25B-ΔCDK sur le système GAN. Mêmes conventions que la figure 5.17.

Chapitre 6

Conclusions et perspectives

6.1 Déplacements collectifs : utilité de la modélisation

Dans la première partie du document, j'ai présenté la méthodologie de modélisation pratiquée dans l'environnement scientifique dans lequel j'ai évolué pendant cette thèse, en m'appuyant sur mon travail sur le déplacement collectif chez les moutons. Ce premier travail était un exemple parfait pour me former à la démarche du passage de l'échelle individuelle vers l'échelle collective, et pour illustrer cette démarche.

Le premier travail fut de bien définir la question précise à laquelle on cherchait à répondre : il s'agissait de comprendre les interactions comportementales entre individus qui permettent la cohésion à l'échelle du groupe en déplacement. Nous avons ensuite énoncé verbalement un modèle comportemental à l'échelle individuelle en nous appuyant sur des données expérimentales, et sur les propositions de modèles énoncés précédemment. Ce modèle comportemental a été formalisé et calibré sur les données. En traduisant ce modèle comportemental individuel dans un modèle en densité, nous avons pu mettre en évidence l'émergence d'un comportement collectif particulier : la propagation de la densité sous la forme d'une vague solitaire se propageant à vitesse constante. Une caractéristique remarquable de ce comportement est que cette vague de densité est composée d'une superposition d'individus à l'arrêt et d'individus en mouvement, la vitesse de propagation collective résultant de la pondération entre ces deux populations sous-jacentes.

Cette modélisation aux deux échelles ouvre de nouvelles questions : Qu'est-ce qui pilote le comportement de départ spontané quand un individu s'éloigne en premier de son groupe alors qu'il semble quitter la situation favorable associée à la vie en groupe ? Qu'est-ce qui pilote la valeur des paramètres d'imitation mutuelle ? Sont-elles constantes au cours du temps pour une race de moutons, ou dépendent-elles de facteurs environnementaux tels que l'abondance en nourriture, la saison, la température ?

Par ailleurs, les phénomènes de propagation sous forme de vagues solitaires sont classiques dans bien d'autres domaines (en optique non linéaire ou en mécanique des fluides par exemple). La modélisation et la formalisation montrent ici un intérêt particulier : celui de s'abstraire du phénomène (de sa manifestation physique / biologique particulière), pour permettre de considérer en tant que telle la logique interne de la dynamique. Peut-on alors faire un lien théorique entre les modèles à l'échelle comportementale dans ces différents domaines en considérant qu'ils donnent un même comportement collectif émergent ?

6.2 Propositions pour l'embryogenèse de la moelle épinière : utilités de la modélisation

Dans la deuxième partie, j'ai exposé le travail principal de ma thèse : faire des propositions pour la modélisation du comportement cellulaire qui permettent de rendre compte de la dynamique des populations cellulaires lors de l'embryogenèse de la moelle épinière chez les vertébrés.

La démarche de modélisation est ici moins "classique" puisqu'il s'agissait de partir d'observations à l'échelle des populations pour arriver à une proposition de modèle comportemental à l'échelle cellulaire (sans pouvoir s'appuyer sur des "premiers principes" tels qu'ils sont disponibles en physique).

La première utilité de la modélisation a été là d'aider à l'interprétation des données. En effet, la collaboration avec les embryologistes a commencé avec une question sur les données : pouvait-on s'assurer de la cohérence entre les répartitions mesurées des modes de division (reflet des choix comportementaux à l'échelle cellulaire) et l'évolution des fractions progéniteurs/neurones correspondant à ces modes de division (la dynamique observée à l'échelle collective) ?

Comme la collaboration commençait entre J. Gautrais et moi d'une part et les embryologistes F. Pituello et E. Agius (et les autres membres de l'équipe Pituello) d'autre part, une grande part du travail a alors consisté en des séances collectives au tableau pour partager le vocabulaire, et gagner en explicitation sur le contenu des termes les plus employés. En ce sens, la modélisation telle que nous l'avons pratiquée n'a pas consisté à plaquer des modèles mathématiques arbitraires sur une série de données (une modélisation qui aurait été indépendante de la discipline d'origine), mais à expliciter le modèle verbal élaboré et raffiné par les embryologistes au cours de leurs recherches, et qui restait pour une grande part implicite.¹

Une fois ce modèle verbal complètement énoncé, nous avons pu formaliser un premier modèle d'évolution des populations de cellules sur 24h et appliquer toutes les méthodes d'analyses nécessaires pour répondre à la question. Les résultats théoriques de cette modélisation sont venus en soutien de l'interprétation des résultats expérimentaux en faveur d'une fonction non cycle-cellulaire-dépendante de la phosphatase CDC25B.

En m'appuyant sur ce premier modèle, j'ai pu le généraliser à toute la durée du processus de formation de la moelle épinière, avec l'idée de proposer un modèle de la dynamique d'évolution des populations de cellules présentes dans la moelle épinière. Cette généralisation s'est appuyée sur les données publiées par Saade et al. [58].

Une première conclusion de ce travail est un clair rejet de leur proposition biologique sur l'existence d'une transition brutale des modes de divisions à 73 hpf (un *switch* à l'échelle de la population).

Je propose au contraire de considérer plutôt l'existence d'un *switch* mais à l'échelle cellulaire, et qui se traduit par une transition douce à l'échelle de la population bien mieux compatible avec les données expérimentales. La modélisation permet ici d'explorer des modèles sous-jacents à la dynamique observable, avec des différenciations comportementales non observables, mais qui permettent d'expliquer la dynamique observée avec une plus grande simplicité. La modélisation a donc permis d'ouvrir de nouvelles questions en proposant un modèle à l'échelle cellulaire qui n'est plus un

1. Dans cette pratique, la modélisation commence donc par le dialogue entre les pratiquants de chaque discipline, à la formation mutuelle aux concepts de chaque champ, ce qui permet à chacun de gagner en explicitation sur les concepts qu'on manipule au quotidien sans les interroger tous les jours.

reflet direct des données mesurées à l'échelle du tissu. On peut considérer que ces dernières sont une propriété émergente du modèle comportemental cellulaire.

Ce mécanisme de *switch* cellulaire reposerait sur un phénomène de restriction du destin cellulaire où les cellules issues d'une division asymétrique neurogénique (produisant un neurone et une cellule continuant à cycler) perdraient leur pouvoir prolifératif. Cette proposition permet de rendre compte de la dynamique du système d'une façon simple, ainsi que d'interpréter plus simplement les expériences de manipulation expérimentale de CDC25B.

Cette proposition demande évidemment à être attaquée expérimentalement, ce qui demande d'imaginer un dispositif expérimental qui permettrait de trancher. Des techniques expérimentales nouvellement mises au point dans l'équipe de F. Pituello ouvrent des perspectives sur ce point, en particulier la possibilité de suivre *in vivo* des lignées cellulaires à l'échelle individuelle. Le modèle pourra aussi servir, dans ce cadre, à tester la sensibilité du protocole à la quantité de données à récolter.

Le dernier chapitre, plus spéculatif, ouvre la question du contrôle de l'évolution des modes de divisions en fonction de l'état du système lui-même et non plus comme une fonction du temps indépendante. Un résumé de cette proposition de modèle est donnée à la section 6.5.

La robustesse du scénario que nous avons retenu (un rétro-contrôle par la taille de la population), sa simplicité logique et sa puissance de régulation, sont suffisantes pour appeler des travaux complémentaires. Comme nous sommes en présence d'un système complexe où tous les acteurs intervenant dans le contrôle de la formation de la moelle épinière interagissent entre eux et se contrôlent par des boucles de rétroaction, de nombreux mécanismes à l'échelle cellulaire pourraient implémenter ce rétro-contrôle. Si le couplage que nous proposons est effectivement implémenté dans le système biologique, il faut que chaque progéniteur puisse être sensible à un signal proportionnel à l'effectif total de la population. Les mécanismes biologiques permettant un tel couplage restent à explorer en collaboration avec les embryologistes.

6.3 Prolongation vers les aspects spatiaux dans la moelle épinière

Dans le travail présenté dans ce mémoire, je n'ai présenté que les aspects temporels de la dynamique de la formation de la moelle épinière. Pour aller plus loin dans ce travail, la spatialisation du phénomène doit être abordée.

J'ai mentionné ce phénomène particulier que sont les mouvements interkinétiques des noyaux au cours du cycle cellulaire, et leur synchronisation avec les différentes phases du cycle. Il serait intéressant de mieux comprendre ce phénomène de migration interkinétique afin de gagner en compréhension sur l'implication de ce phénomène dans le destin cellulaire. Angie Molina, post doctorante dans l'équipe de Fabienne Pituello, travaille spécifiquement sur cette question, avec des expériences en live imaging où elle suit le déplacement des noyaux sur l'axe apico-basal. Ces suivis ont été réalisés dans les deux conditions expérimentales présentées pour CDC25B : sa surexpression, et la surexpression de sa forme incapable d'interagir avec sa cycline.

En contexte de surexpression de CDC25B, elle constate une répartition des noyaux qui est biaisée en faveur du pôle basal. Or nous avons vu que cette surexpression de CDC25b entraîne une différenciation précoce des progéniteurs en neurones. Il semble donc qu'il y ait un lien entre la migration interkinétique des noyaux et le devenir cellulaire. Or, nous savons par ailleurs que les morphogènes

impliqués dans le choix du destin cellulaire, tel que Sonic hedgehog, sont particulièrement présents au pôle basal. Ce lien pourrait donc venir d'un temps d'exposition des noyaux à ces morphogènes plus long en basal dans des conditions de surexpression de CDC25b par rapport au contrôle.

6.4 Prolongation vers les aspects temporels dans le cortex

Notre modèle de la dynamique d'évolution temporelle des progéniteurs et des neurones au cours du développement de la moelle épinière peut servir de base pour attaquer le système plus complexe qu'est le développement du cortex. Le cortex est la structure du cerveau constituant la substance grise périphérique des hémisphères cérébraux.

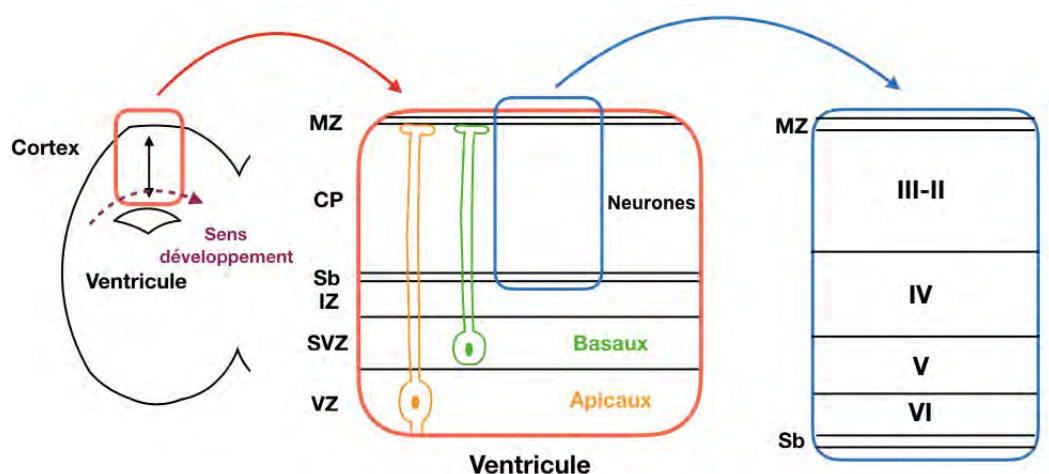


FIGURE 6.1 – Représentation très simplifiée de la morphogenèse du cortex.

Dans l'embryogenèse de cette structure, deux grandes classes de progéniteurs ont été identifiées : les progéniteurs Apicaux (notés A) dans la zone ventriculaire (VZ) et les progéniteurs Basaux (notés B) dans la zone subventriculaire (SVZ) (figure 6.1). Les progéniteurs apicaux sont attachés par leur pied au pôle apical et au pôle basal tandis que les progéniteurs basaux sont attachés uniquement au pôle basal.

Les neurones produits dans ces deux premières zones doivent traverser la zone intermédiaire (IZ) pour aller constituer la plaque corticale (CP) où ils finissent par s'organiser en couches distinctes (figure 6.1).

La parenté du processus avec celui de la morphogenèse de la moelle épinière est donc évidente.

Les deux types de progéniteurs ne vont pas réaliser les mêmes divisions. Les apicaux vont faire des divisions prolifératives (AA) uniquement durant les stades précoces, des divisions asymétriques (AN) qui ne participent pas pour beaucoup à la production finale de neurones et des divisions symétriques produisant des progéniteurs basaux (BB). Les progéniteurs basaux peuvent, quant à eux, réaliser deux types de divisions : des divisions proliférative (BB) et des divisions terminales (NN). Nous avons donc un système qui ressemble beaucoup aux systèmes à trois populations que nous avons proposés dans le cas de la moelle épinière. Il pourrait donc être intéressant de s'appuyer sur notre modélisation énoncée pour la moelle épinière pour attaquer la question de la dynamique temporelle de ces différentes populations dans le cortex.

6.5 Résumé de la proposition

Nous résumons notre proposition finale de modèle pour la dynamique de l'embryogenèse de la partie ventrale de la moelle épinière dans la figure 6.2.

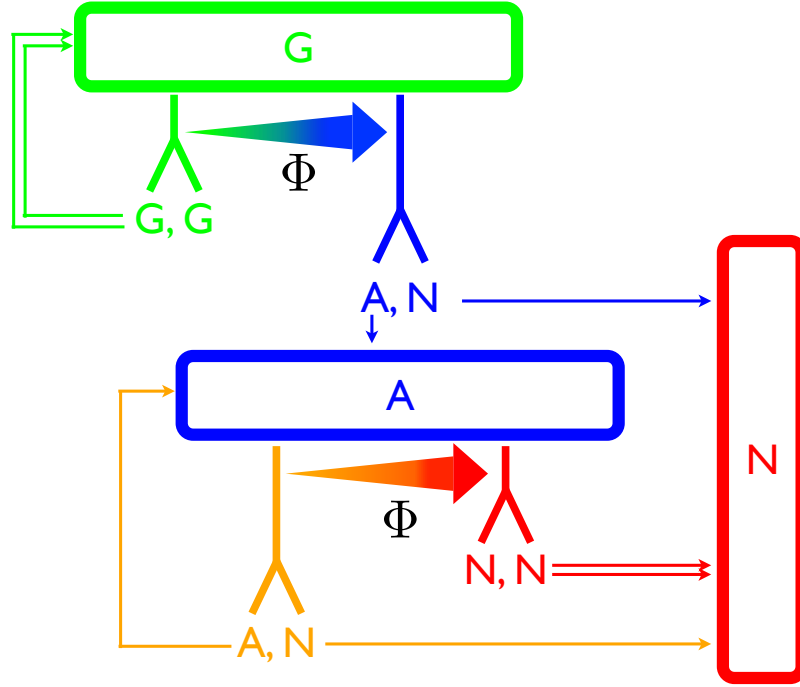


FIGURE 6.2 – Résumé de la proposition de modèle pour la dynamique de l'embryogenèse de la partie ventrale de la moelle épinière.

La première proposition est la structure même du modèle à trois populations (G, A, N) avec une perte du pouvoir prolifératif pour les progéniteurs de type A . La deuxième proposition porte sur la régulation de l'indice de prolifération ϕ comme un rétro-contrôle par l'état du système à chaque instant. Si nous considérons que l'effet du rétro-contrôle est le même sur les populations de G et de A , i.e. $\phi = \alpha_{GAN} - \alpha_{GGG} = \alpha_{ANN} - \alpha_{AAN}$, alors la dynamique du modèle 4.2 devient :

$$\begin{cases} \dot{G} = \eta (-\phi(G, A, N)) G \\ \dot{A} = \eta \frac{1}{2} (1 + \phi(G, A, N)) (G - A) \\ \dot{N} = \eta \left[\frac{1}{2} (1 + \phi(G, A, N)) (G + A) + A \right] \end{cases} \quad (6.1)$$

avec

$$\phi(G, A, N) = \tanh\left(\frac{G + A + N - \kappa}{\sigma}\right) \quad (6.2)$$

Le système (non linéaire autonome) est alors intégralement piloté par les trois paramètres η, κ et σ . Le temps caractéristique des évolutions est piloté par le couple η, σ qui affectent peu le nombre final de neurones. Le paramètre κ est la taille pivot de la population où la différenciation devient dominante et le nombre final de neurones est piloté essentiellement par sa valeur (il augmente avec κ).

Bibliographie

- [1] Agius, E., Bel-Vialar, S., Bonnet, F. & Pituello, F. 2015. Cell cycle and cell fate in the developing nervous system : The role of cdc25b phosphatase. *Cell and Tissue Research* **359** : 201–213. doi : 10.1007/s00441-014-1998-2.
- [2] Akai, J., Halley, P.A. & Storey, K.G. 2005. FGF-dependent Notch signaling maintains the spinal cord stem zone. *Genes and Development* **19** : 2877–2887. doi :10.1101/gad.357705.
- [3] Alvarez-Medina, R., Le Dreau, G., Ros, M. & Marti, E. 2009. Hedgehog activation is required upstream of Wnt signalling to control neural progenitor proliferation. *Development* **136** : 3301–3309. doi :10.1242/dev.041772.
- [4] Arai, Y., Pulvers, J.N., Haffner, C., Schilling, B., Nüsslein, I., Calegari, F. & Huttner, W.B. 2011. Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nature communications* **2** : 154. doi :10.1038/ncomms1155.
- [5] Balaskas, N., Ribeiro, A., Panovska, J., Dessaud, E., Sasai, N., Page, K.M., Briscoe, J. & Ribes, V. 2012. Gene regulatory logic for reading the sonic hedgehog signaling gradient in the vertebrate neural tube. *Cell* **148** : 273–284. doi :10.1016/j.cell.2011.10.047.
- [6] Beck, C.W., Christen, B. & Slack, J.M.W. 2003. Molecular pathways needed for regeneration of spinal cord and muscle in a vertebrate. *Developmental Cell* **5** : 429–439. doi :10.1016/S1534-5807(03)00233-8.
- [7] Benazeraf, B. 2005. *Titre : Contrôle de la prolifération cellulaire et développement du tube neural : régulation de l'expression des acteurs du cycle cellulaire Cycline D1 et CDC25B par le morphogène Shh* . Ph.D. thesis, University Paul Sabatier Toulouse III.
- [8] Bertrand, N., Médevielle, F. & Pituello, F. 2000. FGF signalling controls the timing of Pax6 activation in the neural tube. *Development (Cambridge, England)* **127** : 4837–4843.
- [9] Boutros, R. & Ducommun, B. 2008. Asymmetric localization of the CDC25B phosphatase to the mother centrosome during interphase. *Cell Cycle* **7** : 401–406. doi :10.4161/cc.7.3.5295.
- [10] Boutros, R., Lobjois, V. & Ducommun, B. 2007. CDC25 phosphatases in cancer cells : Key players? Good targets? *Nature Reviews Cancer* **7** : 495–507. doi :10.1038/nrc2169.
- [11] Briscoe, J., Chen, Y., Jessell, T.M. & Struhl, G. 2001. A hedgehog-insensitive form of Patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of Sonic hedgehog in the neural tube. *Molecular Cell* **7** : 1279–1291. doi :10.1016/S1097-2765(01)00271-4.

- [12] Briscoe, J. & Ericson, J. 1999. The specification of neuronal identity by graded Sonic Hedgehog signalling. *Semin Cell Dev Biol* **10** : 353–362. doi :10.1006/scdb.1999.0295.
- [13] Cardozo, M.J., Mysiak, K.S., Becker, T. & Becker, C.G. 2017. Reduce, reuse, recycle – Developmental signals in spinal cord regeneration. *Developmental Biology* **432** : 53–62. doi :10.1016/j.ydbio.2017.05.011.
- [14] Choudhry, Z., Rikani, A.A., Choudhry, A.M., Tariq, S., Zakaria, F., Asghar, M.W., Sarfraz, M.K., Haider, K., Shafiq, A.A. & Mobassarrah, N.J. 2014. Sonic hedgehog signalling pathway : a complex network. *Ann Neurosci* **21** : 28–31. doi :10.5214/ans.0972.7531.210109.
- [15] Cohen, M., Kicheva, A., Ribeiro, A., Blassberg, R., Page, K.M., Barnes, C.P. & Briscoe, J. 2015. Ptch1 and Gli regulate Shh signalling dynamics via multiple mechanisms. *Nature Communications* **6** : 1–12. doi :10.1038/ncomms7709.
- [16] Danesin, C. & Soula, C. 2017. Moving the Shh Source over Time : What Impact on Neural Cell Diversification in the Developing Spinal Cord? *Journal of Developmental Biology* **5** : 4. doi : 10.3390/jdb5020004.
- [17] Davezac, N., Baldin, V., Gabrielli, B., Forrest, A., Theis-Febvre, N., Yashida, M. & Ducommun, B. 2000. Regulation of CDC25B phosphatases subcellular localization. *Oncogene* **19** : 2179–2185. doi :10.1038/sj.onc.1203545.
- [18] Del Bene, F. 2011. Interkinetic nuclear migration : Cell cycle on the move. *EMBO Journal* **30** : 1676–1677. doi :10.1038/emboj.2011.114.
- [19] Del Bene, F., Wehman, A.M., Link, B.A. & Baier, H. 2008. Regulation of Neurogenesis by Interkinetic Nuclear Migration through an Apical-Basal Notch Gradient. *Cell* **134** : 1055–1065. doi :10.1016/j.cell.2008.07.017.
- [20] Dessaud, E., McMahon, A.P. & Briscoe, J. 2008. Pattern formation in the vertebrate neural tube : a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development* **135** : 2489–2503. doi :10.1242/dev.009324.
- [21] Dessaud, E., Ribes, V., Balaskas, N., Yang, L.L., Pierani, A., Kicheva, A., Novitch, B.G., Briscoe, J. & Sasai, N. 2010. Dynamic assignment and maintenance of positional identity in the ventral neural tube by the morphogen sonic hedgehog. *PLoS Biology* **8**. doi :10.1371/journal.pbio.1000382.
- [22] Dessaud, E., Yang, L.L., Hill, K., Cox, B., Ulloa, F., Ribeiro, A., Mynett, A., Novitch, B.G. & Briscoe, J. 2007. Interpretation of the sonic hedgehog morphogen gradient by a temporal adaptation mechanism. *Nature* **450** : 717–720. doi :10.1038/nature06347.
- [23] Donzelli, M. & Draetta, G.F. 2003. Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO reports* **4** : 671–677. doi :10.1038/sj.embor.embor887.
- [24] Doze, V.A. & Perez, D.M. 2012. G-Protein-Coupled Receptors in Adult Neurogenesis. *Pharmacological Reviews* **64** : 645–675. doi :10.1124/pr.111.004762.

- [25] Dutertre, S. 2004. Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *Journal of Cell Science* **117** : 2523–2531. doi :10.1242/jcs.01108.
- [26] Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H. & Jessell, T.M. 1996. Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* **87** : 661–673. doi :S0092-8674(00)81386-0[pil].
- [27] Erskine, L., Patel, K. & Clarke, J.D.W. 1998. Progenitor dispersal and the origin of early neuronal phenotypes in the chick embryo spinal cord. *Developmental Biology* **199** : 26–41. doi :10.1006/dbio.1998.8912.
- [28] Farreny, M.a., Agius, E., Bel-vialar, S., Escalas, N., Khouri-farah, N., Soukkarieh, C., Danesin, C., Pituello, F., Cochard, P. & Soula, C. 2018. FGF signaling controls Shh-dependent oligodendroglial fate specification in the ventral spinal cord. *Neural Development* pp. 1–19.
- [29] Franz, M., Spiegel, K., Umbreit, C., Richter, P., Codina-Canet, C., Berndt, A., Altendorf-Hofmann, A., Koscielny, S., Hyckel, P., Kosmehl, H., Virtanen, I. & Berndt, A. 2009. Expression of Snail is associated with myofibroblast phenotype development in oral squamous cell carcinoma. *Histochemistry and Cell Biology* **131** : 651–660. doi :10.1007/s00418-009-0559-3.
- [30] Giles, N., Forrest, A. & Gabrielli, B. 2003. 14-3-3 Acts as an intramolecular bridge to regulate cdc25b localization and activity. *Journal of Biological Chemistry* **278** : 28580–28587. doi :10.1074/jbc.M304027200.
- [31] Gruber, R., Zhou, Z., Sukchev, M., Joerss, T., Frappart, P.O. & Wang, Z.Q. 2011. MCPH1 regulates the neuroprogenitor division mode by coupling the centrosomal cycle with mitotic entry through the Chk1-Cdc25 pathway. *Nature Cell Biology* **13** : 1325–1334. doi :10.1038/ncb2342.
- [32] Hamburger, V. & Hamilton, H. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental Dynamics* **88** : 49–92. doi :10.1002/aja.1001950404.
- [33] Huang, P., Xiong, F., Megason, S.G. & Schier, A.F. 2012. Attenuation of Notch and hedgehog signaling is required for fate specification in the spinal cord. *PLoS Genetics* **8**. doi :10.1371/journal.pgen.1002762.
- [34] Jacob, J. & Briscoe, J. 2003. Gli proteins and the control of spinal-cord patterning. *EMBO Reports* **4** : 761–765. doi :10.1038/sj.embor.embor896.
- [35] Lammer, C., Wagerer, S., Saffrich, R., Mertens, D., Ansorge, W. & Hoffmann, I. 1998. The cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells. *Journal of cell science* **111** : 2445–53.
- [36] Lange, C. & Calegari, F. 2010. Cdks and cyclins link G1 length and differentiation of embryonic, neural and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle* **9** : 1893–1900. doi :10.4161/cc.9.10.11598.
- [37] Lara-Ramírez, R., Zieger, E. & Schubert, M. 2013. Retinoic acid signaling in spinal cord development. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **45** : 1302–1313. doi : 10.1016/j.biocel.2013.04.002.

- [38] Le Dréau, G. & Martí, E. 2012. Dorsal-ventral patterning of the neural tube : A tale of three signals. *Developmental Neurobiology* **72** : 1471–1481. doi :10.1002/dneu.22015.
- [39] Le Dréau, G., Saade, M., Gutiérrez-Vallejo, I. & Martí, E. 2014. The strength of SMAD1/5 activity determines the mode of stem cell division in the developing spinal cord. *Journal of Cell Biology* **204** : 591–605. doi :10.1083/jcb.201307031.
- [40] Leber, S.M. & Sanes, J.R. 1995. Migratory paths of neurons and glia in the embryonic chick spinal cord. *Journal of Neuroscience* **15** : 1236–1248.
- [41] Lobjois, V., Benazeraf, B., Bertrand, N., Medevielle, F. & Pituello, F. 2004. Specific regulation of cyclins D1 and D2 by FGF and Shh signaling coordinates cell cycle progression, patterning, and differentiation during early steps of spinal cord development. *Developmental Biology* **273** : 195–209. doi :10.1016/j.ydbio.2004.05.031.
- [42] Lukaszewicz, A.I. & Anderson, D.J. 2011. Cyclin D1 promotes neurogenesis in the developing spinal cord in a cell cycle-independent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108** : 11632–11637. doi :10.1073/pnas.1106230108.
- [43] Lupo, G., Harris, W.A. & Lewis, K.E. 2006. Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system. *Nature Reviews Neuroscience* **7** : 103–114. doi :10.1038/nrn1843.
- [44] Megason, S.G. & McMahon, A.P. 2002. A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. *Development (Cambridge, England)* **129** : 2087–2098.
- [45] Molina, A. & Pituello, F. 2017. Playing with the cell cycle to build the spinal cord. *Developmental Biology* **432** : 14–23. doi :10.1016/j.ydbio.2016.12.022.
- [46] Morales, A.V., Espeso-Gil, S., Ocaña, I., Nieto-Lopez, E., Calleja, E., Bovolenta, P., Lewandoski, M. & Diez del Corral, R. 2016. FGF signaling enhances a sonic hedgehog negative feedback loop at the initiation of spinal cord ventral patterning. *Developmental Neurobiology* **76** : 956–971. doi :10.1002/dneu.22368.
- [47] Muhr, J., Graziano, E., Wilson, S., Jessell, T.M. & Edlund, T. 1999. Convergent inductive signals specify midbrain, hindbrain, and spinal cord identity in Gastrula stage chick embryos. *Neuron* **23** : 689–702. doi :10.1016/S0896-6273(01)80028-3.
- [48] Murciano, A., Zamora, J., López-Sánchez, J. & Frade, J.M. 2002. Interkinetic nuclear movement may provide spatial clues to the regulation of neurogenesis. *Molecular and Cellular Neuroscience* **21** : 285–300. doi :10.1006/mcne.2002.1174.
- [49] Nowakowski, R., Caviness, V., Takahashi, T. & Hayes, N. 2002. Population dynamics during cell proliferation and neurogenesis in the developing murine neocortex.
- [50] Olivera-Martinez, I. & Storey, K.G. 2007. Wnt signals provide a timing mechanism for the FGF-retinoid differentiation switch during vertebrate body axis extension. *Development* **134** : 2125–2135. doi :10.1242/dev.000216.

- [51] Peco, E., Escude, T., Agius, E., Sabado, V., Medevielle, F., Ducommun, B. & Pituello, F. 2012. The CDC25B phosphatase shortens the G2 phase of neural progenitors and promotes efficient neuron production. *Development (Cambridge, England)* **139** : 1095–104. doi :10.1242/dev.068569.
- [52] Qian, X., Davis, A.A., Goderie, S.K. & Temple, S. 1997. FGF2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells. *Neuron* **18** : 81–93. doi :10.1016/S0896-6273(01)80048-9.
- [53] Reis, T. & Edgar, B.A. 2004. Negative regulation of dE2F1 by cyclin-dependent kinases controls cell cycle timing. *Cell* **117** : 253–264. doi :10.1016/S0092-8674(04)00247-8.
- [54] Ribes, V., Balaskas, N., Sasai, N., Cruz, C., Dessaud, E., Cayuso, J., Tozer, S., Yang, L.L., Novitch, B., Marti, E. & Briscoe, J. 2010. Distinct Sonic Hedgehog signaling dynamics specify floor plate and ventral neuronal progenitors in the vertebrate neural tube. *Genes and Development* **24** : 1186–1200. doi :10.1101/gad.559910.
- [55] Ribes, V., Le Roux, I., Rhinn, M., Schuhbaur, B. & Dolle, P. 2009. Early mouse caudal development relies on crosstalk between retinoic acid, Shh and Fgf signalling pathways. *Development* **136** : 665–676. doi :10.1242/dev.016204.
- [56] Roelink, H., Porter, J.A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D.T., Beachy, P.A. & Jessell, T.M. 1995. Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* **81** : 445–455. doi :10.1016/0092-8674(95)90397-6.
- [57] Saade, M., Gonzalez-Gobartt, E., Escalona, R., Usieto, S. & Martí, E. 2017. Shh-mediated centrosomal recruitment of PKA promotes symmetric proliferative neuroepithelial cell division. *Nature Cell Biology* **19** : 493–503. doi :10.1038/ncb3512.
- [58] Saade, M., Gutiérrez-Vallejo, I., LeDréau, G., Rabadán, M.A., Miguez, D.G., Buceta, J. & Martí, E. 2013. Sonic hedgehog signaling switches the mode of division in the developing nervous system. *Cell Reports* **4** : 492–503. doi :10.1016/j.celrep.2013.06.038.
- [59] Schmitt, E., Boutros, R., Froment, C., Monsarrat, B., Ducommun, B. & Dozier, C. 2006. CHK1 phosphorylates CDC25B during the cell cycle in the absence of DNA damage. *Journal of cell science* **119** : 4269–4275. doi :10.1242/jcs.03200.
- [60] Sherr, C.J., Beach, D. & Shapiro, G.I. 2016. Targeting CDK4 and CDK6 : From discovery to therapy. *Cancer Discovery* **6** : 353–367. doi :10.1158/2159-8290.CD-15-0894.
- [61] Soufi, A. & Dalton, S. 2016. Cycling through developmental decisions : how cell cycle dynamics control pluripotency, differentiation and reprogramming. *Development* **143** : 4301–4311. doi : 10.1242/dev.142075.
- [62] Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N., Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R. & Berneman, Z.N. 2003. The cell cycle : a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation* **36** : 131–149. doi :10.1306/74D715D2-2B21-11D7-8648000102C1865D.

- [63] Wijgerde, M., McMahon, J.A., Rule, M. & McMahon, A.P. 2002. A direct requirement for hedgehog signaling for normal specification of all ventral progenitor domains in the presumptive mammalian spinal cord. *Genes and Development* **16** : 2849–2864. doi :10.1101/gad.1025702.
- [64] Wilcock, A.C., Swedlow, J.R. & Storey, K.G. 2007. Mitotic spindle orientation distinguishes stem cell and terminal modes of neuron production in the early spinal cord. *Development (Cambridge, England)* **134** : 1943–1954. doi :10.1242/dev.002519.
- [65] Zechner, D., Fujita, Y., Hülsken, J., Müller, T., Walther, I., Taketo, M.M., Crenshaw, E.B., Birchmeier, W. & Birchmeier, C. 2003. Beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system. *Developmental Biology* **258** : 406–418. doi :10.1016/S0012-1606(03)00123-4.

Chapitre 7

Articles

7.1 Article : Traveling pulse emerges from coupled intermittent walks : a case study in sheep, Azaïs et al. *PLoS ONE* 2018.

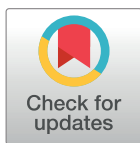
RESEARCH ARTICLE

Traveling pulse emerges from coupled intermittent walks: A case study in sheep

Manon Azaïs¹, Stéphane Blanco², Richard Bon¹, Richard Fournier², Marie-Hélène Pillot¹, Jacques Gautrais^{1*}

1 Centre de Recherches sur la Cognition Animale (CRCA), Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse, CNRS, UPS, France, **2** LAPLACE, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, Toulouse, France

* jacques.gautrais@univ-tlse3.fr



Abstract

Monitoring small groups of sheep in spontaneous evolution in the field, we decipher behavioural rules that sheep follow at the individual scale in order to sustain collective motion. Individuals alternate grazing mode at null speed and moving mode at walking speed, so cohesive motion stems from synchronising when they decide to switch between the two modes. We propose a model for the individual decision making process, based on switching rates between stopped / walking states that depend on behind / ahead locations and states of the others. We parametrize this model from data. Next, we translate this (microscopic) individual-based model into its density-flow (macroscopic) equations counterpart. Numerical solving these equations display a traveling pulse propagating at constant speed even though each individual is at any moment either stopped or walking. Considering the minimal model embedded in these equations, we derive analytically the steady shape of the pulse (sech square). The parameters of the pulse (shape and speed) are expressed as functions of individual parameters. This pulse emerges from the non linear coupling of start/stop individual decisions which compensate exactly for diffusion and promotes a steady ratio of walking / stopped individuals, which in turn determines the traveling speed of the pulse. The system seems to converge to this pulse from any initial condition, and to recover the pulse after perturbation. This gives a high robustness to this coordination mechanism.

OPEN ACCESS

Citation: Azaïs M, Blanco S, Bon R, Fournier R, Pillot M-H, Gautrais J (2018) Traveling pulse emerges from coupled intermittent walks: A case study in sheep. PLoS ONE 13(12): e0206817. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206817>

Editor: Manoj Srinivasan, The Ohio State University, UNITED STATES

Received: July 7, 2018

Accepted: October 20, 2018

Published: December 5, 2018

Copyright: © 2018 Azaïs et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: MHP, JG and RB received funding from the French Agence Nationale de la Recherche (ANR) Grant BLAN07-3 200418; www.agence-nationale-recherche.fr. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Behavioural mechanisms driving collective motion in animals and chemotactic bacteria have raised a sustained interest over the last twenty years [1–15]. Beyond attraction/repulsion basics, lots of studies have been devoted to understand how individuals coordinate their turns (velocity matching, in magnitude and direction), either considering a constant speed module [16, 17] or adaptive accelerations [18–20]. Data-based models have been proposed to understand mutual interactions within flocks and schools [17, 21–24], and how they translate into large-scale correlations and information propagation at the group scale [13, 25–28].

Here, we focus on a specific kind of speed coordination, namely for terrestrial animals who display intermittent motion [29]: at any time, an individual is either stopped (null speed), or it

is walking at a given constant speed. Such individual intermittent motion processes can combine into collective displays that could be poorly accounted for by continuous-speed models [30, 31]. In an intermittent walk, the behavioural decision is about the delay before switching from stopped to walking, and back, depending on the relative position and moving states of the others. In order to decipher the behavioural mechanisms at play so that intermittent-moving animals keep moving together, we studied small groups of sheep left alone grazing on their own on flat homogeneous pastures. Our purpose is first to confirm that their decision making process in spontaneous condition in the field can be modelled by extending a previous model that accounted for their decision making process in manipulative condition. Our second purpose is to derive a macroscopic model based on this microscopic (individual) behavioral rules [2–4, 6, 32, 33].

Biological background

We followed the spontaneous evolution of groups of $N = 2, 3, 4, 8$ Merino sheep, introduced in fence-delimited square pens (80×80 m) planted in flat irrigated pastures (groups of $N = 100$ sheep have also been monitored in the same series of experiments and have been the subject of a separate study, reported in a previous paper [30]).

After habituation time, the groups adopted a collective behaviour alternating phases of quasi-static grazing and phases of head-up walking (see [S1 Movie](#) for an illustration with a group of three sheep). There was a striking coordination of these phases among individuals, so that, most of time, a group is either found with all individuals grazing or all individuals walking. The collective grazing phases are characterised by individuals slightly moving and keeping very close to each others (within the meter). The collective walking phases are much shorter than grazing phases and can translocate the groups over several tens of meters.

Starting from a collective state when all individuals are stopped, a collective grazing period ends when one individual spontaneously departs away from the group. This departure triggers a reaction in the others, who switch in turn to the walking state and follow the initiator. The group then walks for a while until one of the sheep stops and resumes grazing, which in turn triggers the same behavioural switch in the others ([Fig 1a, 1b and 1c](#)). Since the characteristic duration of the grazing/moving periods are large compared to the duration of switching cascades ([Fig 1c](#)), collective transition events (collective departures or collective stops) are well defined.

Regarding the directional process, we observed that the followers always adopted a bearing matching the initiator's (they *followed* him, [Fig 1a](#)), so that we will not address here the orientational decision, taking for granted that the initiator chooses a bearing, that the followers will systematically mimic. We can thus consider the spatial progress of a group along the multi-segments trajectory of the group center of mass, indexing the individual positions by projecting their 2D positions onto the corresponding curvilinear abscissa along this group trajectory ([Fig 1b](#)). Doing this, the collective dynamics are idealised as individuals progressing in 1D towards positive abscissa ([Fig 1d](#)), and the question becomes to understand the mechanisms synchronising their switches from null-speed grazing to full-speed progression, and back ([Fig 1c](#)).

In previous studies, we have proposed an individual-based model to explain the collective dynamics of group departures [34, 35], and group stops [36] observed in a manipulative setup, using a remote control device to trigger the departure of a first (trained) individual [35, 36]. In this model, individuals are in two possible states: stopped or moving (at speed v). Their transitions from state to state are governed by a transition rate (probability switching state per unit time), which depends on the state configuration of the others. In [35], we only considered collective departures of naive individuals after the trained individual had departed. We had found

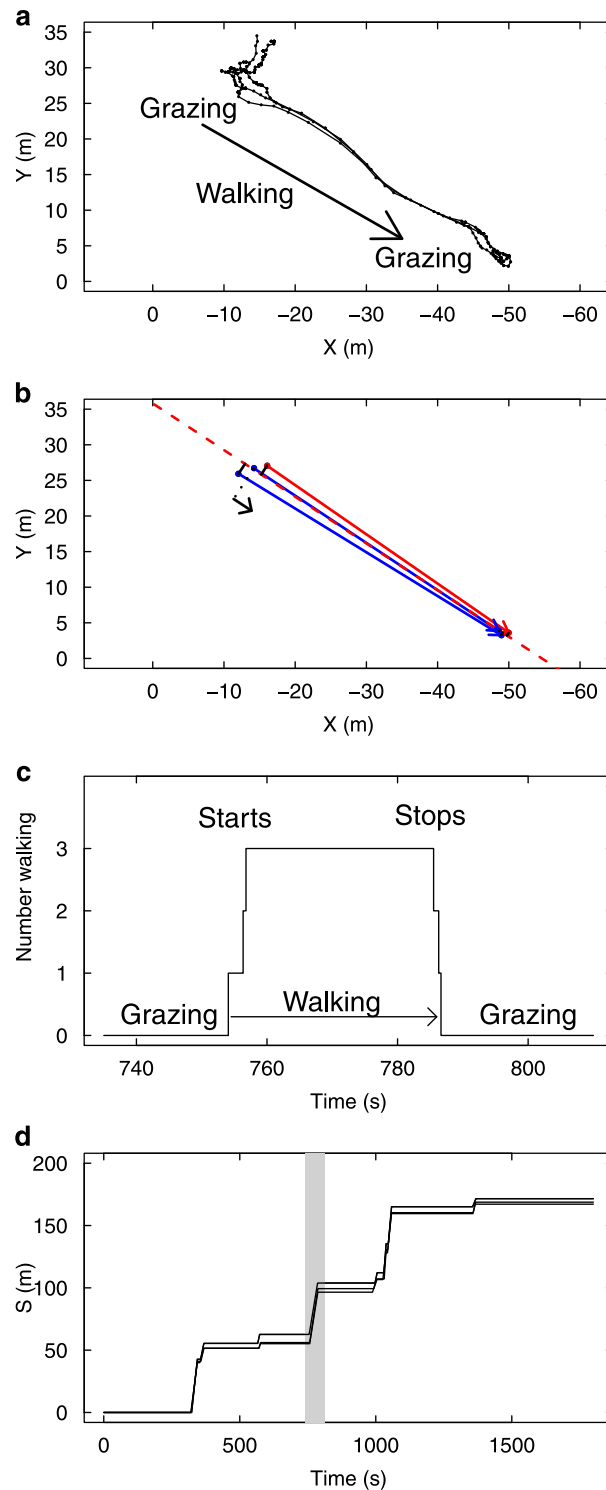


Fig 1. Coordination of motion illustrated in one experimental group of 3 sheep. The position and behaviour of each individual is monitored every 1s during 1800 s. The collective behaviour can be categorised as periods of collective grazing (individuals are about motionless) interspersed by periods of collective walking (high speed motion). (a) An extract of 70 s shows a typical event of collective transition from grazing to walking, leading to a spatial shift of

the group to a new location where individuals resume grazing. (b) The data are idealised by binarizing individual speed (0,1) and the motion is projected in 1D along the axis of collective motion. (c) The same event reported in time shows that the collective starts and stops are triggered by sheep synchronising their transition from grazing to walking (and back) within time windows by far shorter than typical duration of grazing / walking periods. (d) Time-space representation of group evolution in 1D. Alternating synchronously grazing/walking/grazing over large time (1800 s) lead to a collective intermittent progression along the curvilinear abscissa S of the group trajectory. The extracted event of 70 s is highlighted.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206817.g001>

a double mimetic effect based on the state of the others: departed individuals tend to stimulate stopped individuals to switch to moving while still stopped individuals tends to inhibit it. The higher the number of individuals that have already departed, the higher the rate to depart. The higher the number of individuals that are still stopped, the lower the rate to depart. We proposed then a formal dependence of the stopped-to-moving (activation) switching rate K_A , following:

$$K_A(A, I) = \alpha \frac{A^\beta}{I^\gamma} \quad (1)$$

where A denotes the number of moving individuals (departed, active) and I the number of stopped individuals (not departed, inactive). We checked in a later study [36] that the same double mimetic effect can explain as well how moving-to-stopped (inactivation) switchings escalate in a group of moving individuals to reach a consensus to stop.

In those previous studies, only one event (collective departure or collective stop) was monitored at a time, a trained individual was used to trigger the collective events and the model was purely temporal. To give account of groups behaviour in the present study, we start from the same model, to which we add two ingredients so that groups can chain multiple collective departures / collective stops as they meander spontaneously on the pasture.

The first ingredient accounts for the spontaneous switching rates, to allow a first individual to depart from a stopped group and a first individual to stop in a moving group.

A second ingredient is needed to introduce spatial effects. In the present setup (small groups on open pastures), it was obvious that each sheep can monitor every other one, so we do not introduce limited range of interaction (this point is discussed further in the [Discussion](#)), neither metric nor topologic [24]. As a proxy for the relevant information in sheep decisions, we consider only relative positions along the 1-dimensional group trajectory, so that one individual can make a difference between individuals ahead of him and individuals behind him. The states configuration of the others around can then be split into four pools: the individuals behind him that are stopped I^- , the ones behind him that are moving A^- , the ones ahead that are stopped I^+ and the ones ahead that are moving A^+ .

For the stopped-to-moving switching rates K_A (activation), the double mimetic effects become:

$$\begin{aligned} K_A(A^-, I^-, A^+, I^+) &= \mu_A + \alpha_A \frac{[A^+]^{\beta_A}}{[A^- + I^- + I^+]^{\gamma_A}} \\ &= \mu_A + \alpha_A \frac{[A^+]^{\beta_A}}{[N - A^+]^{\gamma_A}} \end{aligned} \quad (2)$$

and for the moving-to-stopped switching rates:

$$\begin{aligned} K_i(A^-, I^-, A^+, I^+) &= \mu_i + \alpha_i \frac{[I^-]^{\beta_i}}{[A^+ + A^- + I^+]^{\gamma_i}} \\ &= \mu_i + \alpha_i \frac{[I^-]^{\beta_i}}{[N - I^-]^{\gamma_i}} \end{aligned} \quad (3)$$

where we have considered that only neighbours ahead and moving, A^+ , are stimulating switches to motion (the others inhibiting it) and only stopped neighbours behind, I^- , are stimulating stopping decision of a moving animal (the others inhibiting it). This modeling choice is discussed further in the Discussion. In absence of stimulating individuals, the rates reduce to the spontaneous switching rates μ_A and μ_I .

Parameters estimation

In order to estimate the parameters for the stimulated part (α , β , γ), we collected all collective transition events from 1800-s movie sequences, combining group sizes to disentangle the two mimetic effects, as in [35, 36] (Table 1).

This functional dependence fitted with the experimental rates as nicely as in our previous studies (Fig 2a and 2c), and correctly predicted as well the duration of events depending on group size (Fig 2b and 2d).

The spontaneous rate of switching to the stopped state μ_I was straightforwardly retrieved from collective moves duration, and we found that it depends on the group size N , following:

$$\mu_I = \mu_I^*/N \quad (4)$$

with $\mu_I^* = 0.08 \text{ s}^{-1}$.

The spontaneous rate of switching to the walking state was practically impossible to estimate from data because small grazing moves and actual departures as an initiator were too difficult to discriminate. A reasonable estimate is however $\mu_A = 0.0055 \text{ (s}^{-1}\text{)}$, corresponding to a mean time of 3 minutes before next spontaneous departure. This estimate yields Monte Carlo realisations that singly compare favourably with experimental alternation of stopped / moving periods (Fig 3b vs. 3a), and on average with the distances covered by the groups over 1800 s (Fig 3d vs. 3c).

We note that this value is inevitably *ad hoc* for the present experimental conditions, and may vary a lot depending on the available resources, the animals' physiological state, the day hour, and the seasons. Still, the cohesion of collective departures and collective stops would poorly depend on μ_A , provided it remains low in front of the stimulating ingredient, which is well the case here ($\mu_A \ll \alpha_A$). Indeed, stochastic simulations show that this low value

Table 1. Individual parameters for the double mimetic effect.

Parameter	Stopped-to-Moving	Kept	Moving-to-Stopped	Kept
$\alpha \text{ (s}^{-1}\text{)}$	0.32 [0.25;0.41]	0.3	0.42 [0.33;0.54]	0.4
β	0.61 [0.44;0.78]	0.6	0.48 [0.31;0.65]	0.5
γ	0.71 [0.53;0.87]	0.7	0.54 [0.36;0.71]	0.5

Mean estimates and 95% CI are given for each parameter and for both kinds of transition. In Kept columns are reported the mean estimates rounded at the first decimal, which was retained in numerical simulations.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206817.t001>

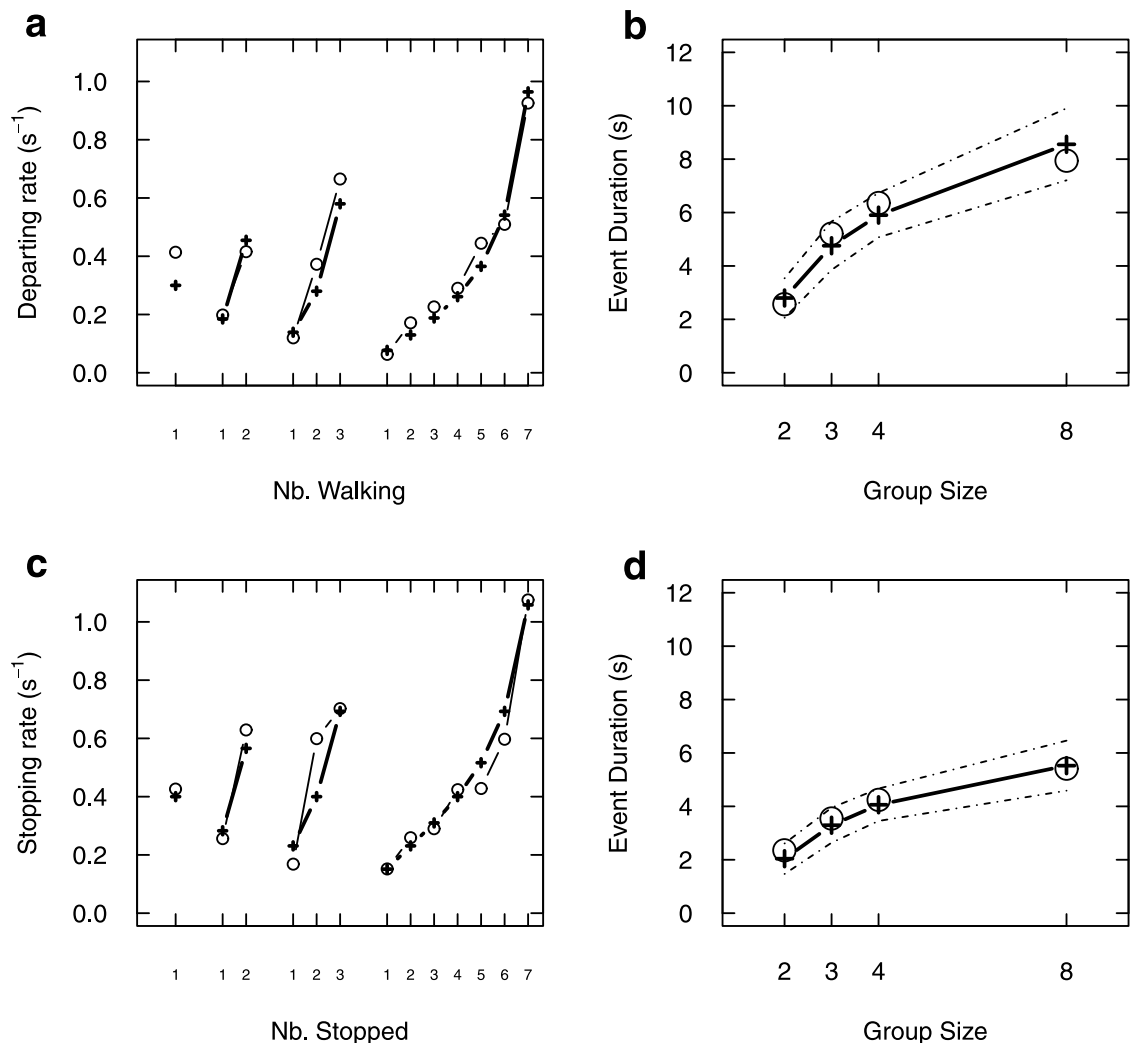


Fig 2. Mimetic amplification governs individual transition rates. (a) For each group size (2,3,4,8), we report the individual transition rate from stopped to moving as a function of the number of individuals moving ahead. This rate increases, indicating that individuals moving ahead have a positive feedback effect upon the propensity to follow them (stimulating effect). Note that, for a given number of departed individuals (e.g. 1), the rate decreases with group size, indicating an inhibitory effect of other individuals. Open circles: data, crosses: fitted rates. (b) For each group size, simulating collective departures using the fitted transition rates yields a correct prediction of the average event duration, from first start to last start, as a function of group size (10000 simulated events, dotted lines indicate 95% CI of the mean). (c) Same kind of data and fitted rates, but for the moving-to-stopped rates. While en route, stopping rates are positively enhanced by the number of individuals stopped behind (stimulating effect), together with a inhibitory effect of the others. (d) Events simulations also confirm that the fitted stopping rates yield correct predicted average event duration, from first stop to last stop, as a function of group size. Fitted parameters are indicated in Table 1.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206817.g002>

guarantees a sustained cohesion (see S2 Movie). In the opposite, for spontaneous rates dominant over coupling ($\mu_A \gg \alpha_A$), the groups would consistently disperse (see S3 Movie). We illustrate this continuous transition from mostly diffusive collective display (weak imitation) to mostly advective collective display (strong imitation) by varying the intensity of the imitation parameters over a large interval (Fig 4). The values estimated from experiments appear to maximize cohesion to the edge of crowding.

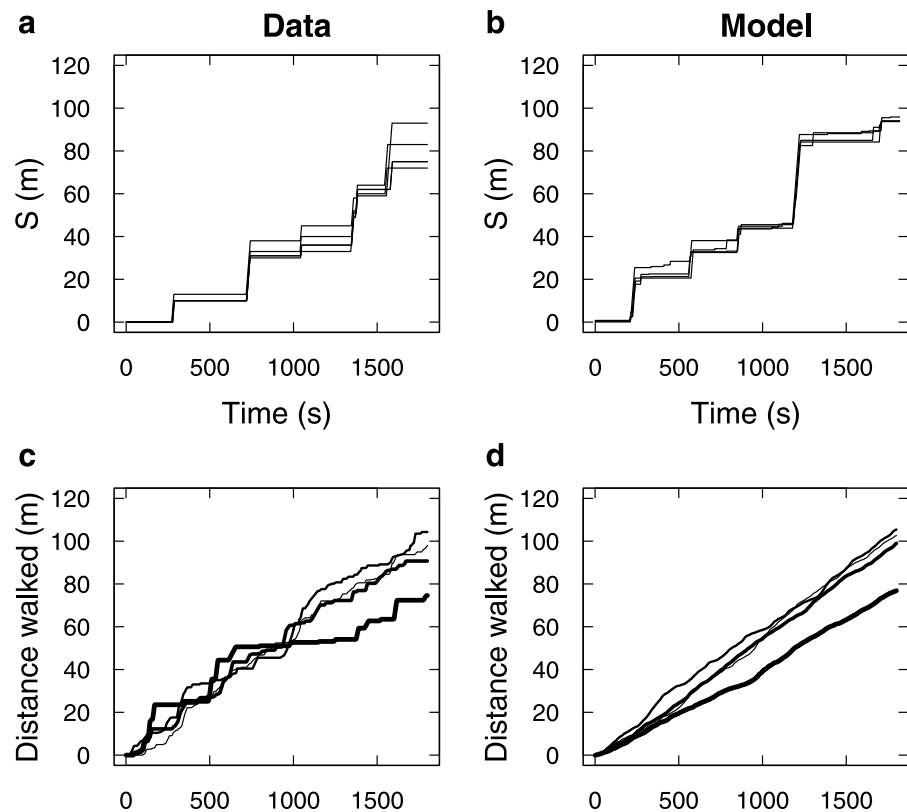


Fig 3. Individual-based model (IBM) prediction for 1D-propagation. (a) The evolution of one experimental group of 4 sheep is reported for illustration (same time-space representation as Fig 1d). (b) A typical evolution of a simulated 4-sheep group is reported for visual comparison with (a). This evolution is one stochastic realisation of the IBM, computed with an exact Monte Carlo (Gillespie algorithm) was used), using the fitted rates and $\mu_A = 0.0055 \text{ (s}^{-1}\text{)}$. (c) Average distance walked by experimental groups over 1800 s, for each group size separately (thinner line: $N = 2$, thicker line: $N = 8$). (d) Corresponding IBM predictions, averaging over 100 simulations per group size, like the one reported in (b).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206817.g003>

Overall, we advocate that the proposed model give a good account of the behavioural mechanism driving the sustained groups cohesion when small groups of sheep are left pasturing on their own.

Deriving the macroscopic model

We now turn to the theoretical study of this collective motion emerging from N individuals synchronizing their intermittent walks, should they be sheep or any other entities. The intriguing feature of this kind of collective motion is that *groups can be seen to progress as a whole at some fraction of the individual speed even though each individual is either stopped or moving at full speed at any time*. This is well illustrated in the S4 Movie, with a group of $N = 32$ sheep.

The interesting observables at collective level are then the collective speed at which groups propagate on the one hand, and how cohesive they remain in time on the other hand. To better understand how these collective observables emerge from individual behaviours, we translate the individual-based model exposed above into densities equations. In this aim, we provisionally admit that the model extends as it is to large groups. We first translate the model into the

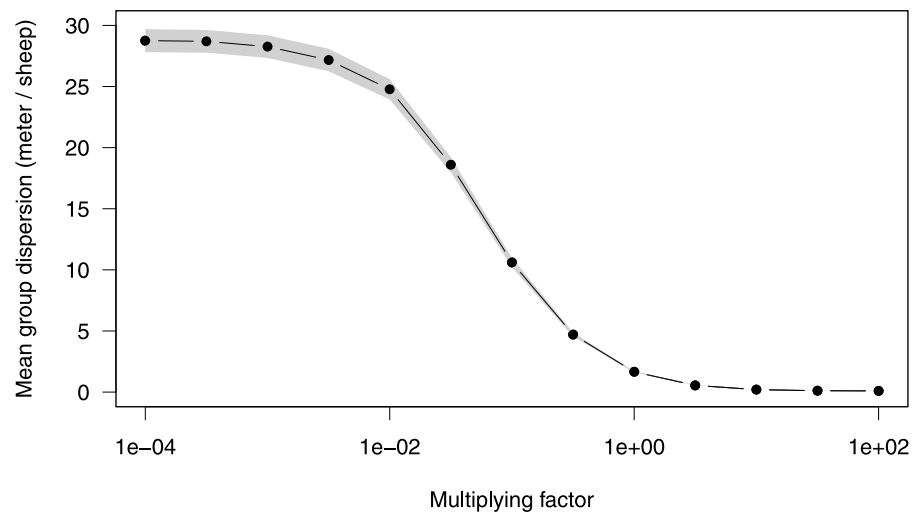


Fig 4. Predicted packing as a function of the intensity of the stimulating effect. To examine the transition from mostly diffusive regime to mostly advective regime, we varied the stimulation parameters α_A and α_I by a multiplying factor spanning from 10^{-4} to 10^2 (keeping the spontaneous parameters μ_A and μ_I constant). For each value, we collected the average dispersal of the groups from 1000 Monte Carlo simulations with $N = 4$ individuals at time $t = 1000$ s. The dispersion was estimated from the range of the positions divided by $N - 1$, giving the average distance between two neighbours (meters/sheep). To the left of abscissa ($\mu/\alpha \rightarrow \infty$), spontaneous switching dominates over imitation while to the right ($\mu/\alpha \rightarrow 0$), imitation is dominant. Group dispersion shows a smooth transition (over the log scale of the modulation factor) from the left where diffusion is completely dominant and saturating to the right where the packing of the group tends to 0. We note that in the latter limit, crowding effects should be taken into account. The biological values (modulation factor = 1) appears to favor maximally the cohesion (about one sheep every meter).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206817.g004>

corresponding Boltzmann equations, check for finite size effects and then derive the density-flow equations.

Boltzmann-like (kinetic) equations

Let $A(x, t)$ and $I(x, t)$ denote respectively the density of active (moving) and inactive (stopped) sheep at location x at time t . They evolve according to:

$$\begin{cases} \partial_t I(x, t) &= -K_A(x, t)I(x, t) + K_I(x, t)A(x, t) \\ \partial_t A(x, t) + v\partial_x A(x, t) &= +K_A(x, t)I(x, t) - K_I(x, t)A(x, t) \end{cases} \quad (5)$$

where $K_A(x, t)$ and $K_I(x, t)$ are respectively the conversion rates from stopped-to-moving (activation) and moving-to-stopped (inactivation) at location x at time t , which depend on A and I according to:

$$\begin{cases} K_A(x, t) &= \mu_A + \alpha_A \left[\int_x^\infty A(u, t) du \right]^{\beta_A} [N - \int_x^\infty A(u, t) du]^{-\gamma_A} \\ K_I(x, t) &= \mu_I + \alpha_I \left[\int_{-\infty}^x I(u, t) du \right]^{\beta_I} [N - \int_{-\infty}^x I(u, t) du]^{-\gamma_I} \end{cases} \quad (6)$$

with $N = \int_{-\infty}^\infty A(u, t) + I(u, t) du$ is the total amount of sheep (which is conserved in time), and parameters are those given in the individual-based model. This description in density is the direct translation of the individual model expressions (in the limit of continuum theory).

In absence of coupling ($\alpha_A = \alpha_I = 0$), the system would propagate like a linear advection-diffusion system (see S1 Fig). In presence of coupling ($\alpha_A \neq 0, \alpha_I \neq 0$), numerical resolution of

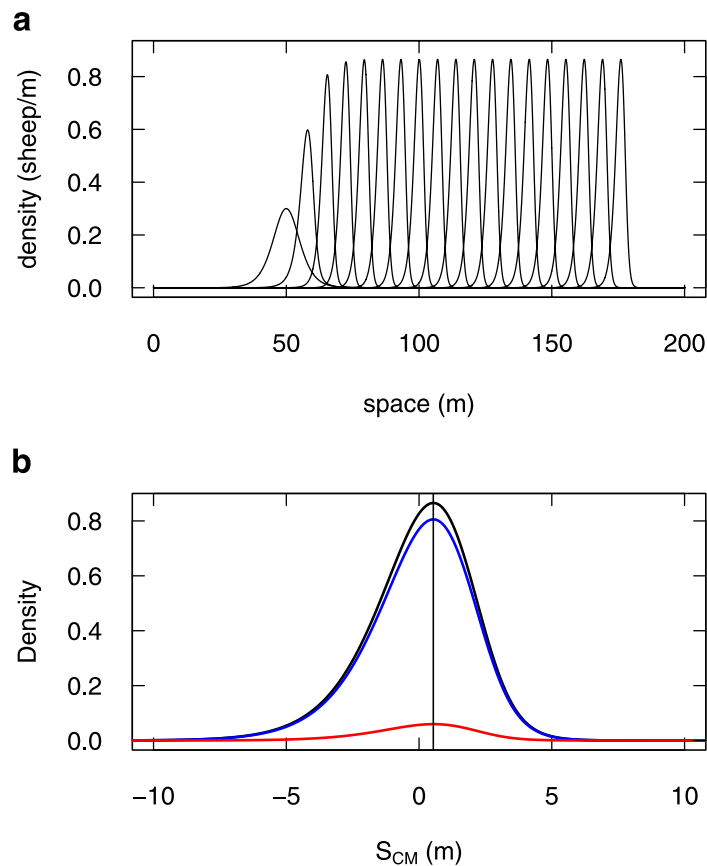


Fig 5. Density Model prediction for 1D-propagation. (a) The predicted evolution of a group of 4 sheep is the formation of a traveling pulse, which travels at constant speed, and with no dispersion (the leftmost profile is the initial condition, the rightmost profile is at time 1800 s, intermediate profiles are every 100 s; numerical solution of Eqs 5 and 6, with $\Delta t = 10^{-2}$ s). (b) The stabilised profile (black line, at time 1800 s) is zoomed out to show the density distribution around the group center of mass (0 abscissa). It displays a slight asymmetry (vertical line through the distribution peak for visual guidance), with an excess of density in the left tail (at the rear of the group). The underlying densities of stopped (blue) and moving (red) appear homogeneously proportional to the total.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206817.g005>

Eqs 5 and 6 shows that the density propagates as a cohesive traveling pulse (a solitary wave) [33, 37–39], with no dispersal (Fig 5). The system appears to converge asymptotically to this solution from various initial conditions (see examples in S5 Movie). We have not found initial conditions that would lead to another regime, and we do not see actually which other solution there could be.

Group size effects

In the classical view (e.g. in gas and fluid mechanics), the spatiotemporal density equations represent the evolution of a continuous mass. That would correspond here to a group of infinite size. In linear systems, it can also represent straightforwardly the average statistic of presence over an infinite number of stochastic replicates, in which case density becomes probability density of presence in space-time. In the present case, we deal with small groups governed by non linear mechanisms, so we had to ensure how well our Boltzmann equations

reflect the behaviour of groups. For this, we compared its predictions to individual-based model simulations.

In absence of coupling ($\alpha_A = \alpha_I = 0$), the system behaves as an advection-diffusion process (which is linear), and we found a perfect convergence of Monte Carlo simulations of the Individual-Based Model and numerical resolution of Eqs 5 and 6, as expected (see S2 Fig).

Since groups can progress at quite different average speeds (see S2 Movie), averaging plainly individual presence over replications would yield the same kind of advection-diffusion pattern (because of the dispersion of the groups centres of mass, namely the inter-group variance), and it would not capture the cohesion within each group (intra-group variance). To extricate inter-group variance from intra-group variance, we thus retained two separate statistics: the average speed of groups, and the internal dispersion within groups. The internal dispersion is computed taking individual abscissa relative to the center of mass of the group they belong to, group by group, so that we superimpose statistics of presence centred around the center of mass.

Considering large groups ($N = 100$), the numerical solution of Eqs 5 and 6 fit nicely with averages over Individual-Based Model (IBM) stochastic realisations, both for the internal dispersion (Fig 6a) and for the average speed (Fig 6c, $N = 100$).

Considering smaller groups (from $N = 32$ down to $N = 2$), we observe that the IBM estimation of internal dispersion tends to appear more symmetrical than the predicted continuous profile (Fig 6b, for $N = 4$). However, this finite size effect is only due to the observable itself because the center of mass computed from individuals' locations tend to be more stochastic in small groups. Indeed, if we sample groups of 4 positions from the continuous profile (Fig 6b, red curve), and compute the same statistic as we do from IBM predictions, both fit very well (Fig 6b, black curve).

In contrast, we observe a clear finite size effect regarding the average propagation speed (Fig 6c): the IBM realisations with small groups show slower propagation than predicted by Eqs 5 and 6, albeit both follow the same trend. This discrepancy will deserve further investigations in the future.

All in all, the Boltzmann equation captures the essential behaviour of groups as small as $N = 4$, and represents one group progressing at constant speed, and keeping its density unchanged at long time: on average, groups behave as a traveling pulse. Boltzmann equation could then be used directly to numerically explore properties of groups propagation depending on individual parameters, especially pulse shape and extension. In the next section, we start from it to progress toward an analytical solution.

Minimal model and analytical solution

In an approach by minimal model, we are interested to realise the very essence of the coupling between individual and collective scales that sustains the propagation of the pulse in the steady regime. To this end, we simplify as far as possible the model presented above by setting $\beta_A = \beta_I = 1$, and neglecting inhibitory effects: $\gamma_A = \gamma_I = 0$. Doing this, we keep only the two essential components: the spontaneous switch of speed (driven by μ_A and μ_I), and the stimulating effect of the others (driven by α_A and α_I).

To derive an analytical solution, we first translate the Boltzmann equations above into the corresponding “macroscopic” density-flow equations. We selected eventually two variables to describe this evolution. The dispersion can be described by the sum density of sheep $\eta(x, t)$ (moving and stopped) at location x at time t :

$$\eta(x, t) = A(x, t) + I(x, t) \quad (7)$$

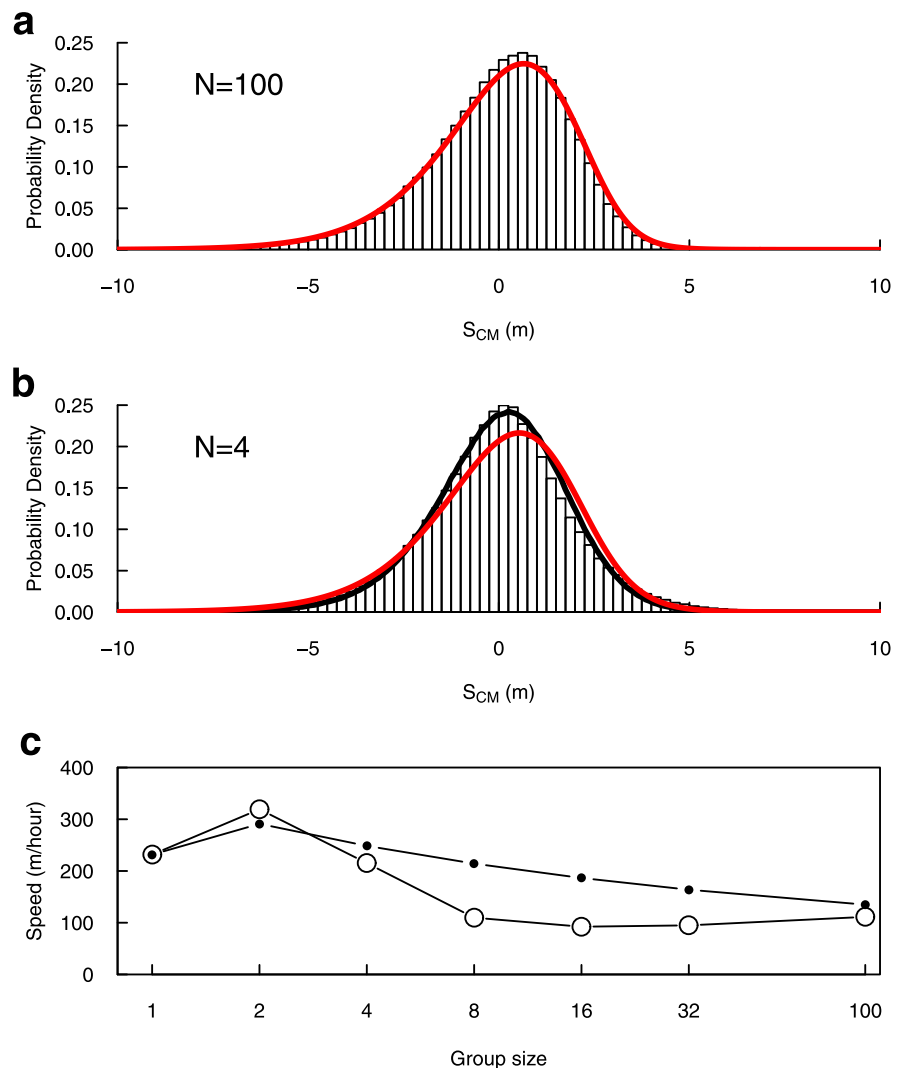


Fig 6. Density Model predictions vs. IBM predictions. (a) Histogram: statistics of presence around the center of mass of the group for $N = 100$, predicted from 300 IBM realisations; red line: numerical solution of Eqs 5 and 6 ($\Delta t = 10^{-2}$ s). (b) Histogram: statistics of presence around the center of mass of the group for $N = 4$, predicted from 10^6 IBM realisations; red line: numerical solution of Eqs 5 and 6 ($\Delta t = 10^{-2}$ s); black line: statistics of presence around the center of mass for groups of 4 positions sampled from the red curve, and applying the same procedure than the one used to obtain the histogram from IBM realisations (10^6 samples). (c) Predicted propagation speed depending on group size. Open dots: IBM predictions (error bars lie within the point size). Black dots: Density Model predictions.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206817.g006>

and the collective speed can be described by the moving fraction $\beta(x, t)$ at location x at time t :

$$\beta(x, t) = \frac{A(x, t)}{A(x, t) + I(x, t)} = \frac{A(x, t)}{\eta(x, t)} \quad (8)$$

the collective speed being $v\beta(x, t)$, where v is the speed at which a walking individual walks.

Next, we sought the combined conditions over the pair $(\eta(x, t), \beta(x, t))$ for a steady regime of the traveling pulse. We found one solution, combining a flat spatial profile for $\beta(x, t)$ and an equation governing the density profile $\eta(x, t)$ translated into $n(y)$ in a moving frame anchored

to the pulse peak (y indexing abscissa in the moving frame). This profile obeys:

$$(n')^2 - nn'' - \frac{\alpha_A + \alpha_I}{v} n^3 = 0 \quad (9)$$

where prime denotes regular derivative with respect to y .

A solution to Eq 9 is given by:

$$n(y) = \frac{1}{2} N \gamma \operatorname{sech}^2(\gamma y) \quad \text{with } \gamma = \frac{N(\alpha_A + \alpha_I)}{4v} \quad (10)$$

Full details for how we derived the analytical solution of this steady regime for the minimal model are given in [S1 Appendix](#).

The full expression of the steady regime for the pulse profile and the associated propagation speed in the field frame are then:

$$\begin{cases} \eta^s(x, t) = \frac{N N(\alpha_A + \alpha_I)}{2 \cdot 4v} \operatorname{sech}^2\left(\frac{N(\alpha_A + \alpha_I)}{4v} (x - b_s^* vt)\right) \\ \beta^s(x, t) = b_s^* = \frac{\left(\frac{N}{2}(\alpha_A - \alpha_I) - \mu_A - \mu_I\right) + \sqrt{\left(\frac{N}{2}(\alpha_A - \alpha_I) - \mu_A - \mu_I\right)^2 + 4\mu_A \frac{N}{2}(\alpha_A - \alpha_I)}}{N(\alpha_A - \alpha_I)} \end{cases} \quad (11)$$

when $\alpha_A \neq \alpha_I$.

In the symmetrical case where $\alpha_A = \alpha_I$, the steady regime solution simplifies to:

$$\begin{cases} \eta^s(x, t) = \frac{N N \alpha}{2 \cdot 2v} \operatorname{sech}^2\left(\frac{N \alpha}{2v} (x - b_s^* vt)\right) \\ \beta^s(x, t) = b_s^* = \mu_A / (\mu_A + \mu_I) \end{cases} \quad (12)$$

The shape of the pulse depends on individual speed v , reaction terms α_A and α_I and group size N , while the propagation speed of the pulse also depends on the spontaneous switching rates μ_A and μ_I . Sensitivity of the latter to some parameters is illustrated in next section.

This solution is well in accordance with the numerical predictions of the Boltzmann expression Eqs 5 and 6, for different parameters α_* . As a steady regime, it would propagate unchanged if the system starts from it, and it is the solution towards which the system tends asymptotically if it starts from a different initial condition (see [S6 Movie](#) in which we have superimposed this analytical solution in red upon the numerical prediction in black). Whether the basin of attraction of this steady regime is indeed the whole phase space and how fast the system tends to it depending on parameters are open questions that would deserve further work (see e.g. [40, 41] for conservative solitons, and [38, 39, 42, 43] for dissipative solitons).

Sensitivity of the moving fraction to parameters

The collective behaviour of first interest is the mean speed at which groups propagate, and it is a direct reflect of the moving fraction, given by Eq 11. In the general case, this moving fraction depends upon two kinds of parameters:

1. The rates of spontaneous switching μ_A and μ_I : in terms of individual behaviour, these rates govern the propensity for an individual to be the first to depart from a stopped group, respectively the propensity for an individual to be the first to stop in a moving group.

- The imitation rates α_A and α_I : in terms of individual behaviour, these rates govern the propensity for a stopped individual to imitate departing individuals, respectively the propensity for a moving individual to imitate stopping individuals.

Fig 7 reports the moving fraction as a function of group size, varying the parameters.

As mentioned above, in the case of symmetrical imitations, the moving fraction b_s^* appears to depend only on the rates of spontaneous switching μ_A and μ_I and in this particular case, it would not depend on the group size N (Fig 7a, black curve). In the asymmetric cases, the moving fraction also depends on imitation rates and on group size. Promoting departure

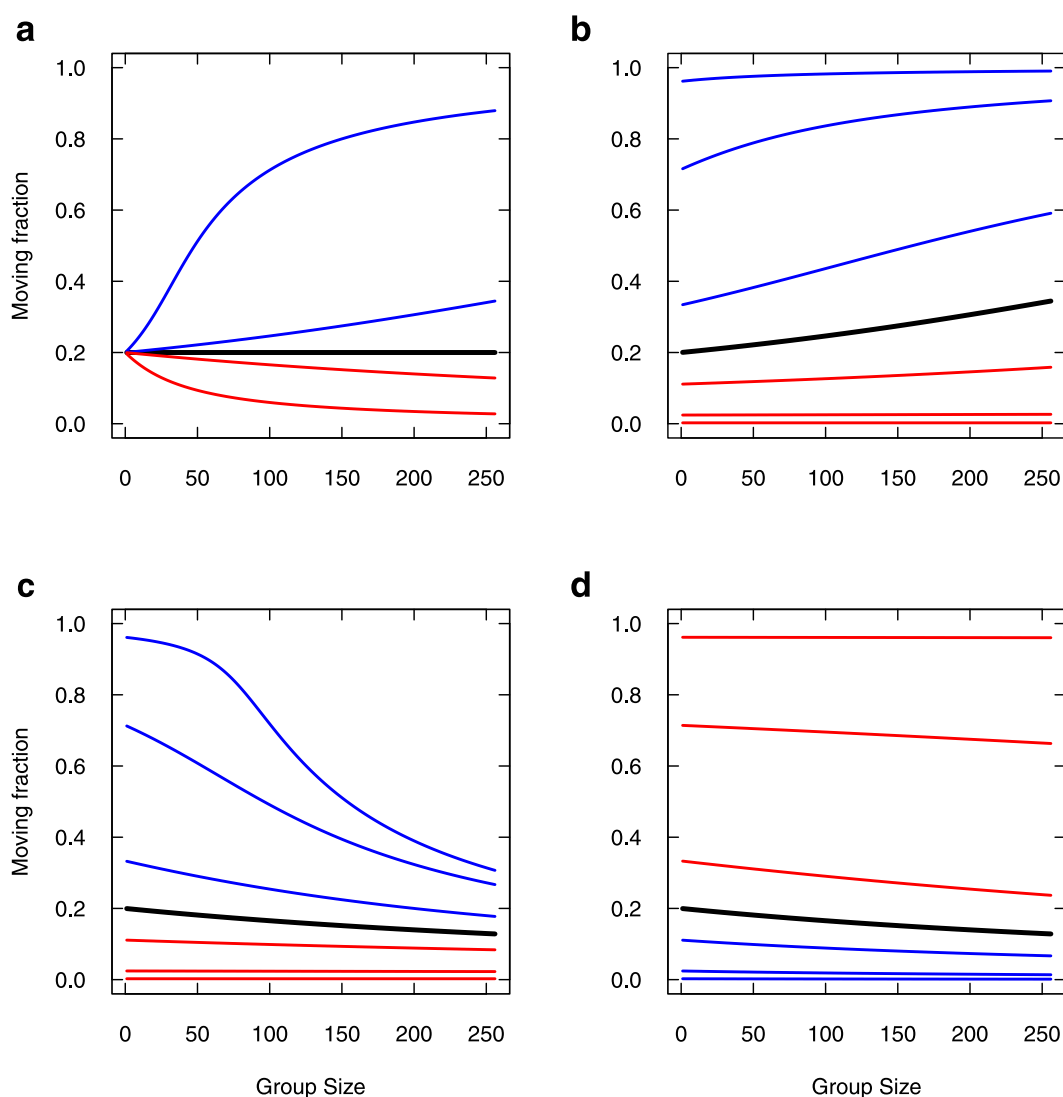


Fig 7. Moving fraction as a function of group size, varying individual parameters. (a) The symmetrical imitations case is reported in black, with $\alpha_A = \alpha_I = \alpha = 0.5$, $\mu_A^* = 0.02$ and $\mu_I^* = 0.08$. Blue curves: $\alpha_A = 1.001\alpha$ and $\alpha_A = 1.01\alpha$ keeping $\alpha_I = \alpha$, and red curves: same variations for α_I keeping $\alpha_A = \alpha$. (b) Setting $\alpha_A = 1.001\alpha$, μ_I is varied from lower (blue) to higher (red) values than μ_I^* (black). Variations correspond respectively to division or multiplication by 2, 10 and 100. (c) Setting $\alpha_I = 1.001\alpha$, μ_I is similarly varied from lower (blue) to higher (red) values than μ_I^* (black). (d) Setting $\alpha_I = 1.001\alpha$, μ_A is similarly varied from lower (blue) to higher (red) values than μ_A^* (black).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206817.g007>

imitation over stopping imitation ($\alpha_A > \alpha_I$), even by the slightest amount (Fig 7a, blue curves, $\alpha_A = 1.001 \alpha_I$ and $\alpha_A = 1.01 \alpha_I$) lead larger groups to display higher and higher moving fractions (tends to 1 for large groups). Conversely, promoting stopping imitation (Fig 7a, red curves) lead larger groups to lower and lower moving fractions (tends to 0 for large groups).

The trend to full moving fractions for promoted departure imitation depends on the spontaneous stopping rate μ_I (Fig 7b). For very large values of μ_I (low moving fraction, Fig 7b, red curves), this trend is very slow and might be negligible. At the other end of the scope, very low μ_I values would promote a high moving fraction even for smallest group (Fig 7b, blue curves) so that the trend is also saturated. In between, μ_I has a sensible effect upon the trend. The trend to null moving fractions for promoted stopping imitation is more affected by μ_I (Fig 7c) than by μ_A (Fig 7d), especially when it is low (Fig 7c, blue curves).

Overall, the moving fraction depending on group size is especially sensitive to slight promotion of imitation rates, but also to spontaneous stopping rate when the latter is low.

As a variant of the model, our data suggest that the spontaneous stopping rate is regulated by the group size N (Eq 4) such that walking individuals in large groups tend to spontaneously stop less often. In such a case, the moving fraction in the symmetrical imitation case, should be rewritten as:

$$b_s^* = \frac{\mu_A}{\mu_A + (\mu_I/N)} \quad (13)$$

Avowedly, extending this property to very large groups would result in a vanishing spontaneous stopping rate, so that the moving fraction should tend to 1 in any case at first sight. This is actually true only in the symmetrical case. In the general case, this effect combines with other parameters and yields non monotonous trends with group size, so we expose it for the sake of interest. Fig 8 reports the moving fraction as a function of group size (or total mass), varying the parameters the very same way as in Fig 7, but for the variant model (graphics can be compared one to one).

Introducing the variant produces a striking effect upon the sensitivity to parameters. First, as expected, the moving fraction increases with group size under the symmetrical influences case (Fig 8a, black curve). Promoting departure imitation over stopping imitation ($\alpha_A > \alpha_I$) just accelerate this trend (Fig 8a, blue curves). For such promoted departure imitation ($\alpha_A > \alpha_I$), the spontaneous stopping rate μ_I only affects the rate at which the moving fraction increases with group size (Fig 8b).

In contrast with the first model, promoting stopping imitation (Fig 8a, red curves) now displays a non monotonous trend, as there is a range of group sizes that display an increased moving fraction despite stopping is promoted, and the trend to lower and lower moving fractions is recovered only for largest group (tends to 0 for largest groups). In such a case of promoted stopping imitation, this range of group size is strongly affected both by μ_I (Fig 8c) and by μ_A (Fig 8d). Overall, if stopping imitation is stronger than departure imitation, the variant model promotes the moving fraction in a limited range of group sizes. This moving fraction can be as high as one, and both group size range and maximal value are controlled by the spontaneous rates.

Discussion

The analytical solution for the minimal model (a traveling pulse in sech square shape) can be regarded as the solution of reference for collective motion emerging among entities with intermittent walk and which synchronise their switching decisions based on a simple behind/ahead partitioning of their influential neighbours. With no constraint, the dynamics will always

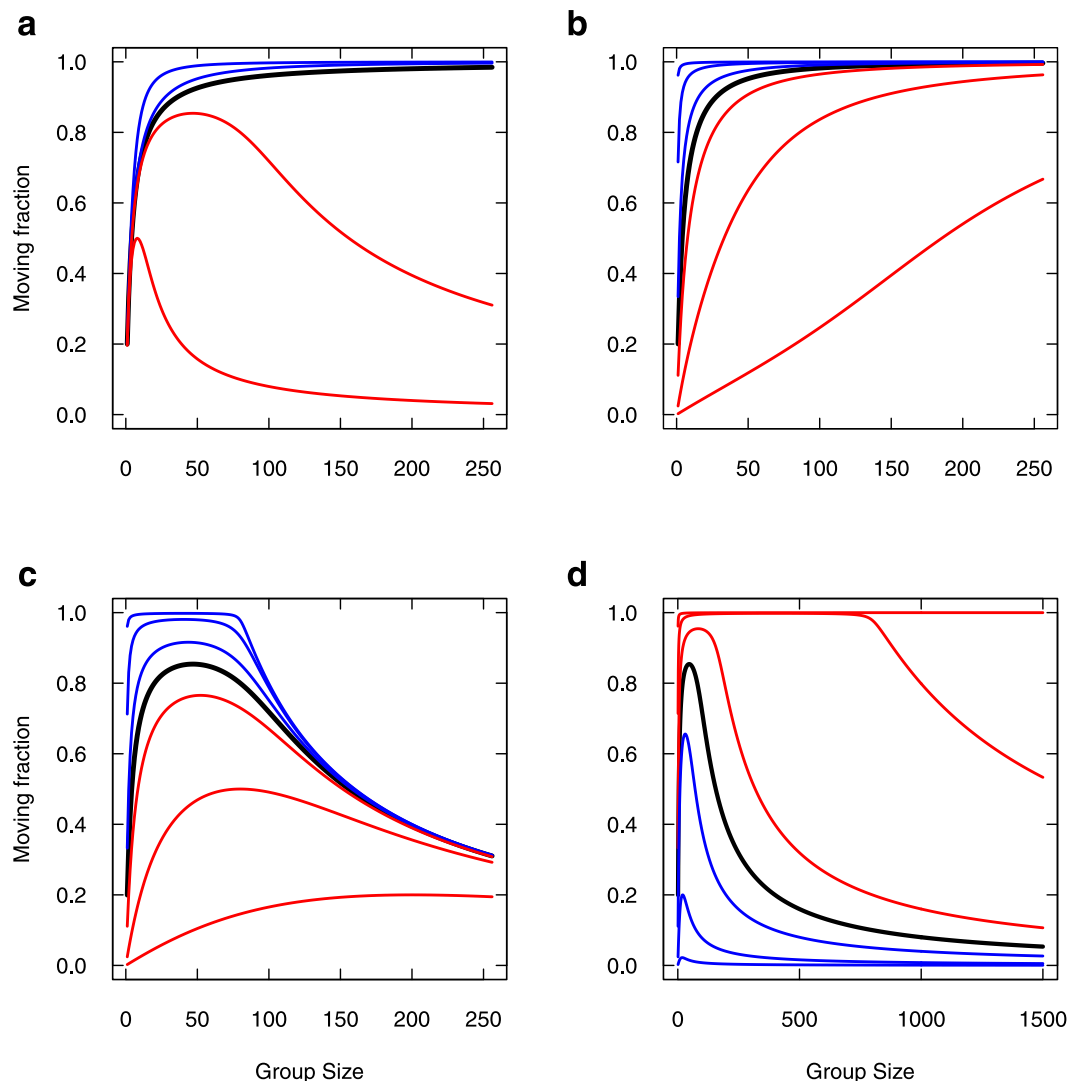


Fig 8. Moving fraction as a function of group size, varying individual parameters (Variant Model). Same legend as Fig 7 (same parameters, same parameter variations). Note the expanded scale in (d) to clearly show the effect; the upper red curve starts to decrease around $N = 8000$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206817.g008>

converge towards a single pulse since the interaction promote cohesion in any case: individuals ahead waits for those behind to keep up while individuals behind do what it takes to keep up. The mechanism should ensure the self-organised convergence to only one traveling pulse from any initial condition, and restore from any perturbation (see [S7 Movie](#)). Incorporating further ingredients could alter its cohesion and its speed. It is likely, for instance, that taking back the inhibitory part into account would affect both the propagation speed, and the shape of the traveling pulse. However, it would still ensure the propagation of the group as a traveling pulse, as indicated by the numerical solution of the complete model using the Boltzmann-like equations.

We used an idealized description of the actual modes of motion by sheep: we have assimilated small random moves observed in the grazing state to one null-speed state, and we have

considered a unique value for the speed in the moving state. An extended model relaxing this idealization could be based upon a composite Brownian walk [44] with two modes of motion with characteristic speeds of the order 0.1 and 1 m.s⁻¹. Composite Brownian walk have been suggested in the context of optimal foraging theory [45] where intermittent search has been proved better than pure diffusive processes [46, 47], especially Lévy flight model [48–53]. In the present context, since the pastures were homogeneous, we do not consider that animals were in searching mode [30] even though their mode of motion is very reminiscent of models mentioned above. To our knowledge, these strategies have been so far considered only in the context of independent searchers (except [54] but see [44]). Our results suggest further theoretical works, e.g. towards extensions for one dimensional Lévy flights with coupling.

In the present context, we had no reason to take into account the biological limits to perception, and in the model, the stimulating neighbours are integrated over infinite half-lines. Avowedly, animals do have perceptual limits, being they endogenous or due to fragmented landscape. However, groups were small enough to neglect crowding effect upon perception (which would justify a topological limit on influential neighbours set, like in starling flocks or large fish flocks [24, 55]), and landscape obstacles to perception would need to be introduced explicitly if they were of relevance. Moreover, the dynamics favours packing against diffusion, so if small groups start from reasonably dense initial condition, the probability that the group disperse so widely that individuals could not see each other anymore due to endogenous limit is nearly zero. In absence of external factors disrupting the groups, introducing a biologically relevant metric cutoff (e.g. some hundreds of meters in sheep) would then have no effect upon the sustained dynamics of the pulse (which is far narrower than that).

With no limited perception, the spatial effect results entirely from the asymmetrical influence of individuals that are in the opposite state: only active individuals ahead are stimulating switching to motion, only inactive individuals behind are stimulating switching to stop. In the minimal model, this asymmetry can also be interpreted as a combined reaction to receding conspecifics behind versus receding conspecifics ahead [56–58].

The simple behind/ahead asymmetrical influence together with the double mimetic effect are sufficient to generate the traveling pulse since it promotes the tendency to wait at the front edge of the pulse, and to keep moving at the back edge [32].

Without this simple asymmetry, e.g. if we had considered all (behind and ahead) active individuals as stimulating switching to motion, there would be no spatial effect at all, since the stimulation would be the same all over the space. In such a case, the dynamics would degenerate into a simple advection-diffusion process, and the group would eventually disperse despite interactions. This asymmetry can then be seen as an alternative to models based upon topologically-defined neighbours [59] or limited sensing kernels (non local terms) [2]. It could as well be described by an Heaviside odd kernels on the half-line [33]. Considering extension to 2-dimensional motion, our simple behind/ahead symmetry breaking parallels the violation of Newton's third law (action-reaction symmetry) in models based on social forces [60].

Classically, traveling pulse studies start directly from a macroscopic description at the system level [37–39]. In the present study, we have found a traveling pulse solution starting from the “microscopic” description of interactions at the individual level (and even binary interactions in the minimal model) so that the macroscopic solution (in the minimal version of the model) is completely parametrized by the individual behavioral parameters.

In the same spirit, Bertin et al. [61], extended by Peshkov et al. [62], propose a method to derive density equations for the Vicsek model [16] in the dilute regime (binary interactions). Starting from the Boltzmann expression (and using an approximation needed by the 2-dimensional nature of their model), they find an explicit expression of the macroscopic transport coefficients. Projecting their Boltzmann expression onto an arbitrary direction in the unstable

collective motion regime, the resulting 1-dimensional system display irregular trains of traveling pulses. In contrast to the sech^2 profile we found for our model, these traveling pulses profiles are made of two (behind / ahead) exponential decays compatible with their hydrodynamic approximation. Saragosti et al. [4] also found double exponential wave profiles by deriving analytical macroscopic behavior from a kinetic description of the mesoscopic run-and-tumble process in chemotactic bacteria *E. coli*. Such traveling bands have been long identified in large-scale IBM simulations [63, 64]. The Vicsek model assuming a constant velocity module, it would be interesting to study the effect of incorporating coupled intermittent motion in such large-number 2-dimensional systems, e.g. along the lines developed in [65].

Methods

Ethics statement

Animal care and experimental manipulations were applied in conformity with the rules of the Ethics Committee for Animal Experimentation of Federation of Research in Biology of Toulouse, in accordance with the European Directive 2010/63/EU, with the rules of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. All protocols were approved by the Steering Committee of the National Institute of Higher Education in Agricultural Sciences—Montpellier SupAgro (French Ministry of Agriculture). We note that upon the French Ethical Committee for animal experimentation regulation, no special rule had to be invoked since no protected or endangered species was involved, and the experiments did not imply any invasive nor stressful manipulation, the experimental protocol consisting only in the observation of groups and the acquired data being only pictures of the animals in their normal herding conditions. At the end of the experiment, all animals reintegrated the herd of the breeding research station. All personnel involved had technical support and supervision by the employees of the Research Station as required by the French Ministry of Research.

Data collection

Sheep (Merinos d'Arles) groups evolutions were collected at the experimental farm of Domaine du Merle (5.74°E and 48.50°N, South France) during 2008–2009 winter. Groups of 18-months aged females were formed, picking individuals at random from a large sheep herd (around 1600) which was raised on the domain. The groups were introduced within one of four 80m x 80m enclosures delimited by fences and opaque 1.2m high polypropylene blind (for visual isolation). The pastures were flat and homogeneously covered by native Crau grass. A 7-m-high tower was anchored at the middle point between enclosures, from the top of which snapshots of groups were recorded every second for an hour, using Digital cameras (15.1-megapixel Canon EOS D50). Only the second half-hour recording was used in data analysis, to discard perturbation effects due to the introduction of groups in enclosures. Groups of $N = 2, 3, 4$ and 8 individuals were used, with 8 replications each. 2 groups of 8 individuals, recorded on the same day, were discarded from the analysis because the high wind condition was very perturbative to their behaviour (they kept about motionless for an hour near the blind that was the most protective from the wind).

Events extraction

For groups of $N = 2, 3$ and 4, the position of each sheep was visually tracked using a Cintiq interactive pen displays [Cintiq 21 UXGA 1600 x 1200 pixels). From these positional tracks, events of collective departures and collective stops were identified, and we visually checked on

the original pictures that they well corresponded to head-up walking behaviours. For groups of $N = 8$, harder to track, we first identify such events on the original pictures, and only tracked the position from the start of collective departures to the end of collective stops. Field coordinates were recovered from pixel coordinates using projective geometry inverse.

Finally, we obtained 76, 58, 66 and 21 collective departures events for groups of $N = 2, 3, 4$ and 8; and 73, 56, 60 and 18 collective stop events respectively (the lower number of collective stops is because we filtered out the few events where the initiator stopped before the last follower departed, so that the stimuli at work were not clearly determined).

Estimation of interaction parameters α, β, γ .

We follow the same procedure as we used in previous studies. In each collective departure event, we considered the *following latency* (in s) for each individual (time elapsed between the previous individual switching to walking and the switching time of this individual). We then obtained a collection of latencies, each associated with the states of other individuals in the group (namely, W the number already in walking mode, and R the number still at rest). The corresponding *following rate* $f(R, W)$ (in s^{-1}) was then recovered as the inverse of the mean latency before switching when confronted to R, W , taking into account the number of individuals at risk. Gathering all those rates across the group size 2, 3, 4 and 8, we performed a single regression in the log-domain following:

```
mcreg = MCMCregress(log(LatencesDeparts$f) ~ log(LatencesDeparts$W)
                    + log(LatencesDeparts$R));
```

We used MCMCregress from the R Package MCMCpack in order to obtain distribution-free confidence interval. The use of standard lm / confint yielded the same results to the second digit. The output of lm was:

```
Multiple R-squared: 0.9455, Adjusted R-squared: 0.9334
F-statistic: 85.04 on 2 and 10 DF, p-value: 5.281e-07
```

We performed the same data analysis for the collective stops. The corresponding output of lm was:

```
Multiple R-squared: 0.9108, Adjusted R-squared: 0.8929
F-statistic: 51.02 on 2 and 10 DF, p-value: 5.662e-06
```

Spontaneous switching rates

To estimate the spontaneous rate of switching to the stopped state μ_b , we consider the set of all durations between the starts of collective move (the date at which the last individual had switched to the moving state) and the date at which the first moving individual switched to the stopped state. The corresponding rate appeared to depend upon the group size, following

$$\mu_l = \mu_l^* / N \quad (14)$$

with $\mu_l^* = 0.08 \text{ s}^{-1}$.

Unfortunately, we found impracticable to estimate accurately the spontaneous rate of switching to the moving state μ_A . Indeed, the spontaneous departure of one individual could trigger a collective response in some cases, but lots of them actually do not, because the inhibitory effect of the others makes it stop before they start moving. Such aborted departures would mix with the high number of small moves that sheep display while grazing, when one individual leave the grass clump he was feeding on, walks a couple of steps and resume grazing on another clump. It was thus impossible to define a clear behavioural clue to cut among pure grazing small moves and actual aborted departures. This parameter remains then free in the present study, and we provide a realistic value, based on Monte Carlo simulations of the whole

process, chaining multiple collective departures / collective stops over 1800 s, and calibrating it by comparing model predictions to the average distances experimental groups ranged over the pasture.

Supporting information

S1 Fig. Propagation with no interaction (1). Numerical simulations of Eqs 5 and 6, with $\Delta t = 10^{-2}$ s, and $\alpha_A = \alpha_I = 0$. The leftmost profile is the initial condition, and profile are shown every 100 s. Since there is no non linear term to compensate for diffusion, the profile tends to a gaussian distribution. The center of mass is simply advected towards positive abscissa due to the moving fraction.

(EPS)

S2 Fig. Propagation with no interaction (2). Statistics over stochastic Monte Carlo simulation of the individual-based model, with $\alpha_A = \alpha_I = 0$. Histograms of presence are reported at different dates, starting from time 0 where all individuals are collapsed near location 0. The corresponding profile from numerical resolution of Eqs 5 and 6 is superimposed at time 1800 s (red curve).

(EPS)

S3 Fig. b_s as a function of C . The value found by Eq 43 in S1 Appendix is given as a function of C , and for varied values for μ_A and μ_I . Larger values of C , meaning $\alpha_A > \alpha_I$, promote higher moving fractions.

(EPS)

S1 Data. Data and source codes. All data and source codes for data treatment (using R), numerical solving equations and stochastic simulations.

(ZIP)

S1 Appendix. Analytical solution in the steady regime for the minimal model.

(PDF)

S1 Movie. Typical motion behaviour of a group of 3 sheep. The evolution of 3 sheep is reported every second in field coordinates. Each sheep has been assigned a colour. Individuals are nearly motionless most of the time, while they are devoted to grazing. These grazing phases are separated by collective moves that translocate the group over several meters at high speed. A clear event of such a collective motion happens from frame 318 to frame 344.

(MOV)

S2 Movie. Stochastic simulations for a group of $N = 4$ sheep with biological parameters given in the main text. One realisation is given in each frame. The 1D position of each individual is presented as a function of time. Horizontal progression indicates a motionless individual. Oblique progression indicates a moving individual. The aggregation in time of oblique events indicates the synchronisation of motion phases.

(MOV)

S3 Movie. Stochastic simulations for a group of $N = 4$ sheep, like in S2 Movie, but with a dominant spontaneous departure parameter. The coupling parameters have been down-scaled to $\alpha_A = 0.001$ and $\alpha_I = 0.016$. As a consequence, individual are mainly driven by independent switching decisions, which results in the loss of synchronisation and group dispersion over ten of meters.

(MOV)

S4 Movie. Illustration of the propagation of a group of $N = 32$ sheep predicted by the model. Illustrating that groups can be seen to progress as a whole at some fraction of the individual speed whilst each individual is either stopped or moving at full speed. Stopped individuals are reported by black dots, and moving individuals are reported by red dots. The panel above reports the number of individuals in motion. The dotted line indicates the average of this number over time.

(MOV)

S5 Movie. Numerical simulations of Eqs 5 and 6, with $\Delta t = 10^{-2}$ s, for various initial conditions. Four different initial conditions were tested: starting at frame 1, the group starts loosely dispersed over 20–30 m with all individuals in the stopped state, from frame 116 the group starts with the same dispersion but with all individuals in the moving state, from frame 210 the group is split into two separated groups with moving individuals in the group ahead, and from frame 348 with moving individuals in the group behind. All simulations converge to the same traveling pulse.

(MOV)

S6 Movie. Numerical simulations of Eqs 5 and 6, with $\Delta t = 10^{-2}$ s, with analytical solution superimposed. The upper panel shows the numerical simulations of the Boltzmann-like equations using the minimal model ($\beta_A = \beta_I = 1$ and $\gamma_A = \gamma_I = 0$, $N = 4$, spontaneous rates unchanged). Two sets of parameters are reported: $\alpha_A = \alpha_I = 0.5$ from frame 1, and $\alpha_A = 0.8$, $\alpha_I = 0.2$ from frame 202. The lower panel shows a zoom of the numerical profile, centred on the center of mass (black curve) and the steady regime traveling pulse (red curve). Since $\alpha_A + \alpha_I$ remains equal to 1 in both case, the steady regime is the same for the density profile. However, the propagating speed is affected (it is faster for the case with dominant activating stimulation) and the route to converge towards the steady shape is different.

(MOV)

S7 Movie. Recovering the traveling pulse propagation after a perturbation. We use the IBM simulation program to test how the group reacts to a perturbation. Here, the perturbation is the extinction of interactions for a given period of time. The group starts unperturbed. Stopped individuals are reported in black and moving individuals in red. In the beginning, we set the camera in constant speed motion tuned to the average speed of the group. We can see the group ahead of sync or behind of sync in regards to this moving camera frame, but still it keeps progressing on average. At time 1000 (frame 1000), the interactions are set off, and the camera is stopped while its angle is enlarged to cover a larger area. From that time, individuals progress at their own pace, leading to group dispersal (by advection/diffusion). At time 1999 (frame 1999), interactions are restored. The groups then tends to regain its cohesion, illustrating that the ones ahead waits for the one behind to progress before they move again. At times near 2500, the group has reached its steady regime density and recovers the steady regime propagation. The camera is set back in motion at time 2550 and its angle restored to its initial value.

(MOV)

Author Contributions

Conceptualization: Richard Bon, Marie-Hélène Pillot, Jacques Gautrais.

Data curation: Manon Azaïs, Richard Bon, Marie-Hélène Pillot, Jacques Gautrais.

Formal analysis: Manon Azaïs, Stéphane Blanco, Richard Fournier, Marie-Hélène Pillot, Jacques Gautrais.

Funding acquisition: Richard Bon, Jacques Gautrais.

Investigation: Manon Azaïs, Stéphane Blanco, Richard Bon, Richard Fournier, Marie-Hélène Pillot, Jacques Gautrais.

Methodology: Stéphane Blanco, Richard Fournier, Jacques Gautrais.

Project administration: Richard Bon, Jacques Gautrais.

Software: Manon Azaïs.

Supervision: Richard Bon, Jacques Gautrais.

Validation: Stéphane Blanco, Richard Bon, Richard Fournier, Jacques Gautrais.

Writing – original draft: Manon Azaïs, Stéphane Blanco, Richard Bon, Richard Fournier, Jacques Gautrais.

Writing – review & editing: Manon Azaïs, Stéphane Blanco, Richard Bon, Richard Fournier, Jacques Gautrais.

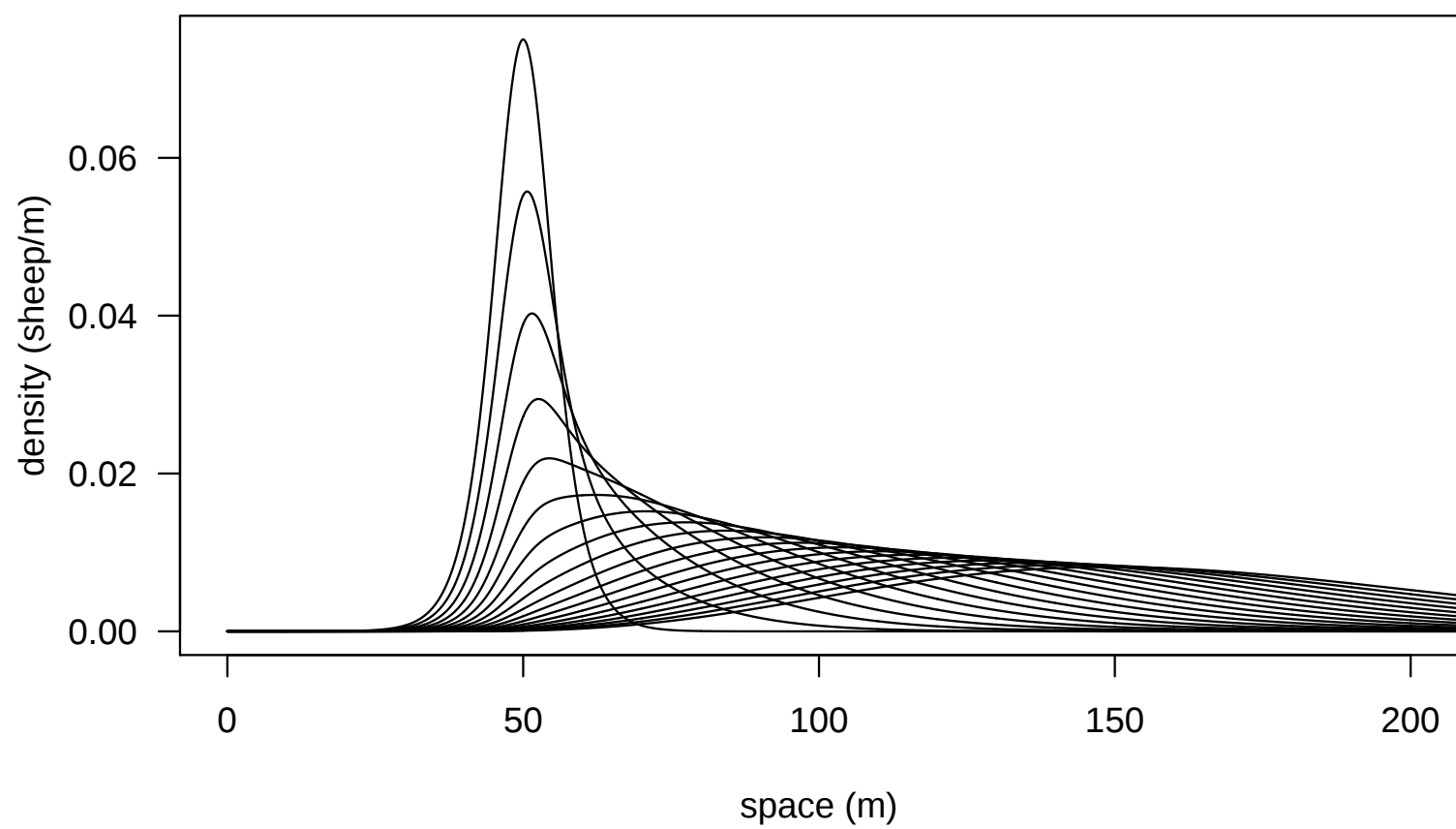
References

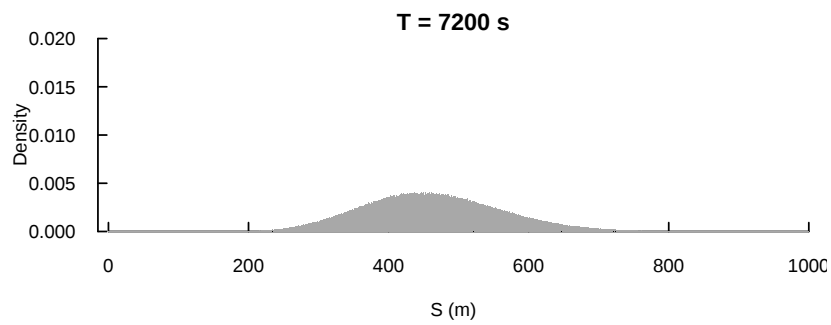
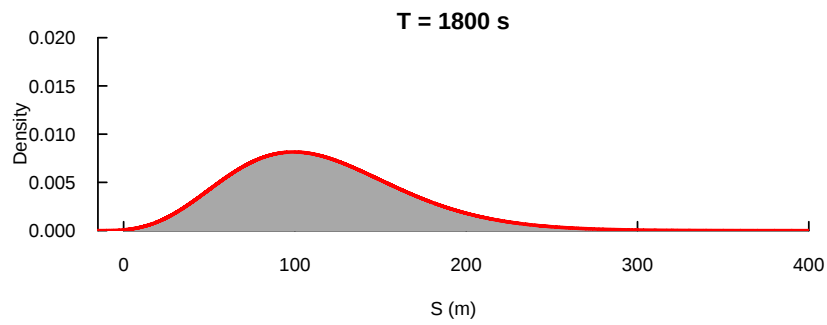
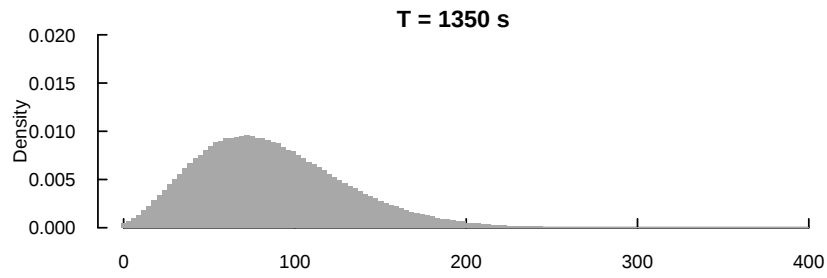
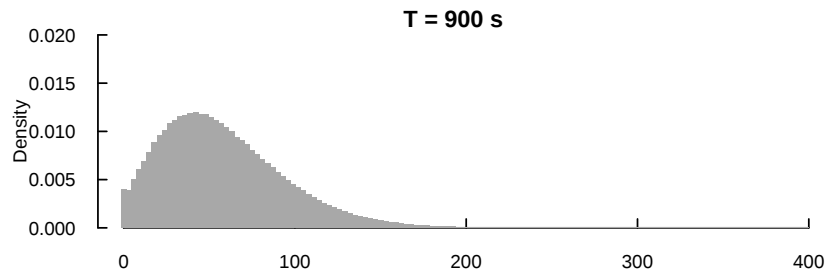
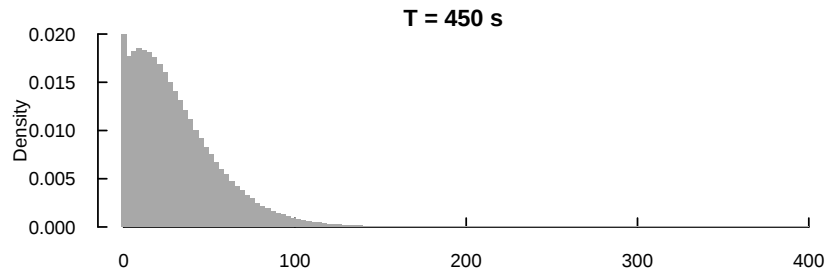
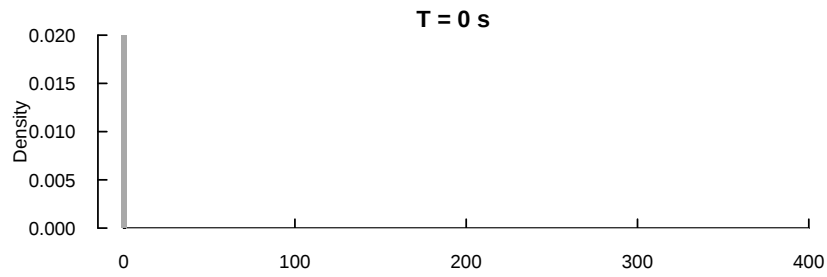
1. Sumpter DJT. The principles of collective animal behaviour. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006; 361(1465):5–22. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1733> PMID: 16553306
2. Eftimie R, de Vries G, Lewis Ma. Complex spatial group patterns result from different animal communication mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(17):6974–6979. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611483104> PMID: 17438269
3. Tindall MJ, Maini PK, Porter SL, Armitage JP. Overview of mathematical approaches used to model bacterial chemotaxis II: Bacterial populations. *Bulletin of Mathematical Biology.* 2008; 70(6): 1570–1607. <https://doi.org/10.1007/s11538-008-9322-5> PMID: 18642047
4. Saragosti J, Calvez V, Bournaveas N, Buguin A, Silberzan P, Perthame B. Mathematical description of bacterial traveling pulses. *PLoS Comput Biol.* 2010; 6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000890> PMID: 20808878
5. Sumpter DJT. *Collective Animal Behavior.* Princeton, NJ: Princeton University Press; 2010.
6. Saragosti J, Calvez V, Bournaveas N, Perthame B, Buguin A, Silberzan P. Directional persistence of chemotactic bacteria in a traveling concentration wave. *Proc Natl Acad Sci.* 2011; 108(39): 16235–16240. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101996108> PMID: 21918111
7. Lopez U, Gautrais J, Couzin ID, Theraulaz G. From behavioural analyses to models of collective motion in fish schools. *Interface Focus.* 2012; 2(6):693–707. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2012.0033> PMID: 24312723
8. Vicsek T, Zafeiris A. Collective motion. *Phys Rep.* 2012; 517(3–4):71–140. <https://doi.org/10.1016/j.physrep.2012.03.004>
9. Eftimie R. Hyperbolic and kinetic models for self-organized biological aggregations and movement: A brief review. *J Math Biol.* 2012; 65(1):35–75. <https://doi.org/10.1007/s00285-011-0452-2> PMID: 21720963
10. Kuwayama H, Ishida S. Biological soliton in multicellular movement. *Sci Rep.* 2013; 3:3–7. <https://doi.org/10.1038/srep02272>
11. Carrillo JA, Eftimie R, Hoffmann FKO. Non-local kinetic and macroscopic models for self-organised animal aggregations. *Kinet Relat Model.* 2014; 8(3):1–29.
12. Pineda M, Weijer CJ, Eftimie R. Modelling cell movement, cell differentiation, cell sorting and proportion regulation in Dictyostelium discoideum aggregations. *J Theor Biol.* 2015; 370(0):135–150. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2015.01.042> PMID: 25665718
13. Cavagna A, Conti D, Giardina I, Grigera TS, Melillo S, Viale M. Spatio-temporal correlations in models of collective motion ruled by different dynamical laws. *Phys Biol.* 2016; 13(6):065001. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/13/6/065001> PMID: 27845926
14. Herbert-Read JE. Understanding how animal groups achieve coordinated movement. *J Exp Biol.* 2016; 219(19):2971–2983. <https://doi.org/10.1242/jeb.129411> PMID: 27707862

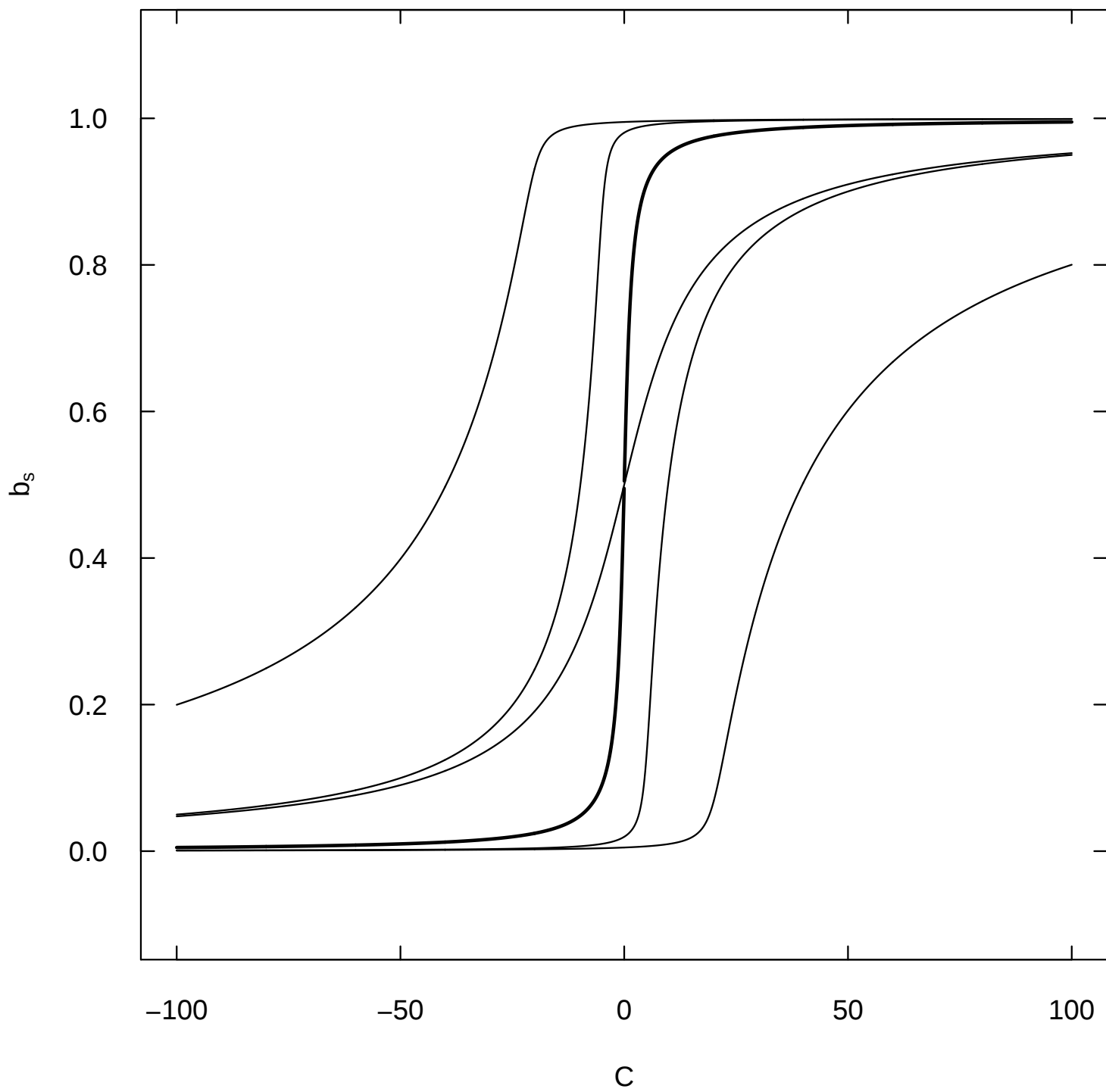
15. Jiang L, Giuggioli L, Perna A, Escobedo R, Lecheval V, Sire C, et al. Identifying influential neighbors in animal flocking. *PLOS Comput Biol*. 2017; 13(11):e1005822. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005822> PMID: 29161269
16. Vicsek T, Czirók A, Ben-Jacob E, Cohen I, Shochet O. Novel type of phase transition in a system of self-driven particles. *Phys Rev Lett*. 1995; 75(6):4–7. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.75.1226>
17. Gautrais J, Ginelli F, Fournier R, Blanco S, Soria M, Chaté H, et al. Deciphering interactions in moving animal groups. *PLoS Comput Biol*. 2012; 8(9):e1002678. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002678> PMID: 23028277
18. Katz Y, Tunstrøm K, Ioannou CC, Huepe C, Couzin ID, Tunstrom K, et al. Inferring the structure and dynamics of interactions in schooling fish. *Proc Natl Acad Sci*. 2011; 108:18720–18725. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107583108> PMID: 21795604
19. Tunstrøm K, Katz Y, Ioannou CC, Huepe C, Lutz MJ, Couzin ID. Collective States, Multistability and Transitional Behavior in Schooling Fish. *PLoS Comput Biol*. 2013; 9(2):e1002915. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002915> PMID: 23468605
20. Bialek W, Cavagna A, Giardina I, Mora T, Pohl O, Silvestri E, et al. Social interactions dominate speed control in poising natural flocks near criticality. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111(20):7212–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324045111> PMID: 24785504
21. Hemelrijk CK, van Zuidam L, Hildenbrandt H. What underlies waves of agitation in starling flocks. *Behav Ecol Sociobiol*. 2015; 69(5):755–764. <https://doi.org/10.1007/s00265-015-1891-3> PMID: 26380537
22. Hemelrijk CK, Hildenbrandt H. Diffusion and topological neighbours in flocks of starlings: Relating a model to empirical data. *PLoS One*. 2015; 10(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126913>
23. Hemelrijk CK, Hildenbrandt H. Scale-Free Correlations, Influential Neighbours and Speed Control in Flocks of Birds. *J Stat Phys*. 2014; 158(3):563–578. <https://doi.org/10.1007/s10955-014-1154-0>
24. Ballerini M, Cabibbo N, Candelier R, Cavagna A, Cisbani E, Giardina I, et al. Interaction ruling animal collective behavior depends on topological rather than metric distance: evidence from a field study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(4):1232–1237. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711437105> PMID: 18227508
25. Bialek W, Cavagna A, Giardina I, Mora T, Silvestri E, Viale M, et al. Statistical mechanics for natural flocks of birds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(13):4786–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118633109> PMID: 22427355
26. Attanasi A, Cavagna A, Del Castello L, Giardina I, Grigera TS, Jelić A, et al. Information transfer and behavioural inertia in starling flocks. *Nat Phys*. 2014; 10(9):691–696. <https://doi.org/10.1038/nphys3035>
27. Attanasi A, Cavagna A, Castello LD, Giardina I, Jelić A, Melillo S, et al. Emergence of collective changes in travel direction of starling flocks from individual birds' fluctuations. *J R Soc Interface*. 2015; 12:1–11. <https://doi.org/10.1098/rsif.2015.0319>
28. Calovi DS, Lopez U, Schuhmacher P, Chate H, Theraulaz G. Collective response to perturbations in a data-driven fish school model. *J R Soc Interface*. 2015; 12:20141362. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.1362> PMID: 25631571
29. Kramer DL, McLaughlin RL. The Behavioral Ecology of Intermittent Locomotion1. *Am Zool*. 2001; 41(2):137–153. <https://doi.org/10.1093/icb/41.2.137>
30. Ginelli F, Peruani F, Pillot MH, Chaté H, Theraulaz G, Bon R. Intermittent collective dynamics emerge from conflicting imperatives in sheep herds. *Proc Natl Acad Sci*. 2015; 112(41):12729–12734. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503749112> PMID: 26417082
31. Rimer O, Ariel G. Kinetic order-disorder transitions in a pause-and-go swarming model with memory. *J Theor Biol*. 2017; 419:90–99. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.02.009> PMID: 28189669
32. Mogilner A, Edelstein-Keshet L. A non-local model for a swarm. *J Math Biol*. 1999; 38(6):534–570. <https://doi.org/10.1007/s002850050158>
33. Eftimie R, De Vries G, Lewis MA, Lutscher F. Modeling group formation and activity patterns in self-organizing collectives of individuals. *Bull Math Biol*. 2007; 69(5):1537–1565. <https://doi.org/10.1007/s11538-006-9175-8> PMID: 17577602
34. Petit O, Gautrais J, Leca JB, Theraulaz G, Deneubourg JL. Collective decision-making in white-faced capuchin monkeys. *Proc R Soc B Biol Sci*. 2009; 276(1672):3495–3503. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0983>
35. Pillot MH, Gautrais J, Arrufat P, Couzin ID, Bon R, Deneubourg JL. Scalable rules for coherent group motion in a gregarious vertebrate. *PLoS One*. 2011; 6(1):e14487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014487> PMID: 21245930

36. Toulet S, Gautrais J, Bon R, Peruani F. Imitation Combined with a Characteristic Stimulus Duration Results in Robust Collective Decision-Making. *PLoS One*. 2015; 10(10):e0140188. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140188> PMID: 26465751
37. Kerner BS, Osipov VV. *Autosolitons*. vol. 61. Dordrecht: Springer Netherlands; 1994.
38. Purwins H, Bodeker H, Liehr A. Dissipative Solitons in Reaction-Diffusion Systems. In: *Dissipative Solitons*. vol. 308. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2005. p. 267–308.
39. Purwins HG, Bodeker HU, Amiranashvili S. Dissipative solitons. *Advances in Physics*. 2010; 59(5): 485–701. <https://doi.org/10.1080/00018732.2010.498228>
40. Miura RM. Korteweg-de Vries Equation and Generalizations. II. Existence of Conservation Laws and Constants of Motion. *Journal of Mathematical Physics*. 1968; 9(8):1204. <https://doi.org/10.1063/1.1664701>
41. Tao T. Why are solitons stable? *Bulletin of the American Mathematical Society*. 2009; 46(1):1–33. <https://doi.org/10.1090/S0273-0979-08-01228-7>
42. Meron E. Pattern formation in excitable media. *Phys Rep*. 1992; 218(1):1. [https://doi.org/10.1016/0370-1573\(92\)90098-K](https://doi.org/10.1016/0370-1573(92)90098-K)
43. Akhmediev N, Ankiewicz A. Dissipative Solitons in the Complex Ginzburg-Landau and Swift-Hohenberg Equations. In: *Dissipative Solitons*. vol. 17. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2005. p. 1–17.
44. Jansen VAA, Mashanova A, Petrovskii S. Comment on "Levy Walks Evolve Through Interaction Between Movement and Environmental Complexity". *Science*. 2012; 335(6071):918–918. <https://doi.org/10.1126/science.1215747> PMID: 22362991
45. Pyke G, Pulliam HR, Charnov EL. Optimal Foraging: A selective review of theory and tests. *The Quarterly Review of Biology*. 1977; 52(2):137–154. <https://doi.org/10.1086/409852>
46. Smouse PE, Focardi S, Moorcroft PR, Kie JG, Forester JD, Morales JM. Stochastic modelling of animal movement. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2010; 365(1550): 2201–2211. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0078>
47. Bénichou O, Loverdo C, Moreau M, Voituriez R. Intermittent search strategies. *Reviews of Modern Physics*. 2011; 83(1):81–129. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.83.81>
48. Viswanathan GM, Buldyrev SV, Havlin S, Da Luz MGE, Raposo EP, Stanley HE. Optimizing the success of random searches. *Nature*. 1999; 401(6756):911–914. <https://doi.org/10.1038/44831> PMID: 10553906
49. Lomholt MA, Tal K, Metzler R, Joseph K, Koren T, Klafter J. Lévy strategies in intermittent search processes are advantageous. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008; 105(32): 11055–11059. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803117105>
50. Sims DW, Southall EJ, Humphries NE, Hays GC, Bradshaw CJA, Pitchford JW, et al. Scaling laws of marine predator search behaviour. *Nature*. 2008; 451(7182):1098–1102. <https://doi.org/10.1038/nature06518> PMID: 18305542
51. Edwards AM, Freeman MP, Breed GA, Jonsen ID. Incorrect Likelihood Methods Were Used to Infer Scaling Laws of Marine Predator Search Behaviour. *PLoS ONE*. 2012; 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045174>
52. Bazazi S, Bartumeus F, Hale JJ, Couzin ID. Intermittent motion in desert locusts: Behavioural complexity in simple environments. *PLoS Comput Biol*. 2012; 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002498> PMID: 22589707
53. Zhao K, Jurdak R. Understanding the spatiotemporal pattern of grazing cattle movement. *Scientific Reports*. 2016; 6(August):1–8.
54. De Jager M, Weissing FJ, Herman PMJ, Nolet BA, Van De Koppel J. Lévy walks evolve through interaction between movement and environmental complexity. *Science*. 2011; 332(6037):1551–1553. <https://doi.org/10.1126/science.1201187> PMID: 21700872
55. Rosenthal SB, Twomey CR, Hartnett AT, Wu HS, Couzin ID. Revealing the hidden networks of interaction in mobile animal groups allows prediction of complex behavioral contagion. *Proc Natl Acad Sci*. 2015; 112(15):4690–4695. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420068112> PMID: 25825752
56. Guttal V, Romanczuk P, Simpson SJ, Sword GA, Couzin ID. Cannibalism can drive the evolution of behavioural phase polyphenism in locusts. *Ecology Letters*. 2012; 15(10):1158–1166. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2012.01840.x> PMID: 22882379
57. Romanczuk P, Schimansky-Geier L. Swarming and pattern formation due to selective attraction and repulsion. *Interface Focus*. 2012; 2(6):746–756. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2012.0030> PMID: 24312728

58. Großmann R, Schimansky-Geier L, Romanczuk P. Self-propelled particles with selective attraction-repulsion interaction: From microscopic dynamics to coarse-grained theories. *New Journal of Physics*. 2013; 15.
59. Ballerini M, Cabibbo N, Candelier R, Cavagna A, Cisbani E, Giardina I, et al. Interaction ruling animal collective behavior depends on topological rather than metric distance: evidence from a field study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(4):1232–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711437105> PMID: 18227508
60. Barberis L, Peruani F. Large-Scale Patterns in a Minimal Cognitive Flocking Model: Incidental Leaders, Nematic Patterns, and Aggregates. *Phys Rev Lett*. 2016; 117(24):1–6. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.117.248001>
61. Bertin E, Droz M, Grégoire G. Hydrodynamic equations for self-propelled particles: microscopic derivation and stability analysis. *J Phys A Math Theor*. 2009; 42(44):445001. <https://doi.org/10.1088/1751-8113/42/44/445001>
62. Peshkov A, Bertin E, Ginelli F, Chaté H. Boltzmann-Ginzburg-Landau approach for continuous descriptions of generic Vicsek-like models. *Eur Phys J Spec Top*. 2014; 223(7):1315–1344. <https://doi.org/10.1140/epjst/e2014-02193-y>
63. Chaté H, Ginelli F, Grégoire G, Raynaud F. Collective motion of self-propelled particles interacting without cohesion. *Phys Rev E—Stat Nonlinear, Soft Matter Phys*. 2008; 77(4):1–15.
64. Ginelli F, Peruani F, Bär M, Chaté H. Large-scale collective properties of self-propelled rods. *Phys Rev Lett*. 2010; 104(18):184502. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.104.184502> PMID: 20482178
65. Bertin E. Theoretical approaches to the steady-state statistical physics of interacting dissipative units. *J Phys A Math Theor*. 2017; 50(8):083001. <https://doi.org/10.1088/1751-8121/aa546b>







Traveling pulse emerges from coupled intermittent walks: a case study in sheep

Manon Azaïs¹, Stéphane Blanco², Richard Bon¹, Richard Fournier²,
Marie-Hélène Pillot¹, Jacques Gautrais^{1*}

¹ Centre de Recherches sur la Cognition Animale (CRCA), Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse; CNRS, UPS, France.

² LaPlaCE, Université de Toulouse; CNRS, UPS, France.

* jacques.gautrais@univ-tlse3.fr

S1 Appendix : Analytical solution in the steady regime for the minimal model

Macroscopic model

Let $A(x, t)$ and $I(x, t)$ denote respectively the density of active (moving) and inactive (stopped) sheep at location x at time t . They evolve according to:

$$\begin{cases} \partial_t I(x, t) &= -K_A(x, t)I(x, t) + K_I(x, t)A(x, t) \\ \partial_t A(x, t) + v\partial_x A(x, t) &= +K_A(x, t)I(x, t) - K_I(x, t)A(x, t) \end{cases} \quad (1)$$

where $K_A(x, t)$ and $K_I(x, t)$ are respectively the conversion rates from stopped-to-moving (activation) and moving-to-stopped (inactivation) at location x at time t , which depend on A and I according to:

$$\begin{cases} K_A(x, t) = \mu_A + \alpha_A \left[\int_x^\infty A(u, t) du \right]^{\beta_A} \left[N - \int_x^\infty A(u, t) du \right]^{-\gamma_A} \\ K_I(x, t) = \mu_I + \alpha_I \left[\int_{-\infty}^x I(u, t) du \right]^{\beta_I} \left[N - \int_{-\infty}^x I(u, t) du \right]^{-\gamma_I} \end{cases} \quad (2)$$

with $N = \int_{-\infty}^\infty A(u, t) + I(u, t) du$ is the total amount of sheep (which is conserved in time), and parameters are those given in the individual-based model. This description in density is the direct translation of the IBM expressions in the limit of continuum theory.

Let now consider the classical macroscopic descriptors $\eta(x, t)$, the sum density of sheep (moving and stopped) at location x at time t , and the corresponding flow $j(x, t)$, defined by:

$$\begin{cases} \eta(x, t) = A(x, t) + I(x, t) \\ j(x, t) = v A(x, t) + 0 I(x, t) \end{cases} \quad (3)$$

Introducing $\beta(x, t)$, the moving fraction at location x at time t , defined by:

$$\beta(x, t) = \frac{A(x, t)}{A(x, t) + I(x, t)} = \frac{A(x, t)}{\eta(x, t)} \quad (4)$$

we have $A(x, t) = \beta(x, t)\eta(x, t)$, so that $j(x, t) = v \beta(x, t)\eta(x, t)$.

The macroscopic description in Eq (3) can then be equivalently expressed by:

$$\begin{cases} \eta(x, t) = A(x, t) + I(x, t) \\ \beta(x, t)\eta(x, t) = A(x, t) \end{cases} \quad (5)$$

which we will use from now on. The evolution of these macroscopic descriptors is derived from Eq (1), summing the two evolutions to obtain η , and using only the second as for $\beta\eta$, leading to:

$$\begin{cases} \partial_t \eta + v \partial_x (\beta \eta) & = 0 \\ \partial_t (\beta \eta) + v \partial_x (\beta \eta) & = K_A (1 - \beta) \eta - K_I \beta \eta \end{cases} \quad (6)$$

in which dependencies to (x, t) have been omitted for the sake of clarity, and where K_A and K_I are now expressed in macroscopic terms, following:

$$\begin{cases} K_A(x, t) = \mu_A + \alpha_A [A^+(x, t)]^{\beta_A} [N - A^+(x, t)]^{-\gamma_A} \\ K_I(x, t) = \mu_I + \alpha_I [I^-(x, t)]^{\beta_I} [N - I^-(x, t)]^{-\gamma_I} \end{cases} \quad (7)$$

with $A^+(x, t)$ the quantity of moving sheep ahead of x , and I^- the quantity of stopped sheep behind x :

$$\begin{cases} A^+(x, t) = \int_x^\infty \beta(u, t) \eta(u, t) du \\ I^-(x, t) = \int_{-\infty}^x (1 - \beta(u, t)) \eta(u, t) du \end{cases} \quad (8)$$

Macroscopic minimal model

We are looking for steady regimes for the minimal model where $\gamma_\bullet = 0$ and $\beta_\bullet = 1$.

The macroscopic minimal model reads:

$$\left\{ \begin{array}{l} \partial_t \eta(x, t) + v \partial_x (\beta(x, t) \eta(x, t)) = 0 \\ \partial_t (\beta(x, t) \eta(x, t)) + v \partial_x (\beta(x, t) \eta(x, t)) = \eta(x, t) \times \\ \quad \left[(1 - \beta(x, t)) (\mu_A + \alpha_A \int_x^\infty \beta(u, t) \eta(u, t) du) \right. \\ \quad \left. - \beta(x, t) (\mu_I + \alpha_I \int_{-\infty}^x (1 - \beta(u, t)) \eta(u, t) du) \right] \end{array} \right. \quad (9)$$

summarized by:

$$\left\{ \begin{array}{l} \partial_t \eta + v \partial_x (\beta \eta) = 0 \\ \partial_t (\beta \eta) + v \partial_x (\beta \eta) = \eta [(1 - \beta) K_A - \beta K_I] \end{array} \right. \quad (10)$$

where K_A and K_I are :

$$\left\{ \begin{array}{l} K_A(x, t) = \mu_A + \alpha_A A^+(x, t) \\ K_I(x, t) = \mu_I + \alpha_I I^-(x, t) \end{array} \right. \quad (11)$$

with $A^+(x, t)$ the quantity of moving sheep ahead of x , and I^- the quantity of stopped sheep behind x :

$$\left\{ \begin{array}{l} A^+(x, t) = \int_x^\infty \beta(u, t) \eta(u, t) du \\ I^-(x, t) = \int_{-\infty}^x (1 - \beta(u, t)) \eta(u, t) du \end{array} \right. \quad (12)$$

This expression gives the evolution of the density of sheep in a fixed frame (x, t) , attached to the field (hereafter the field frame).

Non Homogeneous Steady Regime

Numerical simulations suggest the existence of a non homogeneous steady state with the form of a propagating wave. Here, we characterize this state.

Having in mind a solution in the form of a wave propagation, we will rewrite the system in another frame (y, t) , which is moving at a constant speed c relatively to the field frame, with coordinates:

$$\left\{ \begin{array}{l} y = R(x, t) = x - ct \\ t = Q(x, t) = t \end{array} \right. \quad (13)$$

with coincidence of the two frames at initial time. We then have, for any $g(y, t) = f(R(x, t), Q(x, t))$:

$$\left\{ \begin{array}{l} \partial_x f = \partial_x R \partial_y g + \partial_x Q \partial_t g = \partial_y g \\ \partial_t f = \partial_t R \partial_y g + \partial_t Q \partial_t g = \partial_t g - c \partial_y g \end{array} \right. \quad (14)$$

Denoting $\tilde{\eta}(y, t) = \eta(R(x, t), Q(x, t))$ the density of sheep, and $\tilde{\beta}(y, t) = \beta(R(x, t), Q(x, t))$ the moving fraction in the moving frame, we then have from Eq 10:

$$\begin{cases} \partial_t \tilde{\eta} - c \partial_y \tilde{\eta} + v \partial_y (\tilde{\beta} \tilde{\eta}) = 0 \\ \partial_t (\tilde{\beta} \tilde{\eta}) - c \partial_y (\tilde{\beta} \tilde{\eta}) + v \partial_y (\tilde{\beta} \tilde{\eta}) = \tilde{\eta} [(1 - \tilde{\beta}) \tilde{K}_A - \tilde{\beta} \tilde{K}_I] \end{cases} \quad (15)$$

where $\tilde{K}_A$ and $\tilde{K}_I$ are:

$$\begin{cases} \tilde{K}_A(y, t) = \mu_A + \alpha_A \int_y^\infty \tilde{\beta}(u, t) \tilde{\eta}(u, t) du \\ \tilde{K}_I(y, t) = \mu_I + \alpha_I \int_{-\infty}^y (1 - \tilde{\beta}(u, t)) \tilde{\eta}(u, t) du \end{cases} \quad (16)$$

If steady states exist, they obey (in the moving frame):

$$\begin{cases} -c \partial_y \tilde{\eta} + v \partial_y (\tilde{\beta} \tilde{\eta}) = 0 \\ -c \partial_y (\tilde{\beta} \tilde{\eta}) + v \partial_y (\tilde{\beta} \tilde{\eta}) = \tilde{\eta} [(1 - \tilde{\beta}) \tilde{K}_A - \tilde{\beta} \tilde{K}_I] \end{cases} \quad (17)$$

that we rewrite as:

$$\begin{cases} -c n' + v (bn)' = 0 \\ -c (bn)' + v (bn)' = n [(1 - b)(\mu_A + \alpha_A A^+) - b(\mu_A + \alpha_A I^-)] \end{cases} \quad (18)$$

where steady states (n, b) are such that $n(y) = \tilde{\eta}(y, t)$ and $b(y) = \tilde{\beta}(y, t) \forall t$, prime denotes regular derivative with respect to y , and

$$\begin{cases} A^+ = \int_y^\infty b(u) n(u) du \\ I^- = \int_{-\infty}^y (1 - b(u)) n(u) du \end{cases} \quad (19)$$

Propagation speed

A pure propagation of a wave would imply a pure advection of a non homogenous profile of n . In the static frame, this would imply that the first equation in Eq.6 is a pure advection, meaning:

$$\partial_t \eta + v \partial_x (\beta \eta) = \partial_t \eta + v \partial_x \eta = 0 \quad (20)$$

This can occur only when $\partial_x \beta = 0$, meaning an homogeneous profile for β , or equivalently, in the moving frame, $b(y) = b_s, \forall y$.

Plugging into the first equation of Eq.18, this translates into:

$$-c n' + v (b_s n)' = -c n' + v b_s n' = 0 \quad (21)$$

yielding

$$c = b_s v \quad (22)$$

meaning, consistently, that the density profile would propagate at a speed $b_s v$ equal to the average speed (the moving fraction times the individual speed).

Wave profile for the density $n(y)$

What would be the steady state density profile in this particular moving frame? Second equation in Eq (18) becomes:

$$v b_s (1 - b_s) n' = n \left[(1 - b_s) \left(\mu_A + \alpha_A b_s \int_y^\infty n(u) du \right) - b_s \left(\mu_I + \alpha_I (1 - b_s) \int_{-\infty}^y n(u) du \right) \right] \quad (23)$$

Rearranging terms, we get:

$$v b_s (1 - b_s) n' = n [(1 - b_s) \mu_A - b_s \mu_I] + n b_s (1 - b_s) [\alpha_A N^+ - \alpha_I N^-] \quad (24)$$

with $N^+ = \int_y^\infty n(u) du$ and $N^- = \int_{-\infty}^y n(u) du$.

Deriving with respect to y , we get:

$$\begin{aligned} v b_s (1 - b_s) n'' &= n' [(1 - b_s) \mu_A - b_s \mu_I] \\ &+ n' b_s (1 - b_s) [\alpha_A N^+ - \alpha_I N^-] \\ &+ n b_s (1 - b_s) [\alpha_A (-n) - \alpha_I (n)] \\ &= n' [(1 - b_s) \mu_A - b_s \mu_I] \\ &+ n' b_s (1 - b_s) [\alpha_A N^+ - \alpha_I N^-] \\ &- n^2 b_s (1 - b_s) [\alpha_A + \alpha_I] \end{aligned} \quad (25)$$

Multiplying by n , we obtain:

$$\begin{aligned} v b_s (1 - b_s) n'' n &= n' n [(1 - b_s) \mu_A - b_s \mu_I] \\ &+ n' \{ n b_s (1 - b_s) [\alpha_A N^+ - \alpha_I N^-] \} \\ &- n^3 b_s (1 - b_s) [\alpha_A + \alpha_I] \end{aligned} \quad (26)$$

From Eq.24, we extract the term in $\{\}$ in Eq.26 :

$$nb_s(1-b_s) [\alpha_A N^+ - \alpha_I N^-] = vb_s(1-b_s)n' - n((1-b_s)\mu_A - b_s\mu_I) \quad (27)$$

that we plug back into Eq.26, and we obtain:

$$\begin{aligned} vb_s(1-b_s)n''n &= n'n[(1-b_s)\mu_A - b_s\mu_I] \\ &+ n'[vb_s(1-b_s)n' - n((1-b_s)\mu_A - b_s\mu_I)] \\ &- n^3b_s(1-b_s)[\alpha_A + \alpha_I] \\ &= n'n[(1-b_s)\mu_A - b_s\mu_I] \\ &+ (n')^2vb_s(1-b_s) \\ &- n'n[(1-b_s)\mu_A - b_s\mu_I] \\ &- n^3b_s(1-b_s)[\alpha_A + \alpha_I] \\ &= (n')^2vb_s(1-b_s) \\ &- n^3b_s(1-b_s)[\alpha_A + \alpha_I] \end{aligned} \quad (28)$$

finally yielding:

$$n'^2 - nn'' - \frac{\alpha_A + \alpha_I}{v}n^3 = 0 \quad (29)$$

Let $\xi = (\alpha_A + \alpha_I)/v$.

A solution to Eq.29 compatible with a wave peak at $y = 0$ (i.e. $n'(0) = 0$) is:

$$n(y) = \frac{K}{2\xi} \text{sech}^2\left((1/2)\sqrt{K}y\right) \quad (30)$$

with K a constant. To solve for this constant, we consider the constraint that $\int_{-\infty}^{+\infty} n(u)du = N$, the number of sheep, is conserved.

Since

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \text{sech}^2(ky) dy = 2/k \quad (31)$$

we then have:

$$\int_{-\infty}^{+\infty} n(u)du = \int_{-\infty}^{+\infty} du \frac{K}{2\xi} \text{sech}^2\left((1/2)\sqrt{K}u\right) = \frac{2\sqrt{K}}{\xi} = N \quad (32)$$

so that

$$K = (1/4) N^2 \xi^2 \quad (33)$$

Finally, the profile for the density, in the frame moving at speed $\beta_s v$, is then:

$$n(y) = \frac{1}{2} N \gamma \text{sech}^2(\gamma y) \quad (34)$$

with

$$\gamma = \frac{N(\alpha_A + \alpha_I)}{4v} \quad (35)$$

We note that this solution $n(y)$ for this steady state *profile* is independent from the value b_s as well as from the spontaneous activation/inactivation parameters μ_A and μ_B . We see below that those parameters are only involved in the propagation speed of this profile.

Value of the moving fraction b_s

The solution above is compatible with the model only if the corresponding moving fraction b_s is such that $b_s \in [0..1]$.

This solution with a wave peak at $y = 0$ is compatible with only one value for b_s , since we must have that Eq.23 holds at $y = 0$, namely :

$$v b_s (1 - b_s) n'(0) = n(0) \left[(1 - b_s) \left(\mu_A + \alpha_A b_s \int_0^\infty n(u) du \right) - b_s \left(\mu_I + \alpha_I (1 - b_s) \int_{-\infty}^0 n(u) du \right) \right] \quad (36)$$

With $n'(0) = 0$ and $n(0) > 0$, b_s must then be solution to:

$$(1 - b_s) \left(\mu_A + \alpha_A b_s \int_0^\infty n(u) du \right) - b_s \left(\mu_I + \alpha_I (1 - b_s) \int_{-\infty}^0 n(u) du \right) = 0 \quad (37)$$

The wave solution being symmetrical around $y = 0$, we have:

$$\int_0^\infty n(u) du = \int_{-\infty}^0 n(u) du = N/2 \quad (38)$$

so that b_s must be solution to:

$$(1 - b_s) (\mu_A + \alpha_A b_s N/2) - b_s (\mu_I + \alpha_I (1 - b_s) N/2) = 0 \quad (39)$$

i.e.

$$b_s^2 [N/2(-\alpha_A + \alpha_I)] + b_s [N/2(\alpha_A - \alpha_I) - (\mu_A + \mu_I)] + \mu_A = 0 \quad (40)$$

i.e.

$$C b_s^2 - (C - (\mu_A + \mu_I)) b_s - \mu_A = 0 \quad (41)$$

with $C = \frac{N}{2}(\alpha_A - \alpha_I)$.

We note that, in the symmetrical case where $\alpha_A = \alpha_I$, we have $b_s = \mu_A/(\mu_A + \mu_I)$.

In other cases, we check that :

$$(C - \mu_A - \mu_I)^2 + 4\mu_A C = (C + \mu_A - \mu_I)^2 + 4\mu_A \mu_I \quad (42)$$

which is always positive because parameter rates are positive or null ; hence solutions to Eq.40 are real.

The correct solution is actually always given by the root:

$$b_s = \frac{(C - \mu_A - \mu_I) + \sqrt{(C - \mu_A - \mu_I)^2 + 4\mu_A C}}{2C} \quad (43)$$

Of course, C can be any real value (negative or positive), depending on $\alpha_A - \alpha_I$. However, we have:

$$\begin{aligned} \lim_{C \rightarrow -\infty} b_s(C) &= 0 \\ \lim_{C \rightarrow +\infty} b_s(C) &= 1 \\ b'_s(C) &> 0 \quad \forall C \end{aligned} \quad (44)$$

so that there always is a solution $b_s \in [0..1]$ for any set of parameters (see Fig. S3 for some illustration).

Complete solution in the field frame

A non homogeneous steady regime is then a propagating wave with a spatial profile in sech^2 with:

$$\left\{ \begin{aligned} \eta^s(x, t) &= \frac{N}{2} \frac{N(\alpha_A + \alpha_I)}{4v} \text{sech}^2 \left(\frac{N(\alpha_A + \alpha_I)}{4v} (x - b_s^* vt) \right) \\ \beta^s(x, t) &= b_s^* \\ &= \frac{\left(\frac{N}{2}(\alpha_A - \alpha_I) - \mu_A - \mu_I \right) + \sqrt{\left(\frac{N}{2}(\alpha_A - \alpha_I) - \mu_A - \mu_I \right)^2 + 4\mu_A \frac{N}{2}(\alpha_A - \alpha_I)}}{N(\alpha_A - \alpha_I)} \end{aligned} \right. \quad (45)$$

when $\alpha_A \neq \alpha_I$.

In the symmetrical case where $\alpha_A = \alpha_I$, the steady state solution simplifies to:

$$\left\{ \begin{aligned} \eta^s(x, t) &= \frac{N}{2} \frac{N\alpha}{2v} \text{sech}^2 \left(\frac{N\alpha}{2v} (x - b_s^* vt) \right) \\ \beta^s(x, t) &= b_s^* = \mu_A/(\mu_A + \mu_I) \end{aligned} \right. \quad (46)$$

7.2 Article : Neurogenic decisions require a cell cycle independant function of the CDC25B phosphatase, Bonnet et al. *Elife* 2018.

Neurogenic decisions require a cell cycle independent function of the CDC25B phosphatase

Frédéric Bonnet^{1†}, Angie Molina^{1†}, Mélanie Roussat¹, Manon Azais²,
Sophie Bel-Vialar¹, Jacques Gautrais², Fabienne Pituello^{1*}, Eric Agius^{1*}

¹Centre de Biologie du Développement, Centre de Biologie Intégrative, Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France; ²Centre de Recherches sur la Cognition Animale, Centre de Biologie Intégrative., Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France

Abstract A fundamental issue in developmental biology and in organ homeostasis is understanding the molecular mechanisms governing the balance between stem cell maintenance and differentiation into a specific lineage. Accumulating data suggest that cell cycle dynamics play a major role in the regulation of this balance. Here we show that the G2/M cell cycle regulator CDC25B phosphatase is required in mammals to finely tune neuronal production in the neural tube. We show that in chick neural progenitors, CDC25B activity favors fast nuclei departure from the apical surface in early G1, stimulates neurogenic divisions and promotes neuronal differentiation. We design a mathematical model showing that within a limited period of time, cell cycle length modifications cannot account for changes in the ratio of the mode of division. Using a CDC25B point mutation that cannot interact with CDK, we show that part of CDC25B activity is independent of its action on the cell cycle.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.001>

***For correspondence:**

fabienne.pituello@univ-tlse3.fr (FP);

eric.agius@univ-tlse3.fr (EA)

[†]These authors contributed equally to this work

Competing interests: The authors declare that no competing interests exist.

Funding: See page 25

Received: 18 October 2017

Accepted: 08 June 2018

Published: 03 July 2018

Reviewing editor: Constance L Cepko, Harvard Medical School, United States

© Copyright Bonnet et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Introduction

In multicellular organisms, managing the development, homeostasis and regeneration of tissues requires the tight control of self-renewal and differentiation of stem/progenitor cells. This issue is particularly evident in the nervous system, where generating the appropriate number of distinct classes of neurons is essential to constructing functional neuronal circuits.

Steadily increasing data reveal links between the cell cycle and stem cells' choice to proliferate or differentiate (*Soufi and Dalton, 2016*). The G1 phase is usually associated with the initiation of differentiation. Notably, the length of the G1 phase has been shown to play a major role in controlling cell fate decisions in neurogenesis, haematopoiesis (*Lange and Calegari, 2010*) and mammalian embryonic stem cells (*Coronado et al., 2013; Sela et al., 2012*), including human embryonic stem cells (hESCs) (*Pauklin and Vallier, 2013; Sela et al., 2012*). During cortical neurogenesis, a lengthening of the G1 phase is associated with the transition from neural-stem-like apical progenitors (AP) to fate restricted basal progenitors (BP) (*Arai et al., 2011*). Reducing G1 phase length leads to an increased progenitor pool and inhibition of neuronal differentiation, while lengthening G1 phase promotes the opposite effect (*Calegari et al., 2005; Pilaz et al., 2009*). In developing spinal cord, G1 phase duration increases with neurogenesis (*Kicheva et al., 2014; Saade et al., 2013*). Interestingly, in hESCs and in neurogenesis it has been shown that the stem/progenitor cell uses Cyclin D, which controls G1 phase progression, to directly regulate the signaling pathways and the transcriptional program controlling cell fate choice (*Bienvenu et al., 2010; Lukaszewicz and Anderson, 2011; Pauklin et al., 2016; Pauklin and Vallier, 2013*). A transient increase of epigenetic modifiers

at developmental genes during G1 has also been reported to create 'a window of opportunity' for cell fate decision in hESCs (Singh et al., 2015).

Modification of other cell cycle phases has been correlated with the choice to proliferate or differentiate. Work on hESCs reveals that cell cycle genes involved in DNA replication and G2 phase progression maintain embryonic stem cell identity (Gonzales et al., 2015), leading the authors to propose that S and G2/M mechanisms control the inhibition of pluripotency upon differentiation. In the amphibian or fish retina, the conversion of slowly dividing stem cells into fast-cycling transient amplifying progenitors with shorter G1 and G2 phases, propels them to exit the cell cycle and differentiate (Agathocleous et al., 2007; Locker et al., 2006). A shortening of the S phase correlates with the transition from proliferative to differentiating (neurogenic) divisions in mouse cortical progenitors (Arai et al., 2011). In the developing spinal cord, shorter S and G2 phases are associated with the neurogenic phase (Cayuso and Martí, 2005; Kicheva et al., 2014; Le Dréau et al., 2014; Molina and Pituello, 2017; Peco et al., 2012; Saade et al., 2017, 2013; Wilcock et al., 2007). Until now these links between cell cycle kinetics and cell fate were most often correlations, with the direct impact of cell cycle modifications on cell fate choice being only indirectly addressed. The strong correlations between the cell cycle machinery and the stem cell's choice in different model systems, emphasize the importance of elucidating how these systems work.

Notably, in developing neuroepithelia, cell cycle is synchronized with an oscillatory nuclear movement called Interkinetic Nuclear Migration (INM). Nuclei of progenitor cells occupy specific positions according to cell cycle phase: nuclei migrate basally in the G1 phase, so that the S phase occurs on the basal side, and apically in the G2 phase, allowing mitosis to happen at the apical surface (Molina and Pituello, 2017; Norden et al., 2009). In mouse corticogenesis and in the chicken neural tube, it was shown that nuclei migrate apically during G2 using the dynein/microtubule motor system (Baffet et al., 2015; Spear and Erickson, 2012). It has been established that a key cell cycle regulator, the cyclin-dependent kinase 1 (CDK1), triggers dynein recruitment to nuclear pores leading to apical nuclear movement during G2 phase (Baffet et al., 2015). The mechanisms involved in basalward migration in G1 are more controversial, ranging from a passive and stochastic process driven by a crowding effect to a movement triggered by microtubule/kinesin3 or actomyosin cytoskeleton (Miyata et al., 2014; Molina and Pituello, 2017; Spear and Erickson, 2012). In the chicken spinal cord, zebrafish retina and rat neocortex, it has been proposed that progenitor nuclei position along the apico-basal axis could lead to a differential exposure to proliferative or differentiative signals that could in turn regulate progenitors cell fate (Carabalona et al., 2016; Del Bene, 2011; Del Bene et al., 2008; Murciano et al., 2002).

A link has previously been established between a regulator of the G2/M transition, the CDC25B phosphatase and neurogenesis (Gruber et al., 2011; Peco et al., 2012; Ueno et al., 2008). The cell division cycle 25 family (CDC25) is a family of dual specificity phosphatases that catalyze the dephosphorylation of CDKs, leading to their activation and thereby cell cycle progression (Aressy and Ducommun, 2008). Three CDC25s A, B, C have been characterized in mammals, and two, CDC25s A and B have been found in chick (Agius et al., 2015; Boutros et al., 2007). As observed for numerous cell cycle regulators, these molecules are tightly regulated at the transcriptional and post-transcriptional levels (Boutros et al., 2007). The N-terminal region of CDC25B contains the regulatory domain, and the C-terminal region hosts the catalytic domain and the domain of interaction with known substrates, the CDKs (Sohn et al., 2004). In *Xenopus*, CDC25B loss-of-function reduces the expression of neuronal differentiation markers (Ueno et al., 2008). An upregulation of CDC25B activity associated with precocious neurogenesis has been observed in an animal model of microcephaly (Gruber et al., 2011). Using the developing spinal cord as a paradigm, we previously reported that CDC25B expression correlates remarkably well with areas where neurogenesis occurs (Agius et al., 2015; Peco et al., 2012). We showed that reducing CDC25B expression in the chicken neural tube alters both cell cycle kinetics, by increasing G2-phase length, and neuron production (Agius et al., 2015; Peco et al., 2012). However, it is not clear whether the change in cell cycle kinetics is instrumental in cell fate change.

The aim of the present study is to further understand the mechanisms by which CDC25B promotes neurogenesis. First, we use a neural specific loss-of-function in mice to show that *Cdc25b* is also required for efficient neuron production in mammals. Second, we use gain- and loss-of-function in chicken to show that CDC25B is necessary and sufficient to promote neuron production by controlling the mode of division. We directly measured CDC25B effects upon modes of division, using

recently developed biomarkers that allow differentiating with single-cell resolution proliferative versus neurogenic divisions in the developing spinal cord (Le Dréau et al., 2014; Saade et al., 2017; Saade et al., 2013). We also carried out a clonal analysis using the Brainbow strategy (Loulrier et al., 2014). Both approaches show that CDC25B decreases proliferative divisions and promotes neurogenic divisions. In addition, we show that CDC25B controls the switch from slow to fast nuclei departure to the basal side during early G1 in the proliferative population. A mathematical model of these dynamics suggests that the cell cycle duration is not instrumental in the observed evolution of the mode of division.

Furthermore, to directly address the putative role of cell cycle kinetics on the mode of division, we use a point mutated form of CDC25B, CDC25B^{ACDK} unable to interact with CyclinB/CDK1 complex. We show that this molecule affects basal G1 movement, neurogenic divisions and neuronal differentiation, even though it does not affect the duration of the G2 phase.

Results

Genetic *Cdc25b* invalidation induces a G2-phase lengthening and impedes neuron production in the mouse developing spinal cord

We previously showed that downregulating CDC25B levels using RNAi in the chicken neural tube results in a G2 phase lengthening and a reduction of the number of neurons (Peco et al., 2012). Here we used a genetic approach to question whether both functions are conserved in mammals, using a floxed allele of *Cdc25b* and a *NestinCre;Cdc25b*^{+/−} mouse line to specifically ablate the phosphatase in the developing nervous system (Figure 1A). In the mouse embryo, *Cdc25b* is detected in the neural tube from E8.5 onward and remains strongly expressed in areas where neurogenesis occurs, as illustrated in the E11.5 neural tube (Figure 1B). Loss of *Cdc25b* mRNA was observed from E10.5 onward in *NestinCre;Cdc25b*^{fl/−} embryos (*Cdc25b*^{nesKO}, Figure 1B). We therefore determined the consequences of the Cre-mediated deletion of the floxed *Cdc25b* allele on cell cycle parameters and neurogenesis starting at E11.5.

The proliferation capacity of the neural progenitors in *NestinCre;Cdc25b*^{fl/−} embryos, was determined by quantification of EdU labelled replicating neural progenitors. The proliferative index in the dorsal spinal cord (number of EdU+ cells among total number of neural progenitors labelled with Pax7 antibody) was similar between *NestinCre;Cdc25b*^{fl/−} and control embryos (*NestinCre;Cdc25b*^{fl/+} or *Cdc25b*^{fl/+} or *Cdc25b*^{fl/−}) (Figure 1C). Similarly, the fraction of mitotic cells assessed by quantifying the number of Phospho-Histone 3 (PH3) mitotic cells in the Pax7+ cells displayed a slight and non-significant reduction in the mitotic index of mutant embryos (Figure 1D). Since downregulating CDC25B in the chicken neural tube resulted in a lengthening of the G2 phase, we next compared the length of the G2 phase in the dorsal spinal cord of *NestinCre;Cdc25b*^{fl/−} versus control embryos using the percentage of labeled mitosis (PLM) (Quastler and Sherman, 1959). Embryos were injected with EdU and allowed to recover for 1 hr, 2 hr or 3 hr before fixation and staining with EdU and PH3 antibodies. We found that the percentage of PH3/EdU positive cells was consistently lower in the dorsal domain of *NestinCre;Cdc25b*^{fl/−} versus control embryos (Figure 1E). The average G2-lengths extracted from the curve were 2 hr 19 min in mutants compared to 1 hr 49 min in controls (Figure 1E). This indicates that *Cdc25b* loss-of-function in dorsal neural progenitors results in a G2 phase lengthening.

The question is then whether *Cdc25b* loss-of-function affects spinal neurogenesis. Neuron production occurs in two phases in the dorsal spinal cord, an early neurogenic phase (between E9.5 and E11.5) and a late neurogenic phase (between E11.5 and E13.5) (Hernandez-Miranda et al., 2017). Neurons emerging from the dorsal spinal cord express numerous transcription factors including Pax2 and Tlx3 that label distinct neuron types and when combined, identify different subtypes of early (Pax2: dl4, dl6; Tlx3: dl3, dl5) and late born neurons (Pax2: dlLA; Tlx3: dlLB). The use of a *NestinCre* mouse line allows us to accurately ablate the phosphatase at the time of late neuron production (Hernandez-Miranda et al., 2017). We hence analyze the impact of the deletion at E11.5 and E12.5. At E11.5, the number of Tlx3+ cells is reduced in the *NestinCre;Cdc25b*^{fl/−} compared to control embryos. Pax2+ neurons are also reduced yet non-significantly (Figure 1F,G). One day later, a clear and significant reduction of 25.7% and 28% in the number of Pax2+ and Tlx3+ neurons,

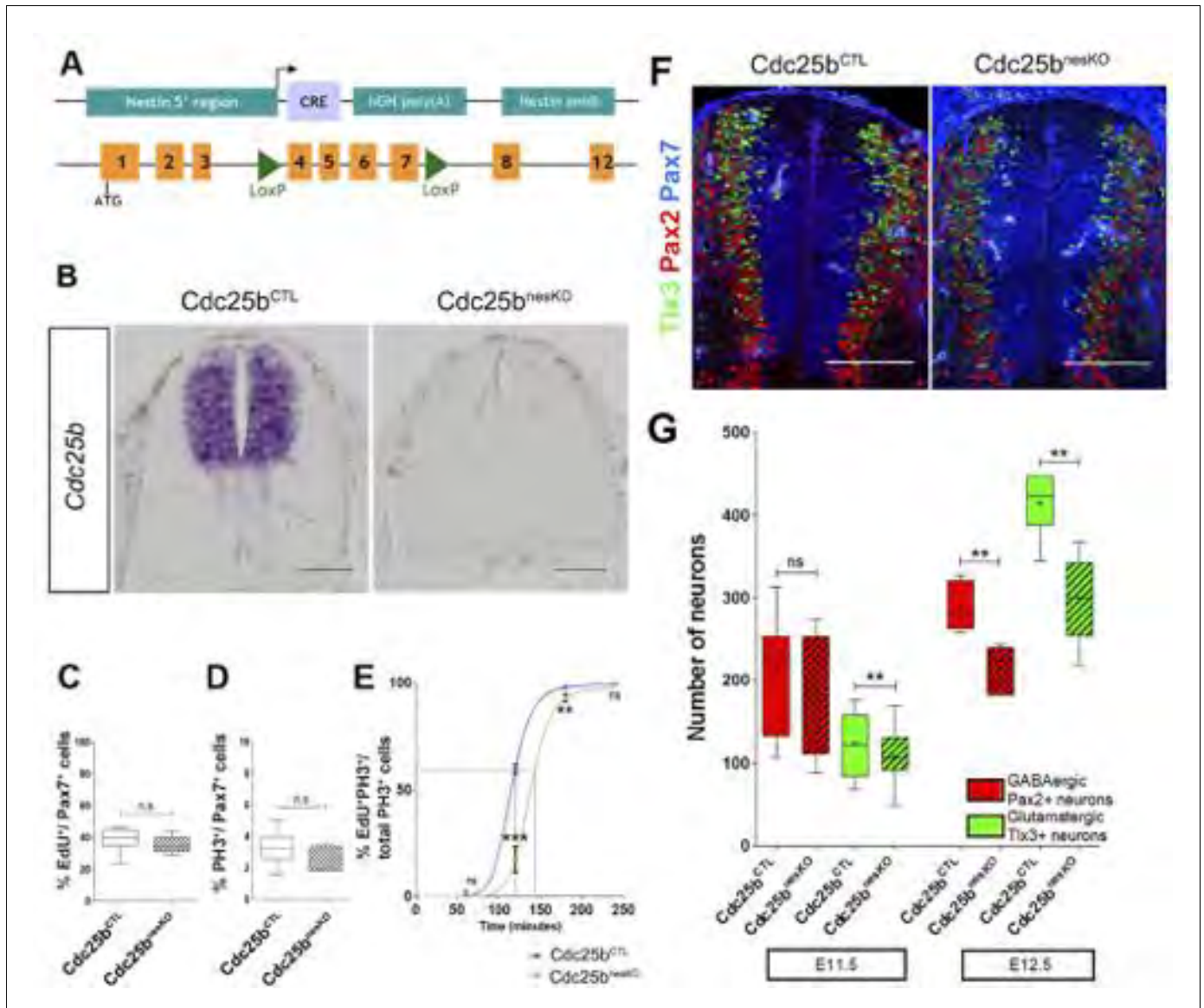


Figure 1. *Cdc25b* conditional genetic loss-of-function increases the G2-phase length and impairs dorsal spinal neurogenesis. (A) Scheme of the genetic construction for *Cdc25b* conditional loss-of-function. (B) *Cdc25b* *in situ* hybridization at E11.5 in control (*Cdc25b*^{CTL}) and conditional nesKO (*Cdc25b*^{nesKO}) conditions. (C–D) Box plots (5/95 percentile) comparing the proliferative index: distribution of the percentage of EdU⁺/Pax7⁺ cells indicative of the rate of S-phase cells at E11.5 in control and nesKO neural tubes (C), distribution of the percentage of PH3⁺/Pax7⁺ cells indicative of the mitotic index at E11.5 in control and nesKO neural tubes (D). The proliferative index was analyzed using 20 control and seven nesKO embryos. (E) Progression of the percentage of EdU⁺PH3⁺/total PH3⁺ labeled nuclei with increasing EdU exposure time in control and nesKO conditions. The dashed lines correspond to 50% EdU⁺/PH3⁺ cells and indicate the G2 length. (F) Cross-sections of E12.5 embryo neural tubes, stained with Pax7, Pax2 and Tlx3 immunostaining in control and nesKO conditions. (G) Box plots (5/95 percentile) comparing the distribution of the number of Pax2 and Tlx3 neurons in control and nesKO conditions at E11.5 and E12.5. The number of analyzed embryos was 15 control vs 11 nesKO for Pax2 and 15 control vs 10 nesKO for Tlx3. The cross indicates the mean value. Mixed model, ** $p < 0.01$. Scale bar represents 100 μm .

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.002>

The following figure supplement is available for figure 1:

Figure supplement 1. *Cdc25b* conditional genetic loss-of-function affects the progenitor pool.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.003>

respectively, is observed following *Cdc25b* deletion. Progenitor domain size measured at E11.5 and E12.5 using Pax7 or Sox2 immunohistochemistry shows non-significant differences (**Figure 1—figure supplement 1**). Analysis of dorsal progenitor nuclear density using DAPI shows a small and constant 7.5% and 7.3% reduction at E11.5 and E12.5, respectively, in mutant versus control embryos (**Figure 1—figure supplement 1**), indicating that neuronal reduction is at least partly due to this small reduction in the progenitor population. Quantification of active caspase three immunostaining (E12.5) does not reveal an increase in cell death, showing that the reduction in neuron number is not due to apoptosis (not shown). The ratio of dILA to dILB neurons is similar in control (0.68) and mutant embryos (0.71), confirming that *Cdc25b* does not impact specific neuronal cell type but rather has a generic effect on neuron production. Together, these observations demonstrate that efficient spinal neuron production requires CDC25B in mammalian embryos and illustrate that this function is conserved among higher vertebrates.

CDC25B gain-of-function increases neuronal production

The fact that CDC25B downregulation impedes neuron production in mouse and chicken embryos, prompted us to test whether CDC25B gain-of-function is sufficient to stimulate neurogenesis. It is not possible to perform CDC25B gain-of-function using a robust ubiquitous promoter, because an unscheduled increase of the phosphatase during the cell cycle leads to mitotic catastrophe and subsequent apoptosis (*Peco et al., 2012*). To circumvent this technical impasse, we express CDC25B using the mouse cell cycle dependent CDC25B cis regulatory element (ccRE) that reproduces the cell cycle regulated transcription of CDC25B (*Körner et al., 2001*) and prevents apoptosis (*Kieffer et al., 2007*). We verify that ccRE is sufficient to drive lacZ reporter expression in the entire chicken neural tube after transfection by in ovo electroporation (**Figure 2—figure supplement 1A**). Under the control of ccRE, the eGFP-CDC25B fusion protein is expressed in a subset of transfected cells (**Figure 2A**). The level of chimeric protein detected results from the periodic expression induced by the promoter and the intrinsic instability of CDC25B actively degraded at the end of mitosis. The fusion protein can be observed both in the nucleus and cytoplasm of neuroepithelial progenitors located close to the lumen (L) and in mitotic progenitors (**Figure 2A**, arrowhead). The gain-of-function does not induce apoptosis, as revealed by quantification of active caspase three immunostaining (**Figure 2—figure supplement 1B–D**). To ascertain that the phosphatase is functional, we analyze its impact on G2 phase duration. As expected, ectopic expression of the phosphatase shortens the G2 phase (**Figure 2B**, blue curve) without significantly modifying the mitotic index or the proliferation index (**Figure 2—figure supplement 1E–F**).

Quantitative analysis performed on the entire neural tube using NeuroD-reporter assay indicates that increasing CDC25B is sufficient to promote neuronal commitment (**Figure 2—figure supplement 2**). In the neural tube, development of the ventral progenitor population is usually considered more advanced than its dorsal counterpart (*Kicheva et al., 2014; Saade et al., 2013*). Accordingly, the temporality of neuron production progresses from ventral to dorsal (*Kicheva et al., 2014; Saade et al., 2013*) and correlates with endogenous CDC25B expression (*Peco et al., 2012*). We therefore analyze separately the fraction of neurons generated following CDC25B gain-of-function in the ventral and dorsal halves of this structure. In the ventral neural tube, CDC25B gain-of-function increases the percentage of HuC/D⁺ GFP⁺ cells from $61.6 \pm 1.5\%$ to $76.5 \pm 0.9\%$. Similarly, in the dorsal spinal cord, the proportion increases from $30.7 \pm 1.34\%$ to $41.8 \pm 2.64\%$ with the CDC25B gain-of-function (**Figure 2F,G**). A significant increase in neurogenesis is also observed using Pax2 immunostaining, from $11.4 \pm 1\%$ to $20 \pm 1.8\%$ (**Figure 2C,D**). Conversely, CDC25B gain-of-function reduces the proportion of cells expressing the progenitor marker Sox2 (**Figure 2E**). Together, these results indicate that CDC25B is sufficient to stimulate neuron production.

CDC25B has no effect on mitotic spindle parameters

An increase in CDC25B activity has been shown to induce a shifted cleavage plane and precocious neurogenesis during corticogenesis in mouse (*Gruber et al., 2011*). We therefore tested the effect of CDC25B gain-of-function on spindle orientation in spinal neural precursors. We measured the angle of the mitotic spindle as previously described (*Saadaoui et al., 2014*), and we did not observe a significant change in spindle orientation (**Figure 3A,B**). Another element implicated in asymmetric cell fate in neural progenitors is the spindle-size asymmetry (SSA), that is, the difference in size

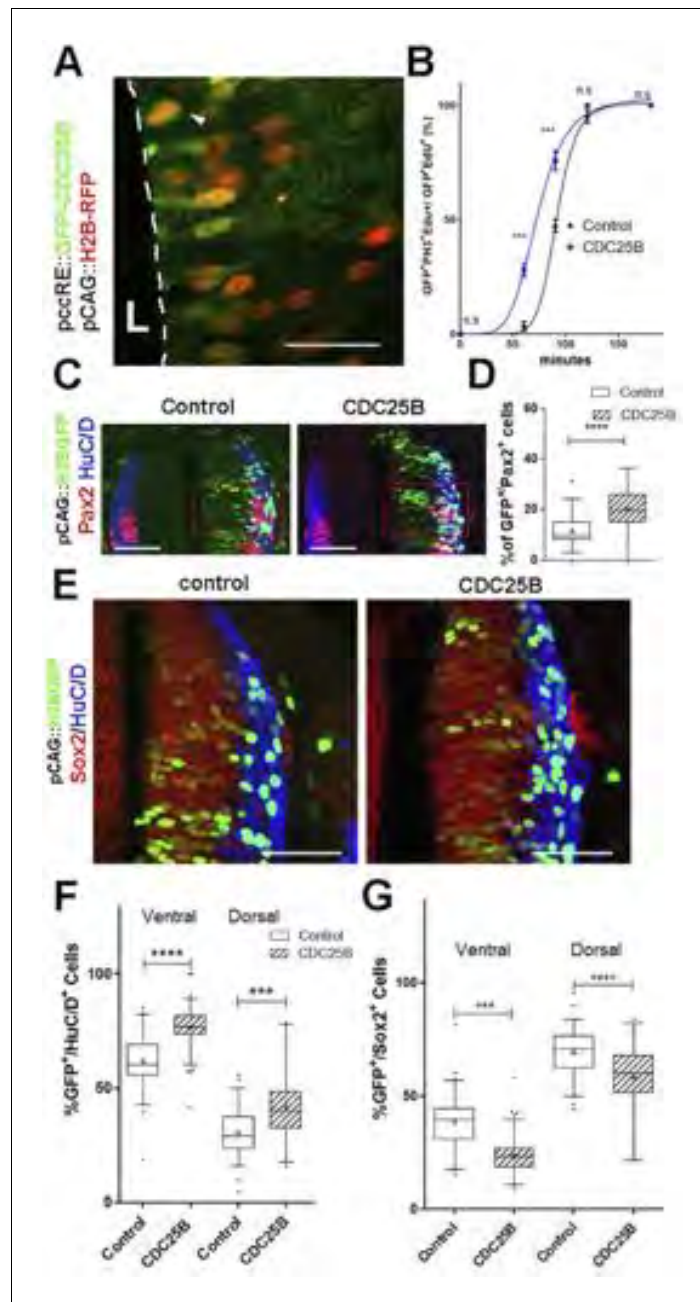


Figure 2. CDC25B speeds up neuronal production. (A) Cross section of E2.5 chick spinal cord 24 hr after electroporation of pCAG::H2B-RFP vector and pccRE::GFP-CDC25B vector, followed by an anti-GFP immunolocalisation. Note that the protein is expressed in the dorsal neuroepithelium in cells exhibiting a nucleus close to the lumen side (L) or undergoing mitosis (arrowhead). Scale bar indicates 50 μ m. (B) Curves representing the percentage of electroporated GFP⁺EdU⁺PH3⁺ over the total GFP⁺ EdU⁺ cells with increasing EdU exposure times: control (black), CDC25B gain of function (blue). Note that the curve corresponding to the CDC25B condition (blue) is shifted to the left, showing a reduction in G2 phase length. (C) Representative sections of E3.5 chick spinal cord 48 hr after co-electroporation of a pCAG::H2B-GFP with either a pccRE::lacZ (control) or a pccRE::CDC25B expression vector and processed for Pax2 (red) and HuC/D (blue) immunostaining. The red box illustrates the quantified domain. Scale bars indicate 100 μ m. (D) Box plots (5/95 percentile) comparing the percentage of Pax2⁺ cells within the electroporated population in the control and CDC25B gain-of-function experiments in the dorsal neural tube. Data from three different experiments with eight embryos for the control, and five embryos for the CDC25B gain-of-function. (E) Representative sections of E3.5 chick spinal cord 48 hr after

Figure 2 continued on next page

Figure 2 continued

co-electroporation of pCAG::H2B-GFP with either a control or a CDC25B expression vector and processed for Sox2 (red) and HuC/D (blue) immunostaining. Scale bars indicate 100 μ m. (F) Box plots (5/95 percentile) comparing the percentage of electroporated HuC/D⁺ cells in the ventral and dorsal neural tube. Data represent three different experiments with a total of 13 dorsal and six ventral embryos for the control, and 6 dorsal and seven ventral embryos for the CDC25B gain-of-function. The cross represents the mean value. (G) Box plots (5/95 percentile) comparing the percentage of Sox2⁺ cells within the electroporated dorsal or ventral neural tube in the control, and CDC25B gain-of-function. Same conditions as in F.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.004>

The following figure supplements are available for figure 2:

Figure supplement 1. CDC25B gain-of-function does not increase apoptosis, S or M cell cycle phase lengths.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.005>

Figure supplement 2. Effects of various CDC25B constructs on NeuroD promoter activity.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.006>

between the two sides of the spindle (Delaunay et al., 2014). Our CDC25B gain-of-function experiments did not induce a significant modification of the SSA in chick spinal neural progenitors (Figure 3C–D). In summary, our analyses did not reveal an effect of CDC25B activity on the orientation or the size of the mitotic spindle.

CDC25B downregulation maintains proliferative divisions and hinders neurogenic divisions

To elucidate CDC25B function, we investigate whether it promotes neurogenesis by controlling the division mode of neural progenitors. We take advantage of a strategy recently developed by E. Marti and colleagues, described to distinguish the three modes of division, PP, PN and NN, occurring in the developing chicken spinal cord (Le Dréau et al., 2014; Saade et al., 2017; Saade et al., 2013). Briefly, the neural tube is electroporated with Sox2::GFP and Tis21::RFP reporters, and 24 hr later the number of neural progenitors expressing these markers is quantified at mitosis. Thus, Sox2⁺Tis21[−] cells expressing only Sox2::GFP correspond to PP divisions, Sox2[−]Tis21⁺ cells correspond to NN divisions, while cells co-expressing both biosensors Sox2⁺Tis21⁺ correspond mostly to asymmetric neurogenic divisions, PN (Figure 4A). Using these biomarkers in the dorsal neural tube, we obtained comparable results to the ones previously described (Figure 2B in Le Dréau et al., 2014). Because the number of electroporated cells in mitosis is very small, we determine whether counting neural progenitors displaying green, yellow or red fluorescence is equivalent to counting only mitotic cells in the dorsal spinal cord 24 hr post electroporation. We do not detect a significant difference in the distribution of cells in total neuroepithelial progenitors (55.4 $\pm$ 6.2% Sox2⁺Tis21[−] cells, 29.3 $\pm$ 3.9% Sox2⁺Tis21⁺ cells and 15.2 $\pm$ 2.9% Sox2[−]Tis21⁺ cells) and during mitosis (57.9 $\pm$ 9.3% Sox2⁺Tis21[−] cells, 23.2 $\pm$ 8.5% Sox2⁺Tis21⁺ cells and 19 $\pm$ 7.3% Sox2[−]Tis21⁺ cells) (Figure 4B). Because of reporter stability, the temporal window of analysis of Sox2/Tis21 reporters is restricted to 24 hr (Saade et al., 2013). Recent data indicate that Sox2 mRNA expression can be sustained in some neurogenic progenitors (Albert et al., 2017). A fraction of the Sox2⁺Tis21⁺ cells might therefore correspond to NN rather than PN divisions, suggesting that the use of these biomarkers is not sufficient to separate PN and NN divisions in our experimental conditions. Therefore, even if we quantified separately the three populations, we considered the Sox2⁺Tis21⁺ and the Sox2[−]Tis21⁺ progeny as a whole, producing neurogenic divisions, and compared it to the Sox2⁺Tis21[−] cells performing proliferative divisions.

CDC25B RNAi electroporation leads to a consistent and strong downregulation in CDC25B transcripts located in the intermediate neural tube (Figure 4C, bracket). We therefore determine the impact of CDC25B downregulation on the mode of division in progenitors located in this domain. We co-electroporate the biomarkers with either the CDC25B-RNAi plasmid, or the control scrambled plasmid at stage HH11, and quantify the distribution of Sox2⁺Tis21[−], Sox2⁺Tis21⁺ and Sox2[−]Tis21⁺ cells 24 hr later at stage HH17 (Figure 4D–E). When compared to the control scrambled RNAi, the CDC25B RNAi induces a massive increase in Sox2⁺Tis21[−] progeny (13.4 $\pm$ 1.3% to 35.1 $\pm$ 1.8%), and a decrease in Sox2⁺Tis21⁺ progeny (from 72.1 $\pm$ 1.85% to 56.2 $\pm$ 1.70% and to some extent, in Sox2[−]Tis21⁺ progeny (from 14.6 $\pm$ 1.43% to 8.74 $\pm$ 0.8%, Figure 4E). Therefore

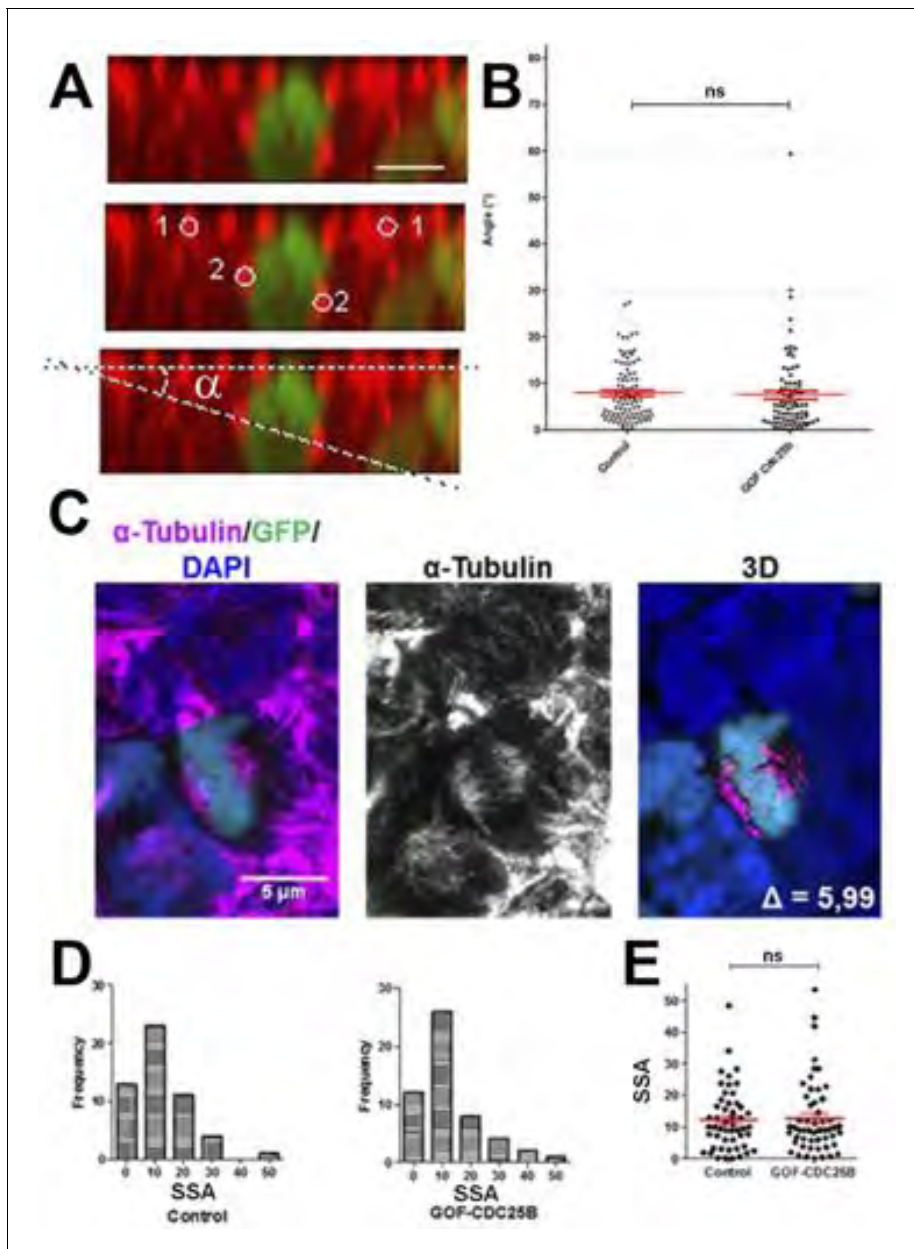


Figure 3. CDC25B gain-of-function does not affect mitotic spindle orientation or spindle-size asymmetry (SSA). (A) Representative Z plane image of an anaphase cell expressing H2B-GFP that decorates chromosomes (green) and immunostained with anti γ tubulin antibody to label centrosomes (red). Aligned interphase centrosomes labelled as one and mitotic spindle poles labelled as 2 (middle image) were used to measure mitotic spindle angle α (lower image). (B) Quantification of mitotic spindle angle α , 24 hr after electroporation in control and CDC25B gain-of-function experiments. (C) Representative image of a symmetric metaphase cell: H2B-GFP and DAPI stain the nuclei, and α -Tubulin stains the mitotic spindle (left and middle images). Right image, 3D reconstruction of the symmetric spindle using Imaris software. (D, E) Distribution of the Spindle-Size Asymmetry (SSA) difference between the two sides of the spindle 24 hr after electroporation in control and CDC25B gain-of-function: Histogram of SSA distribution (D) and scatter plot of SSA distribution (E). Scale bars represent 5 μ m.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.007>

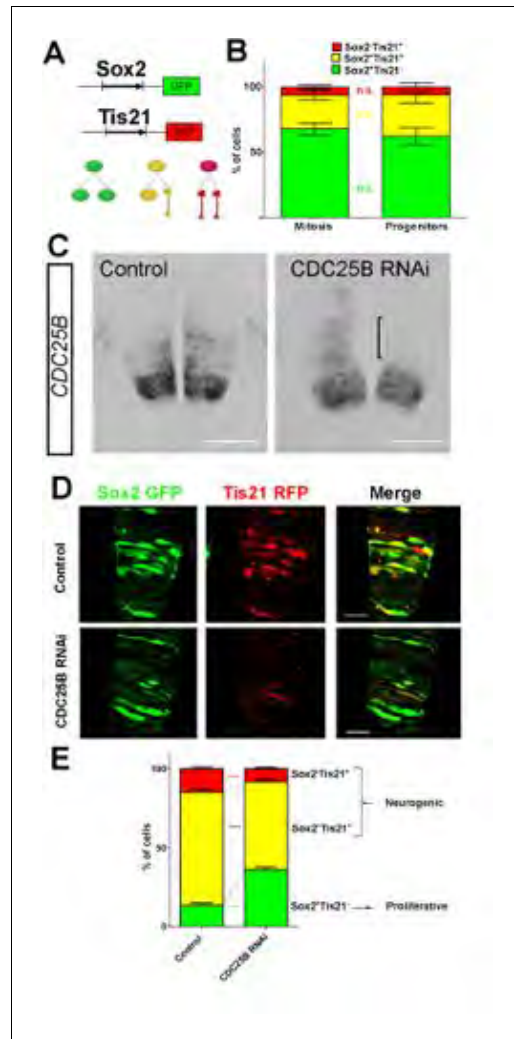


Figure 4. CDC25B downregulation reduces neurogenic divisions. (A) Schematic representation of the Sox2::GFP Tis21::RFP labelling strategy. A GFP expressing cell (green cell) corresponds to a PP division, a cell expressing both GFP and RFP (yellow cell) corresponds to a PN division, and a RFP expressing cell (red cell) corresponds to a NN division. (B) Bar plot representing the percentage of cells expressing the reporters Sox2::GFP and Tis21::RFP at HH17 in the entire progenitor population, or in progenitors performing mitosis identified with phospho-histone-3 (PH3) immunostaining. Note that these results are not significantly different. These data are obtained from three different experiments, seven embryos, 365 progenitors, and 79 mitoses. (C) In situ hybridization for CDC25B on HH17 spinal cord, 24 hr post electroporation of Control RNAi (left panel) and CDC25B RNAi (right panel). The reduction of CDC25B expression in the intermediate region is indicated by a bracket. Cells were electroporated on the right side of the neural tube (not shown). Scale bars indicate 100 μ m. (D) Cross-sections of chick spinal cord at HH17, 24 hr post electroporation. (E) Bar plot representing the percentage of cells in different states at HH17, 24 hr post electroporation. Note that these results are not significantly different. These data are obtained from three different experiments, seven embryos, 365 progenitors, and 79 mitoses. Figure 4 continued on next page

CDC25B RNAi increases proliferative divisions from $13.4 \pm 1.3\%$ to $35.1 \pm 1.8\%$ and decreases neurogenic divisions from $86.6 \pm 1.3\%$ to $63.9 \pm 1.8\%$ (P-value < 0,0001). This observation indicates that CDC25B downregulation hinders neuron production by maintaining proliferative divisions and reducing neurogenic divisions.

CDC25B Gain-of-function promotes neurogenic divisions

We then tested how CDC25B gain-of-function affects the mode of division using two different approaches: the Tis21/Sox2 assay (Saade et al., 2013) (Figure 5A,D,F), and a clonal analysis using the Brainbow technique (Tozer et al., 2017) (Figure 5B,C,E). Analyzing the distribution of the mode of division with the Tis21/Sox2 strategy in the entire neuroepithelium at 24 hr after electroporation, showed that CDC25B leads to a decrease in Sox2⁺Tis21⁻ progeny (from $46.1 \pm 2.1\%$ to $27.3 \pm 1.8\%$), an increase in Sox2⁺Tis21⁺ progeny (from $43.4 \pm 1.9\%$ to $50.9 \pm 1.6\%$), and Sox2⁻Tis21⁺ progeny (from $10.5 \pm 0.8\%$ to $21.8 \pm 1.5\%$, Figure 5A,D). This shows that CDC25B gain-of-function reduces proliferative divisions from $46.1 \pm 2.1\%$ to $27.3 \pm 1.8\%$ and increases neurogenic divisions from $53.8 \pm 2.1\%$ to $72.7 \pm 1.8\%$ (P-value < 0,0001). Embryos co-transfected with the Nucbow vector (Loulie et al., 2014), limiting amounts of Cre recombinase (Morin et al., 2007) and the various gain-of-function constructions, were harvested after 40 hr at stage HH21 and labelled using HuC/D immunostaining (Figure 5B,C). Two cells clones located in low electroporated density area were selected on the basis of color identity (Tozer et al., 2017) and categorized as proliferative divisions: HuC/D⁻-HuC/D⁻ (upper panel in Figure 5C), and neurogenic divisions either HuC/D⁺-HuC/D⁻ (middle panel in Figure 5C) or HuC/D⁺-HuC/D⁺ (lower panel in Figure 5C).

Using this alternative strategy, we showed that the expression of CDC25B leads to a decrease in HuC/D⁻-HuC/D⁻ cells (from $76.5 \pm 2.6\%$ to $60.7 \pm 2.3\%$) and to an increase in HuC/D⁻-HuC/D⁺ cells (from $9.4 \pm 1.5\%$ to $16.3 \pm 1.7\%$) and HuC/D⁺-HuC/D⁺ (from $14.1 \pm 2.3\%$ to $23.0 \pm 2.1\%$, Figure 5E). We observe a decrease in proliferative divisions from $76.5 \pm 2.6\%$ to $60.7 \pm 2.3\%$ and an increase of neurogenic divisions from $23.8 \pm 2.5\%$ to $39.4 \pm 2.3\%$ (P-value < 0.001). While the mode of division repartitions were probably different due to inherent differences in the two strategies, CDC25B gain-of-function results in consistent modifications in both

Figure 4 continued

hr after co-electroporation of Sox2::GFP and Tis21::RFP reporter, plus a control RNAi vector or the CDC25B-RNAi vector. Scale bars indicate 50 μ m. (E) Bar plot representing the percentage of progenitors expressing Sox2::GFP and Tis21::RFP 24 hr after co-electroporation of a control vector or a CDC25B RNAi vector. 4 experiments include seven control embryos and 15 CDC25B RNAi embryos.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.008>

assays : a reduction of 15.8 percentage-points (pp) (from 76.5% to 60.6%) and 18.8 pp (from 46.1% to 27.3%) in proliferative divisions and a corollary increase of 15.8 pp (from 23.7% to 36.4%) and 18.8 pp (from 53.8% to 72.7%) in neurogenic divisions in the Nucbow and the Tis21/Sox2 assays, respectively (Figure 5D,E). These results indicate that CDC25B gain-of-function in spinal neural progenitors reduces

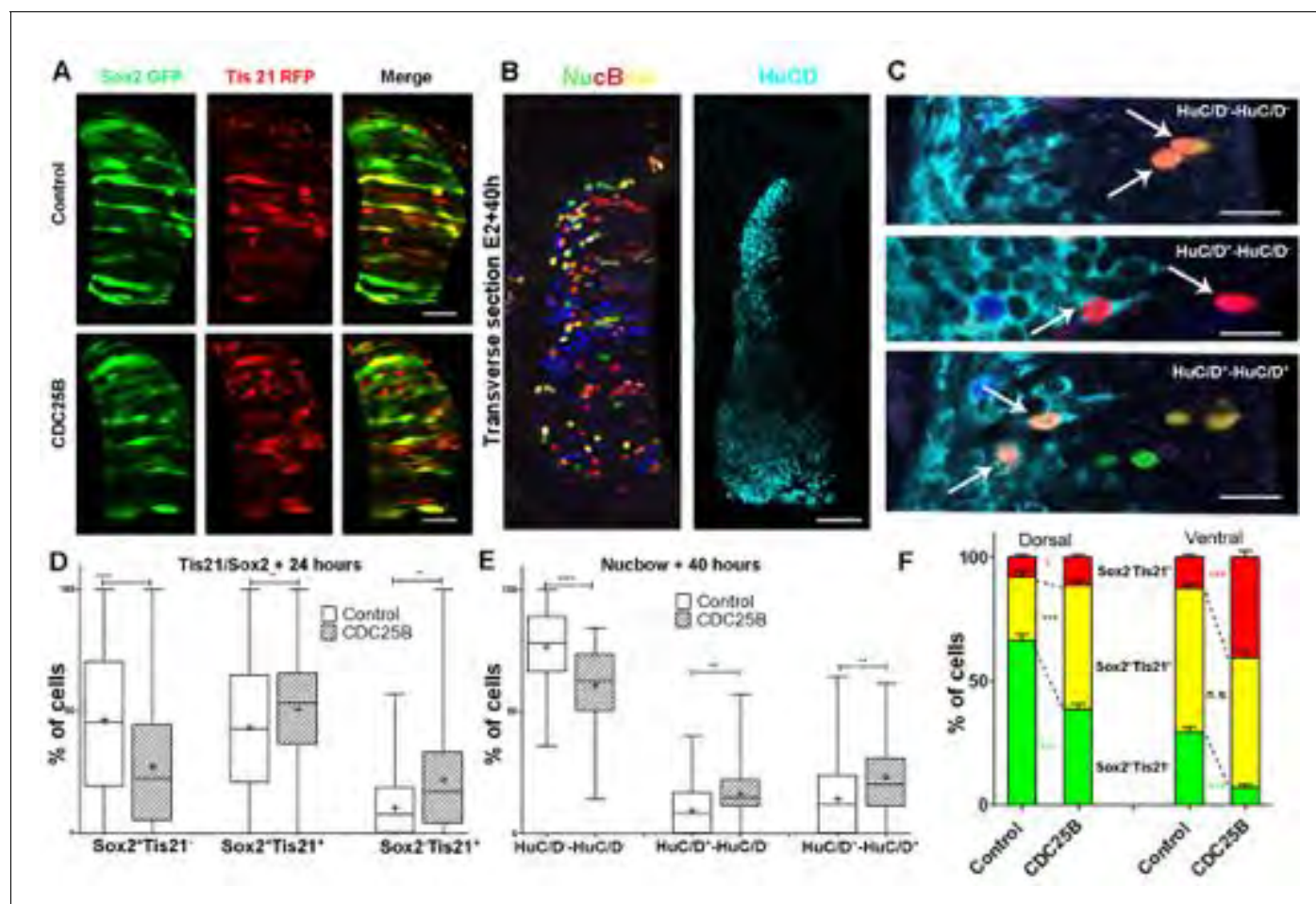


Figure 5. CDC25B gain-of-function promotes neurogenic divisions. (A) Representative cross-sections of HH17 chick spinal cord, 24 hr after electroporating Sox2::GFP and Tis21::RFP reporters, plus a control vector pccRE::lacZ, or a pccRE::CDC25B vector. Scale bars indicate 50 μ m. (B) Representative cross-sections of HH21 chick spinal cord, 40 hr after electroporation of Nucbow and pCX CRE vectors, and immunostaining with HuC/D antibody. Scale bar indicates 50 μ m. (C) Specific two cell clone examples, 40 hr after transfection of Nucbow and immunostaining with HuC/D antibody. Scale bars indicate 10 μ m. (D) Box plots (5/95 percentile) comparing the percentage of progenitors expressing Sox2::GFP and Tis21::RFP 24 hr after co-electroporation with control or CDC25B vectors in the entire spinal cord. Data represent the means $\pm$ SEM of 3 different experiments with 5 control and 6 CDC25B gain-of-function embryos. (E) Box plots (5/95 percentile) comparing the percentage of two cell clones expressing Nucbow and pCX CRE vectors, 40 hr after co-electroporation with control or CDC25B vectors in the entire spinal cord. Data represent the means $\pm$ SEM of 3 different experiments with 387 clones in 12 control embryos, and 659 clones in 11 CDC25B gain-of-function embryos. (F) Bar plot representing the percentage of progenitors expressing Sox2::GFP and Tis21::RFP 24 hr after co-electroporation with control or CDC25B vectors in the dorsal and ventral spinal cord. Data represent the means $\pm$ SEM. Data represent three different experiments with 5 dorsal and 10 ventral neural tubes in the control, and 5 dorsal and six ventral neural tubes in the CDC25B gain-of-function.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.009>

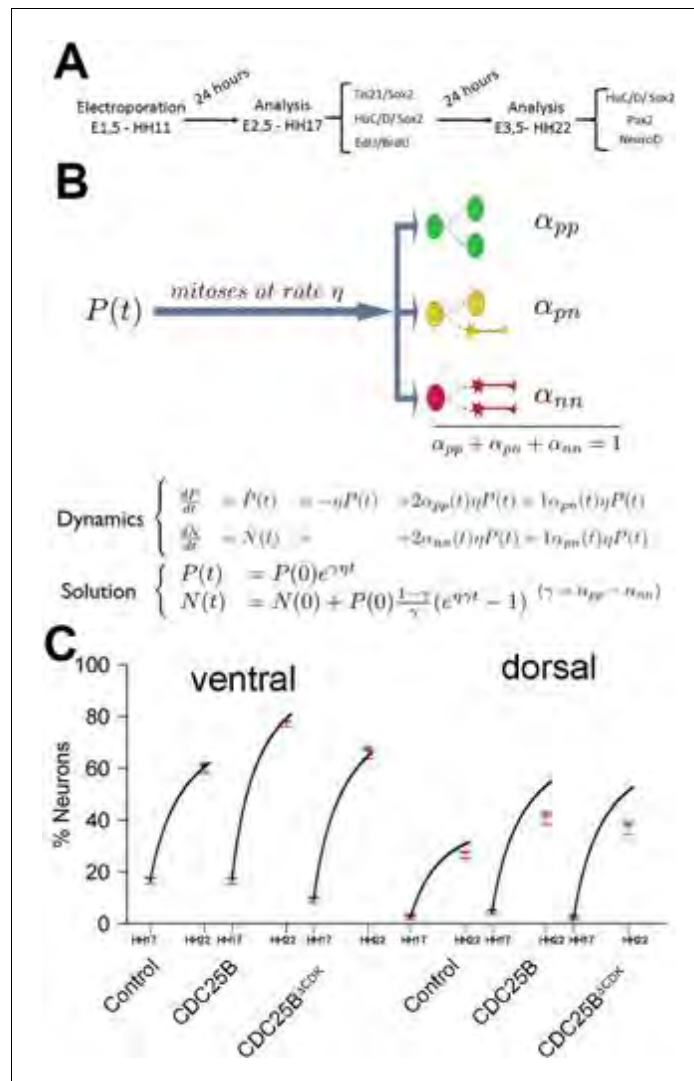


Figure 6. Mathematical model linking the mode of division to the fraction of neurons generated. **(A)** Scheme of the experimental time course. Neural tubes are electroporated at stage HH11. 24 hr (HH17) and 48 hr (HH22) post electroporation, cell cycle parameters, mode of division and progenitor/neuronal markers are analyzed. **(B)** Illustration of our mathematical model. We consider $P(t)$ a pool of progenitors at a given time with a mitotic rate η . These mitoses lead to three modes of division: a fraction α_{pp} producing symmetric proliferative divisions yielding two progenitors, a fraction α_{pn} producing asymmetric divisions yielding one progenitor and one neuron (a precursor of), and a fraction α_{nn} producing symmetric neurogenic divisions yielding two neurons. The equations display the dynamics governing the pools of progenitors $P(t)$ and neurons $N(t)$ at any time t . These dynamics are solved for a given initial condition $P(0)$, $N(0)$, and we obtain the state of the system any time later (Solution, details in Appendix 2 and Appendix 4). **(C)** Kinetic predictions of the neuronal fraction between stages HH17 and HH22 in the different conditions, compared to the mean $\pm 95\%$ confidence interval (in red) of the experimental data at stages HH17 and HH22 (from Figures **Figure 2F** and **Figure 7E**).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.010>

proliferative divisions and promotes neurogenic divisions.

As previously described, neurogenesis progresses from ventral to dorsal in the developing spinal cord. Accordingly, at the electroporation time (stage HH11), the neural tube contains essentially self-expanding progenitors (Le Dréau et al., 2014; Saade et al., 2013). 24 hr later, (stage HH17), the repartition of the modes of division is not the same in dorsal and ventral control conditions. Dorsal neural tube contains mainly self-expanding progenitors (66.3% Sox2⁺Tis21⁻ cells, **Figure 5A,F**)

(Le Dréau et al., 2014), whereas ventral neural tube encloses essentially neurogenic progeny (58% of Sox2⁺Tis21⁺ cells and 12.7% of Sox2⁻Tis21⁺ cells, **Figure 5A,F**) (Saade et al., 2013). Because of this difference, we analyze the effects of CDC25B on the dorsal and ventral neural tube separately. In the dorsal neural tube, CDC25B gain-of-function leads to a reduction in the percentage of Sox2⁺Tis21⁻ progeny (from 66.3 ± 2.6% to 38.6 ± 2.1%) and a concomitant increase in the percentage of Sox2⁺Tis21⁺ progeny (from 25.9 ± 2.1% to 50.1 ± 1.9%). In this tissue, the percentage of Sox2⁻Tis21⁺ progeny progresses only slightly (from 7.8 ± 1.2 to 11.3 ± 1%, **Figure 5F**). This observation indicates that CDC25B gain-of-function in early steps of neurogenesis reduces proliferative Sox2⁺Tis21⁻ progeny and increases Sox2⁺Tis21⁺ neurogenic progeny. In the ventral neural tube, CDC25B gain-of-function induces a massive reduction in Sox2⁺Tis21⁻ progeny (from 29.3 ± 1.3% to 6.9 ± 1%) and leads to an increase in Sox2⁻Tis21⁺ progeny (from 12.7 ± 1.1% to 40.7 ± 2.7%), without significantly modifying the percentage of Sox2⁺Tis21⁺ progeny (from 58 ± 2% to 52.3 ± 2.8%, **Figure 5F**). Thus, CDC25B ectopic expression in a more advanced neural tissue reduces proliferative divisions and increases Sox2⁻Tis21⁺ neurogenic progeny.

Together, these results suggest that CDC25B activity in neural progenitors reduces proliferative divisions and promotes neurogenic divisions, depending on the receiving neural tissue.

Mathematical modelling reveals that cell cycle duration is not instrumental in controlling the mode of division

To test quantitatively data from a dynamical point of view (Míguez, 2015; Saade et al., 2013; Appendix Neurogenic decisions require a cell cycle independent function of the CDC25B phosphatase), we formalized in mathematical terms our current understanding of what happens in this biological system (**Figure 6A**). Despite the fact that a fraction of the Sox2⁺Tis21⁺ cells might correspond to NN rather than PN divisions, in the modeling part below, we assumed that the Sox2/Tis21 reporter expression is indicative of PP, PN and NN as described in (Saade et al., 2013).

We consider a population of progenitors at time t_0 , $P(t_0)$, and we assumed that their different modes of division result in expanding either the pool of progenitors $P(t)$ through proliferative divisions (PP divisions), or the pool of neurons $N(t)$ by neurogenic divisions (PN and NN divisions). Denoting η the rate at which P cells undergo divisions per unit time (which depends only on the cell cycle duration), the growth rates of the two pools only depend on the relative magnitude of each mode of division.

Denoting α_{pp} , α_{pn} and α_{nn} the corresponding proportions of the modes of division (their sum is 1), the growth rates of the two pools (i.e. their time derivatives $\dot{P}(t)$ and $\dot{N}(t)$ for Progenitors and Neurons respectively) can then be directly formalized as:

$$\begin{cases} \dot{P}(t) = -\eta P(t) + 2\alpha_{pp}\eta P(t) + 1\alpha_{pn}\eta P(t) \\ \dot{N}(t) = +2\alpha_{nn}\eta P(t) + 1\alpha_{pn}\eta P(t) \end{cases} \quad (1)$$

In this model, the evolution of the pool of progenitors is governed by α_{pp} and α_{nn} (because α_{pn} does not affect the pool of progenitors, only the pool of neurons). Denoting $\gamma = \alpha_{pp} - \alpha_{nn}$ the difference between the two proportions, we then have $\gamma = 1$ when $\alpha_{pp} = 1$, $\alpha_{nn} = 0$, corresponding to purely self-expanding progenitors and $\gamma = -1$ when $\alpha_{pp} = 0$, $\alpha_{nn} = 1$, corresponding to fully self-consuming progenitors. Hence γ is a good indicator of the balance between proliferation and differentiation of the progenitors (Míguez, 2015). Using γ , the model can be rewritten more simply as:

$$\begin{cases} \dot{P}(t) = \gamma\eta P(t) \\ \dot{N}(t) = (1 - \gamma)\eta P(t) \end{cases}$$

An explicit solution, for $\gamma \neq 0$, is:

$$\begin{cases} P(t) = P(0)e^{\gamma\eta t} \\ N(t) = N(0) + P(0)\frac{1-\gamma}{\gamma}(e^{\eta t} - 1) \end{cases} \quad (3)$$

This equation means that if the quantities of progenitors and neurons are determined at a given time ($P(0)$, $N(0)$), for example at HH17, we can compute the expected number of progenitors and neurons at any time later, for example at HH22, provided that the modes of division and cell cycle

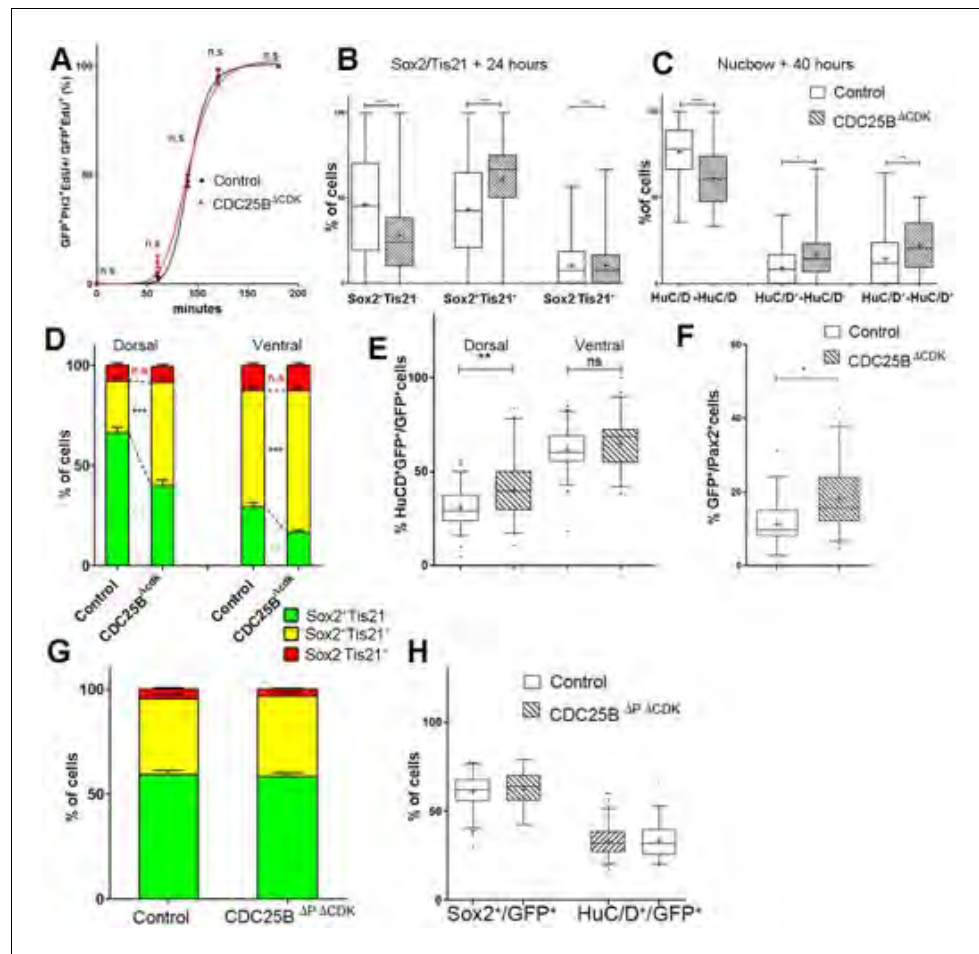


Figure 7. CDC25B gain-of-function promotes neurogenesis independently of CDK interaction. (A) Curves representing the percentage of electroporated GFP⁺EdU⁺PH3⁺ over the total GFP⁺EdU⁺ cells with increasing EdU exposure times: control (black), CDC25B^{ACDK} (red). Note that the curve for the CDC25B^{ACDK} condition is similar to the control, indicating an absence of effect on G2 length. (B) Box plots (5/95 percentile) comparing the percentage of progenitors expressing Sox2::GFP and Tis21::RFP 24 hr after co-electroporation with control or CDC25B^{ACDK} vectors in the entire spinal cord. Data represent the means $\pm$ SEM of 3 different experiments with 6 control and 6 CDC25B^{ACDK} gain-of-function embryos. (C) Box plots (5/95 percentile) comparing the percentage of two cell clones expressing Nucbow and pCX CRE vectors, 40 hr after co-electroporation with control or CDC25B^{ACDK} vectors in the entire spinal cord. Data represent the means $\pm$ SEM of 3 different experiments with 387 clones in 12 control embryos, and 692 clones in 10 CDC25B^{ACDK} gain-of-function embryos. (D) Bar plot representing the percentage of cells expressing Sox2::GFP and Tis21::RFP 24 hr after co-electroporation with control or CDC25B^{ACDK} vectors, in the dorsal or ventral spinal cord. Data represent the means $\pm$ SEM. Data represent three different experiments with a total of 5 dorsal and 10 ventral neural tubes under control conditions, and 4 dorsal and 9 ventral neural tubes in CDC25B^{ACDK} gain-of-function. (E) Box plots (5/95 percentile) comparing the percentage of HuC/D⁺ cells within the electroporated population in control or CDC25B^{ACDK} gain-of-function experiments, in the dorsal or ventral neural tube at HH22. Data represent three different experiments with 13 dorsal and 6 ventral neural tubes in the control and 6 dorsal and 3 ventral neural tubes in the CDC25B^{ACDK} gain-of-function. (F) Box plots (5/95 percentile) comparing the percentage of Pax2⁺ cells in the dorsal neural tube at HH22. Data from three different experiments with 8 control embryos, and 11 CDC25B^{ACDK} gain-of-function embryos. (G) Bar plot representing the percentage of progenitors expressing Sox2::GFP and Tis21::RFP at HH17, 24 hr after electroporation of a control or CDC25B^{APACDK} expressing vector in the dorsal half of the spinal cord. Data from three different experiments with 6 control embryos, and 9 CDC25B^{APACDK} embryos. (H) Box plots (5/95 percentile) comparing the percentage of Sox2⁺ or HuC/D⁺ cells within the electroporated population in the control or CDC25B^{APACDK} gain-of-function experiments, in the dorsal spinal cord at HH17. Data from three

Figure 7 continued on next page

Figure 7 continued

different experiments with 11 control embryos, and 6 CDC25B^{APACDK} embryos. The cross indicates the mean value.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.011>

times can be considered constant over the considered period. Full details of the mathematical work and statistics are given in Appendix 2. We then compare quantitatively the experimental data to the predictions based on our current hypotheses. This comparison is surprisingly auspicious for the control and gain-of-function experiments in the ventral zone (**Figure 6C**, left). In this zone, considering the ratio between the two pools at HH17 (e.g. the measured fractions of neurons), the measured cell cycle duration (12 hr), the set of modes of division measured at HH17, and the hypothesis that those modes of divisions stay unmodified during 24 hr, the model predicts with good accuracy the ratios between the two pools at HH22. In the dorsal zone, the model correctly predicts the control condition, and it confirms the tendency of CDC25B gain-of-function to promote a greater neuron fraction, albeit with some quantitative discrepancy (the model overestimates the fraction of neurons). This suggests that, notwithstanding biological complexity, the general picture of a pool of progenitors among which cells undergo stochastic modes of division, appears relevant.

Our model is built on the assumption that all cells undergo asynchronous mitosis at the same rate, and that the fate of any mitosis is stochastic and probabilistically distributed according to the fraction of dividing cells undergoing PP, PN or NN divisions, namely a common division rate for all progenitors associated with probabilistic fates (Appendix 3). In this picture, the proportion of mode of division controls directly the numbers of progenitors and neurons that are generated. However, the model is compatible with an extreme alternative interpretation, in which the three modes of division correspond to specific division rates associated with deterministic fates (Appendix 3). In this case, each population of progenitors has a specific mean cycling time and the cell cycle time is instrumental to the mode of division. Namely, cycling at rate $\alpha_{pp}\eta$ would result in a PP division, cycling at rate $\alpha_{pn}\eta$ would result in a PN division, and cycling at rate $\alpha_{nn}\eta$ would result in a NN division. Therefore, the numbers and proportions of progenitors/neurons at HH22 would result from the difference between cell cycle times associated with modes of division. We compute these putative cell cycle times based on the data obtained in the three conditions and the two zones (**Table 1**). The wide range of specific cycle times, that is, from 17 to 172.7 hr, is incompatible with data usually recorded (reviewed in **Molina and Pituello, 2017**). This suggests that, in the time window of our analyses, the observed evolution of progenitors and neurons cannot be exhaustively explained by pure differences in cell cycle durations among the three modes of division.

CDC25B promotes neurogenesis independently of CDK interaction

One prediction of our model is that neurogenesis might be affected independently of cell cycle length modification. To test whether the CDC25B-induced G2 phase modification is instrumental in promoting neurogenesis, we use a mutated form of CDC25B that was shown not to affect cell cycle kinetics. The mutation prevents CDC25B-CDK1 interactions without affecting CDC25B phosphatase activity (**Sohn et al., 2004**). Accordingly, expressing this mutated form of the phosphatase called CDC25B^{ACDK}, does not modify G2 phase length in neuroepithelial progenitors (**Figure 7A**, red curve). The effects of CDC25B^{ACDK} on the division mode are then compared in the entire neuroepithelium using the Tis21/Sox2 approach, 24 hr after electroporation, and the Nucbow technique, 40 hr after electroporation.

In the Tis21/Sox2 strategy, CDC25B^{ACDK} decreases Sox2⁺Tis21⁻ progeny (from 46.1 ± 2.1% to 28 ± 1.6%) and increases Sox2⁺Tis21⁺ progeny (from 43.4 ± 1.9% to 61.2 ± 1.5%). The percentage of Sox2⁻Tis21⁺ progeny is not modified in that experimental context (from 10.5 ± 0.8% to 10.8 ± 0.8%, **Figure 7B**). These data show that CDC25B^{ACDK} gain of function reduces proliferative divisions from 46.1 ± 2.1% to 28 ± 1.6% and increases neurogenic divisions from 53.8 ± 2.1% to 72 ± 1.6% (P-value < 0.0001). Analyses using the Nucbow strategy, show a decrease in HuC/D⁻-HuC/D⁻ cells (from 76.5 ± 2.6% to 61 ± 2.4%), an increase in HuC/D⁻-HuC/D⁺ cells (from 9.4 ± 1.5% to 17.1 ± 2.5%) and in HuC/D⁺-HuC/D⁺ cells (from 14.1 ± 2.3% to 21.9 ± 2.1%, **Figure 7C**) following CDC25B^{ACDK} expression. Therefore, CDC25B^{ACDK} gain of function reduces proliferative divisions

Table 1. Putative time it would take to achieve the three kinds of division under a model which assumes that only cycle time determines the fate output.

Full consequences derived from this assumption are given in Appendix 3. Basically, such an assumption implies that cycling rates associated with each mode of division are proportional to the observed fraction of that mode. If we observe, for instance, 60% PP-divisions and 10% NN-divisions (like it is in the Control dorsal), then a NN-division should take six times as long as a PP-division. If we exclude such a possibility, then fate distribution cannot be exclusively determined by differences in fate-based cycle times. It does not exclude that a given kind of fate (e.g. proliferative divisions PP) could require a longer time to be achieved than others; it excludes that such differences would suffice per se to explain the differences between the fractions of fates.

Zone and condition	T_{pp} (hours)	T_{pn} (hours)	T_{nn} (hours)	T_c (hours)
Control dorsal neural tube	18.1	46.3	154.1	12.0
CDC25B dorsal neural tube	31.1	23.9	106.0	12.0
CDC25B ^{ACDK} dorsal neural tube	29.8	23.5	150.0	12.1
Control ventral neural tube	41.0	20.7	94.5	12.0
CDC25B ventral neural tube	172.7	22.9	29.5	12.0
CDC25B ^{ACDK} ventral neural tube	72.2	17.0	94.7	12.0

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.012>

from $76.5 \pm 2.6\%$ to $61 \pm 2.4\%$ and increases neurogenic divisions from $23.8 \pm 2.5\%$ to $39 \pm 2.4\%$ (P value < 0,001). CDC25B^{ACDK} gain-of-function results in an equivalent reduction of 15.8 and 18.1 percentage-point for proliferative and a corollary increase in neurogenic divisions in the Nucbow and Sox2/Tis21 strategies respectively (**Figure 7B,C**).

Together these data show that a mutated form of CDC25B unable to interact with CDKs, still promotes neurogenic divisions.

We then analyze the effects of CDC25B^{ACDK} on the dorsal and ventral progenitors 24 hr after electroporation. CDC25B^{ACDK} gain-of-function in the dorsal neural tube, reduces Sox2⁺ Tis21⁻ progeny (from $66.3 \pm 2.7\%$ to $40.2 \pm 2.5\%$), increases Sox2⁺Tis21⁺ progeny (from $25.9 \pm 2.1\%$ to $51.1 \pm 2.2\%$), and has no effect in Sox2⁻Tis21⁺ progeny (from $7.8 \pm 1.2\%$ to $8.0 \pm 1.1\%$, **Figure 7D**). In this context, the fraction of HuC/D⁺ neurons generated 40 hr following CDC25B^{ACDK} expression increases from $30.7 \pm 1.3\%$ to $40.4 \pm 2.5\%$. (**Figure 7E**). Similarly, the percentage of Pax2⁺ neurons is increased from $11.3 \pm 1\%$ to $18.3 \pm 1.3\%$ (**Figure 7F**). In the ventral neural tube, CDC25B^{ACDK} overexpression leads to a reduction in Sox2⁺Tis21⁻ progeny ($29.3 \pm 2.1\%$ vs $16.6 \pm 1.2\%$), an increase in Sox2⁺Tis21⁺ progeny ($58 \pm 2\%$ vs $70.7 \pm 1.4\%$) and no effect on Sox2⁻Tis21⁺ progeny ($12.7 \pm 1.1\%$ vs $12.7 \pm 1.1\%$, **Figure 7D**). In the ventral neural tube, CDC25B^{ACDK} induces a slight but non-significant increase in HuC/D expression (**Figure 7E**). We examined our mathematical model to determine whether this slight increase in neuron production is coherent with the fact that the mutated form does not promote Sox2⁻Tis21⁺ progeny, and the number of neurons predicted is in agreement with the experimental data (**Figure 6C**).

To determine whether CDC25B^{ACDK} function on neurogenic divisions and neuronal differentiation requires phosphatase activity, we use a form of the protein containing an additional point mutation inactivating the catalytic domain (CDC25B^{AP ACDK}). This construct does not affect the mode of division at 24 hr (**Figure 7G**). 48 hr post electroporation this mutated form does not modify NeuroD reporter expression (**Figure 2—figure supplement 2**), the percentage of HuC/D⁺ neurons or the percentage of Sox2⁺ progenitor's populations (**Figure 7H**), indicating that the phosphatase activity is required for the neurogenic function of CDC25B.

Altogether, these results show that CDC25B^{ACDK} stimulates neurogenic divisions and neuronal differentiation without affecting the duration of the G2 phase. This opens the possibility that the phosphatase possesses a function in addition to its canonical role in cell cycle regulation.

CDC25B promotes fast nuclei apical departure in early G1 independently of CDK interaction

To go further in our understanding of this cell cycle independent role of CDC25B, we set up a high resolution time-lapse imaging technique that allows real-time tracking of the behaviour of single neural progenitor nuclei during G2/M/G1 phases. To perform live imaging, E2 embryo neural tubes are electroporated with a GFP-tagged version of PCNA (Leonhardt et al., 2000), then slice cultures of neural tube explants are performed 6 hr after electroporation and analyzed in live experiments starting 12 hr later. Using this approach, nuclear movements are tracked in time and space during G2, M and G1 phase (Figure 8). As previously described (Spear and Erickson, 2012), we observe that mitosis initiates away from the apical side and gets completed against the lumen (Figure 8A–B). Interestingly, nuclei in G1 display two types of behaviours: either a newly formed nucleus remains close to the lumen (Ap) or it rapidly migrates away from the apical side towards the basal side (Bs), giving rise to three mitotic patterns Ap/Ap, Ap/Bs, Bs/Bs (Figure 8A–C and Video 1, Video 2, Video 3). Based on the position of the nuclei 20 min after mitosis (Bs being defined as more than 10 μm away from the apical side at that time), the occurrences of their behaviour were quantified in control and gain-of-function conditions (Figure 8D). Under control conditions, Ap represents $50.6 \pm 6.9\%$ of the post mitotic behavior, and Bs $49.4 \pm 6.9\%$. CDC25B and CDC25B^{ACDK} gain-of-function decrease Ap (to $24.1 \pm 5.3\%$ and $30.9 \pm 4.5\%$, respectively) and increase Bs (to $75.8 \pm 5.3\%$ and $69.1 \pm 4.5\%$, respectively).

It is possible that the Bs migratory behavior precedes the apical process withdrawal associated with the onset of neuronal differentiation (Das and Storey, 2014; Tozer et al., 2017). We took advantage of our time-lapse set up to identify cells re-entering S phase, by the appearance of a dot-like staining within the nuclei corresponding to the recruitment of PCNA into the DNA replication foci (Figure 8—figure supplement 1, Leonhardt et al., 2000). For all the nuclei whose cell cycle status was identified (Table 2), we quantify 9/16, 32/37 and 40/40 Bs nuclei re-entering S phase in Control, CDC25B and CDC25B^{ACDK} gain-of-function, respectively. A majority of Ap nuclei also re-enter S phase in control (30/36), CDC25B (15/21) and CDC25B^{ACDK} (16/20) gain-of-function experiments (Table 2). Thus, a majority of Bs and Ap nuclei re-enter S phase in gain-of-function experiments suggesting that the change in migratory behavior is not the consequence of a neurogenic division and of neuronal commitment, but either is upstream or is independent of it.

To analyze more profoundly how CDC25B activity affects nuclei migration in G1, we determined the nuclei motion using a statistical measure of the average distance a nucleus travels over time: the mean squared displacement, MSD (Norden et al., 2009). We calculated MSD profiles for the Ap and Bs nuclei under control, CDC25B and CDC25B^{ACDK} gain-of-function conditions (Figure 8E). In both cases, the profile clearly exhibits 2 types of motion: Ap nuclei displaying slow motion (diffusion) and Bs nuclei exhibiting directed movements (advection). In addition, we determined the average speed of the nuclei over the first 20 min after mitosis (Figure 8F). We observed speeds of $0.26 \pm 0.03 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 16$), $0.27 \pm 0.03 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 17$) and $0.27 \pm 0.04 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 11$) for the Ap nuclei and $1.10 \pm 0.17 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 14$), $0.98 \pm 0.1 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 25$) of and $0.80 \pm 0.1 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 19$) for Bs nuclei in control, CDC25B and CDC25B^{ACDK}, respectively.

Together these data suggest that the non-cell cycle dependent activity of CDC25B does not modify much the departure speed of the nuclei, but rather controls the switch from slow to fast nuclei departures from the apical surface.

Altogether, these results show that in the neuroepithelium, the CDC25B phosphatase affects early G1 nuclear behavior, and also is necessary and sufficient to promote neurogenic divisions and neurogenesis. Importantly, CDC25B^{ACDK} without affecting the duration of the G2 phase, still affects early G1 nuclear behavior and stimulates neurogenic divisions and neuronal differentiation. Our results open then the possibility that the phosphatase possesses cell cycle independent and neurogenic functions.

Discussion

An important issue in the field of neurogenesis concerns the implication of cell cycle function during neuron production (Agius et al., 2015). Here, we confirm in mammals our previous observations in birds, that the G2/M cell cycle regulator CDC25B phosphatase is required to finely tune neuronal

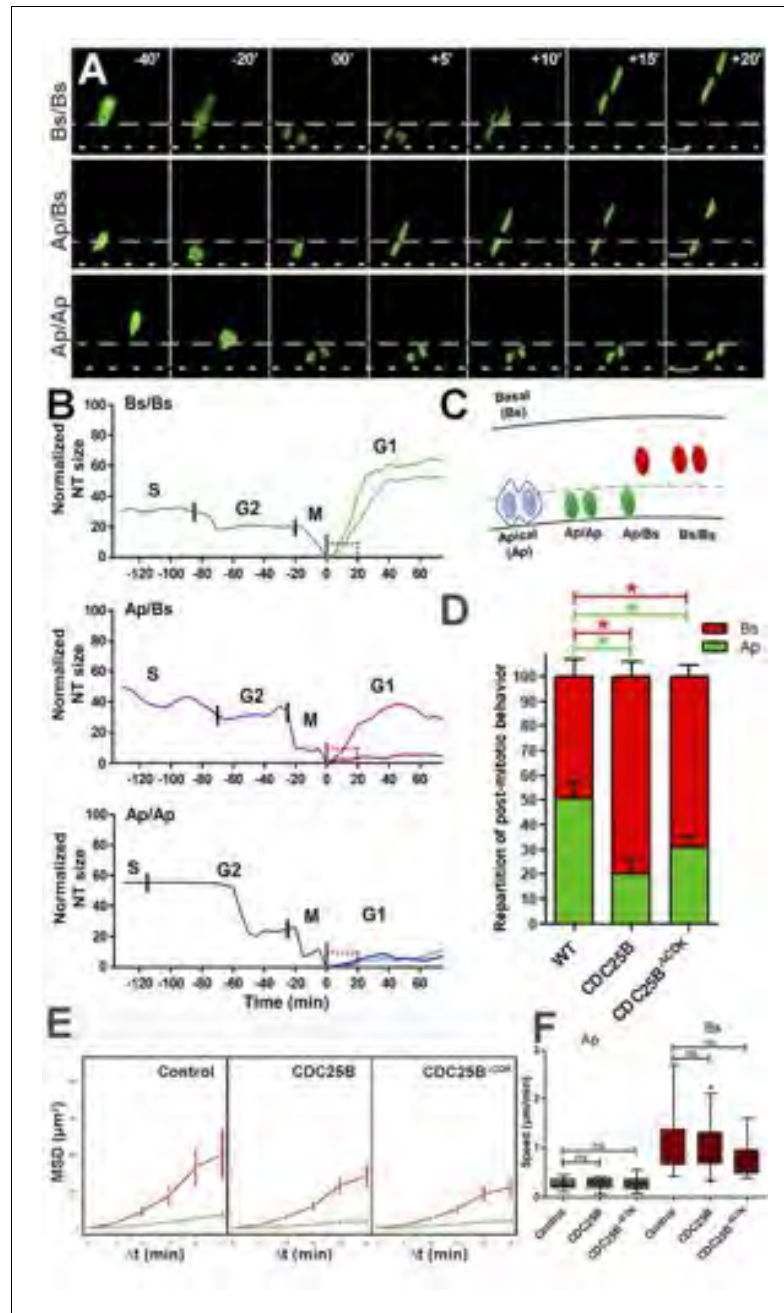


Figure 8. CDC25B affects G1 nuclei movement independently of CDK interaction. (A) Time-lapse series of the different daughter cell nuclear behaviors. Yellow dashed lines indicate the lumen; grey dashed lines represent 10% of the apico-basal length. Scale bars: 10 μm . (B) Quantitative tracking of nuclear movement in embryonic chicken neural tube. Daughter cell nuclei can display three different behaviors after cytokinesis: both nuclei migrate immediately after mitosis (Bs/Bs) (upper panel); one of the nuclei remains at the apical side and the sister nucleus migrates to the basal side (Ap/Bs) (middle panel) or both nuclei remain at the apical side for at least 20 min before starting basal migration (Ap/Ap) (lower panel). Nuclei were labelled by NLS-EGFP-L2-PCNA (Leonhardt et al., 2000) that allows the distinction between G2/M/G1 phases, and their movements were tracked by time-lapse microscopy and Imaris software. The end of mitosis (cytokinesis) showed the most apical localization and was defined as zero. Cell cycle phases (S, G2, M, G1) are indicated above the tracks. (C) Scheme representing nuclear behavior during G1. (D) Quantification of the repartition of post mitotic behavior, that is, Ap or Bs positioning after mitosis in WT, CDC25B and CDC25B^{ACDK} gain-of-function. 156, 174 and 212 cells in 16, 9 and 20 explants of 10, 5 and 8 experiments in WT, CDC25B and CDC25B^{ACDK} gain-of-function, respectively. (E) Mean squared displacement (MSD) over time for Control, CDC25B and CDC25B^{ACDK} genotypes. (F) Speed of nuclei movement for Control, CDC25B and CDC25B^{ACDK} genotypes. Figure 8 continued on next page

Figure 8 continued

displacement (MSD) profile (error bars show 95% confidence interval) of Ap nuclei (green line) and Bs nuclei (red line) in the control, CDC25B and CDC25B^{ACDK} gain-of-function. Under all conditions, Ap nuclei display slow motion (linear trend), while Bs nuclei display a persistent apico-basal motion (parabolic trend). (F) Box plots (5/95 percentile) comparing the mean speed over the first 20 min post mitosis of Ap and Bs nuclei. Number of nuclei tracked are 16, 17, and 11 Ap nuclei, and 14, 25, and 19 Bs nuclei, in control and CDC25B and CDC25B^{ACDK} gain-of-function, respectively for E and F.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.013>

The following figure supplement is available for figure 8:

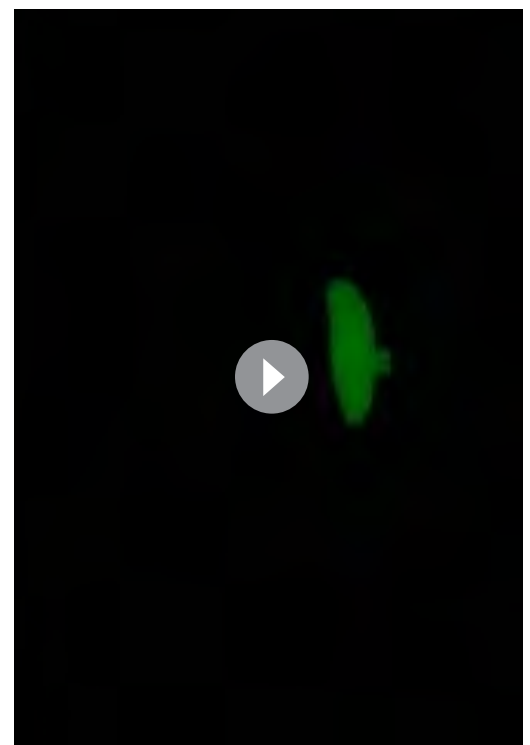
Figure supplement 1. Time-lapse series of neural progenitor cell electroporated with GFP-PCNA.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.014>

production in the neural tube. Gain-of-function experiments performed in the chick neural tube reveal that CDC25B activity is sufficient to modify the mode of division of neural progenitors and to promote neuronal differentiation concomitantly with a shortening of the G2 phase length. We demonstrate that CDC25B expression in neural progenitors induces a shift from proliferative to neurogenic divisions and promotes neuronal differentiation independently of any CDK interaction, indicating that it involves a new substrate of the phosphatase (**Figure 9**). Finally, analyses in real time of INM reveal that wild type CDC25B and mutated CDC25B^{ACDK} proteins increase the number of nuclei performing fast basalward movement in early G1, giving us a track to follow in order to elucidate the non-cell cycle function of CDC25B.

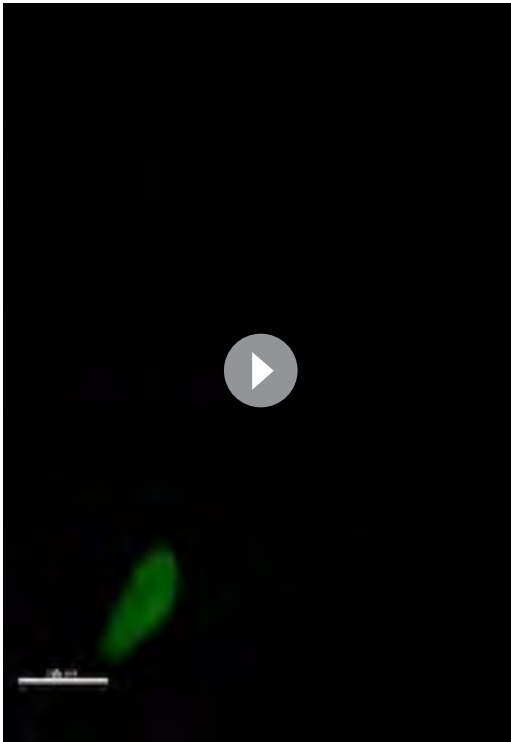
CDC25B is required for efficient neuron production in vertebrates

In mammals three CDC25s (A, B, C) have been characterized, whereas only two CDC25s (A and B) have been found in chicken (**Agius et al., 2015**). In mouse, *Cdc25a* loss-of-function is embryonic lethal, whereas loss-of-function of *Cdc25b* or *Cdc25c* or both has no apparent phenotype except female sterility (**Boutros et al., 2007**). Crossing our floxed mice to ubiquitous Cre:PGK-Cre^{fl} (**Lallemand et al., 1998**) also results in female sterility (data not shown). *Cdc25a* has been described as playing a major role in the G1-S transition and is capable of compensating the loss-of-function of the other *Cdc25* members. In the mouse embryonic neural tube, both *Cdc25a* and *Cdc25c* display a broad expression pattern, while *Cdc25b* is mainly expressed in domains where neurogenesis occurs (**Agius et al., 2015** and **Figure 1**). The conditional loss-of-function in the mouse CNS, shows for the first time that *Cdc25b* is involved simultaneously in the control of G2 phase length and spinal neurogenesis. In the mouse, at least part of the reduction in the number of neurons is probably due to the slight reduction in progenitor population. This observation substantiates our data showing that CDC25B downregulation, performed using RNAi in chicken embryo, induces a reduction in neurogenesis (**Peco et al., 2012**). Two other studies link CDC25B and neurogenesis. First in *Xenopus*, *FoxM1* and CDC25B loss-of-function has been shown to reduce expression of

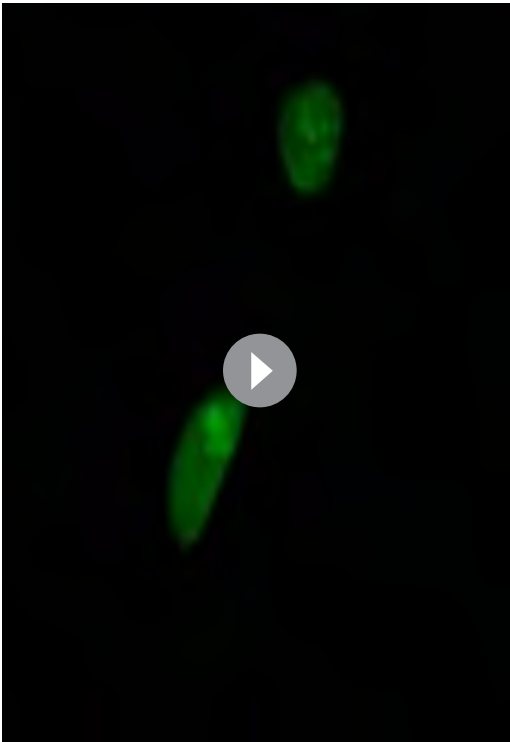


Video 1. Time-lapse imaging of neural tube daughter nuclei performing apical movements (Ap/Ap). Mother and daughter cells expressing GFP-PCNA can be followed over time and interkinetic nuclear movement of cells is observed. Images were taken every 5 min at 63X magnification and are played at 12 frames per second (fps).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.015>



Video 2. Time-lapse imaging of neural tube daughter nuclei performing apical and basal movements (Ap/Bs). Mother and daughter cells expressing GFP-PCNA can be followed over time and interkinetic nuclear movement of cells is observed. Images were taken every 5 min at 63X magnification and are played at 12 fps.
DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.016>



Video 3. Time-lapse imaging of neural tube daughter nuclei performing basal movements (Bs/Bs). Mother and daughter cells expressing GFP-PCNA can be followed over time and interkinetic nuclear movement of cells is observed. Images were taken every 5 min at 63X magnification and are played at 12 fps.
DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.017>

Table 2. Distribution of post-mitotic Basal and Apical nuclei performing a new cell division (S-phase) or remaining in G1-phase (Long G1).
n: number of cells counted. S-Phase: cell that re-enters S phase during the time lapse. Long G1: cell that performs a G1 longer than 10 h hours and that does not re-enter S phase during the time lapse. ND: not determined because the time lapse conditions did not allow to follow the cell long enough.

	S-phase		Long G1		ND		Total
	n	%	n	%	n	%	n
Basal							
WT	9	11.8	7	9.2	60	79.0	76
CDC25B	32	25.6	5	4.0	88	70.4	125
CDC25B ^{ACDK}	40	27.2	0	0.0	107	72.8	147
Apical							
WT	30	37.5	6	7.5	44	55.0	80
CDC25B	15	30.6	6	12.3	28	57.1	49
CDC25B ^{ACDK}	16	24.6	4	6.2	45	69.2	65

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.018>

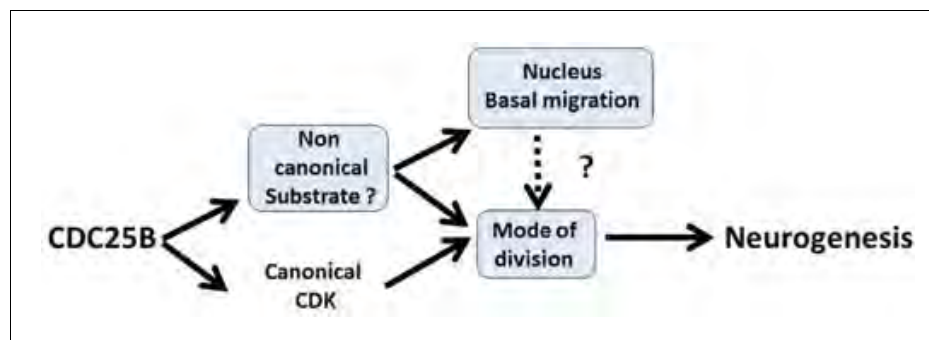


Figure 9. Schematic of CDC25B modes of action. CDC25B activity on an unknown substrate changes G1 nucleus basalward movement during Interkinetic Nuclear Migration (INM), and also acts on the mode of division leading to increased neurogenesis. It remains to be determined whether a link exists between these two activities. In addition to this new pathway, the data obtained in mice and using the Tis21/Sox2 assay suggest that the activity of CDC25B on CDK might account for part of its activity on the mode of division and neurogenesis.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.019>

neuronal differentiation markers, but not early neuroectoderm markers (Ueno et al., 2008). In this context, epistatic analysis shows that *FoxM1* loss-of-function can be rescued by *CDC25B* gain-of-function (Ueno et al., 2008). Second, *MCPH1* knock out mice display a microcephalic phenotype due to an alteration of the Chk1-Cdc25-Cdk1 pathway. Indeed, *MCPH1* mutants display a decreased level of the inhibitory Chk1 kinase localized to centrosomes, leading to increased *Cdc25b* and *Cdk1* activities. A premature activation of *Cdk1* leads to an asynchrony between mitotic entry and centrosome cycle. This disturbs mitotic spindle alignment, promoting oblique orientation and precocious neurogenic asymmetric divisions (Gruber et al., 2011). Moreover, the reduced neurogenic production in the *MCPH1* loss-of-function can be restored by a concomitant *Cdc25B* loss-of-function, demonstrating the phosphatase's pivotal role in the neurogenic phenotype. Altogether, these observations indicate that *Cdc25b* activity is broadly used during nervous system development among vertebrate species.

CDC25B promotes neurogenic divisions independently of CDK interaction

CDC25B downregulation reduces the transition from proliferative to neurogenic divisions. To be able to clarify the role of CDC25B on both types of division, we use the cell cycle cis-regulatory element combined with the rapid degradation of CDC25B at the end of M phase, to reproduce the endogenous cyclic expression of the phosphatase (Körner et al., 2001). Using Sox2/Tis21 biomarkers and Nucbow clonal analyses, we observe differences in the repartition of the mode of division, probably due to intrinsic methodological differences. This discrepancy may be linked to the differences in the method used: one possibility being that one analysis is performed at 24 hr after electroporation, while the other is performed 40 hr after. Nevertheless, CDC25B gain-of-function reduces proliferative and promotes neurogenic divisions independently of the method used. Gain-of-function of the CDC25B mutated form inactive during the cell cycle, also diminishes proliferative divisions. Using the Sox2/Tis21 biomarkers, we observe different results depending on the population of progenitors targeted.

In the dorsal neural tube, CDC25B gain-of-function increases Sox2⁺Tis21⁺ compared to control conditions. In the ventral neural tube, gain-of-function leads to an increase in Sox2⁺Tis21⁺, the percentage of Sox2⁺Tis21⁺ progeny being unchanged. We propose that ectopic expression of the phosphatase can be interpreted in different ways depending on the context: CDC25B would have the capacity to convert Sox2⁺Tis21[−] into Sox2⁺Tis21⁺ in a young tissue, while in an older tissue CDC25B could convert Sox2⁺Tis21[−] into either Sox2⁺Tis21⁺ or Sox2[−]Tis21⁺. With respect to what occurs in an older tissue, either the phosphatase converts Sox2⁺Tis21[−] into Sox2⁺Tis21⁺ or Sox2[−]Tis21⁺, or the phosphatase initially promotes Sox2⁺Tis21[−] into Sox2⁺Tis21⁺ and

subsequently, using the principle of communicating vessels in an older tissue, promotes Sox2⁺Tis21⁺ into Sox2⁻Tis21⁺ progeny.

We speculate that CDC25B acts as a maturing factor in the progression from stem pool to differentiated neurons, and we suggest that this element of the cell cycle machinery has been coopted to regulate independently cell cycle progression and neurogenesis.

Mathematical modelling of the neuronal fraction in the dorsal neural tube

The model predicts the ratio of neuron at 48 hr after electroporation, given the ratio at 24 hr and the distributions among the modes of division and the mean cycle length. As a minimal model with no free parameters, its predictions are still quite well consistent with data in the ventral neural tube for the three conditions. In the dorsal neural tube, while its prediction is also well consistent with data for control condition, it predicts however larger fractions of neurons than those experimentally observed in CDC25B and CDC25B^{ΔCDK} gain-of-functions (**Figure 6C**), pointing to a missing hypothesis to explain this discrepancy.

We submit several hypotheses. First of all, at HH11, endogenous CDC25B is expressed in the ventral neural tube but not in the dorsal neural tube. This means that electroporation causes a true gain-of-function in the dorsal domain, while in the ventral domain it makes only a dosage modification of a component already present. Then, CDC25B regulation is complex, and an active degradation mechanism in the dorsal neural tube could attenuate the gain-of-function. Another possibility is that electroporated gain-of-function, which is also cell cycle dependent, could be less efficient with time and thereby lead to fewer neurons than expected. Alternatively, the signaling pathway downstream of CDC25B could be expressed differently in the ventral and dorsal neural tubes, and this could limit the gain-of-function effect in the dorsal neural tube. All things considered, we regard the discrepancy between our predictions and our data as a challenging milestone that deserves further investigation. We could have formalized an 'ad hoc' model for each hypothesis mentioned above in order to fit the observed fractions of neurons, yet this would have amounted to add free parameters, and free parameters can always be adjusted at will. We prefer to stress that the standard model for these dynamics still requires identifying further elements in order to reconcile the predictions with the data of this study.

CDC25B promotes basalward nuclear movement independently of CDK interaction

Here we show for the first time in the spinal cord that nuclei basalward movements occurring in early G1 display two types of motion: slow or fast departure from the apical surface. During mammalian corticogenesis, two not mutually exclusive mechanisms were described for the basal migration of G1 nuclei. It was proposed to be a passive event, depending on a crowding effect due to the apically G2 phase nuclei migration (*Kosodo et al., 2011*). Other studies proposed that the actomyosin system (*Schenk et al., 2009*) or plus-end-directed kinesin/microtubule driven movement (*Tsai et al., 2010*) are involved in carrying nuclei from apical to basal side. In the spinal cord, we show that CDC25B and CDC25B^{ΔCDK} control the choice between slow or rapid apical departure and promotes the latter. This establishes a new link between a core cell cycle regulator and INM. Similarly a relationship has been described between CDK1 and the minus-end-directed motor dynein in G2 apical movement (*Baffet et al., 2016a2016; Hu et al., 2013*). CDK1 phosphorylates the nucleoporin RanBP2, promoting nuclear envelop dynein recruitment.

We observed that the two types of motion in early G1 occur in proliferating progenitors, suggesting that they are either upstream or independent of neurogenesis. A great deal of evidence shows that nuclear movement alterations correlate with neurogenesis modifications, due to alterations in the duration and level of exposure of nuclei to proliferative or differentiation signaling. In zebrafish retina, when the motor protein Dynactin-1 is disrupted, nuclei migrate more rapidly and further into the basal side and more slowly to the apical side. In this context, since Notch signaling is activated on the apical side, mutant progenitors are less exposed to Notch and exit the cell cycle prematurely (*Del Bene et al., 2008*). In the developing rat brain, INM is driven basally by the microtubule motor protein KIF1A, and downregulating KIF1A results in the maintenance of nuclei on the apical side and a severe reduction in neurogenic divisions (*Carabalona et al., 2016*). Radial glial progenitors

nevertheless display normal cell cycle progression, indicating that the two events can be uncoupled. The authors propose that this change in nuclear movement increases exposure of neural progenitors to proliferative signals at the apical side, or alternatively keeps the cells further away from differentiating signals. Accordingly, the rapid basal movement induced by CDC25B in the neural tube would reduce exposure of the nucleus to proliferative signals, or expose them to differentiating signals. Interestingly, mouse CDC25A, B and C triple KO (TKO) exhibits epithelial cells in the small intestine blocked in G1 or G2, accompanied by enhanced Wnt signalling activity (Lee et al., 2009).

A follow-up to this work could be identifying the CDK independent players downstream of CDC25B. Other CDC25B substrates have been characterised, such as steroid receptors (Ma et al., 2001), and the peri-centriolar material component Kizuna (Thomas et al., 2014). A recent analysis using microarrayed Tyr(P) peptides representing confirmed and theoretical phosphorylation motifs from the cellular proteome, identifies more than 130 potential CDC25B substrates (Zhao et al., 2015). These substrates are implicated in microtubule dynamics, signalling pathways like Delta/Notch or Wnt, transcription, epigenetic modifications, mitotic spindle or proteasome activity (Zhao et al., 2015), and several of them could play a role in INM or cell fate choice (Akhtar et al., 2009; Aubert et al., 2002; Das and Storey, 2012; Götz and Huttner, 2005; Hämmerle and Tejedor, 2007; Jiang and Hsieh, 2014; Kimura et al., 2014; Li et al., 2012; MuhChyi et al., 2013; Olivera-Martinez et al., 2014; Sato et al., 2004; Schwartz and Pirrotta, 2007; Vilas-Boas et al., 2011). Further work will be necessary to dissect the molecular pathway linking CDC25B with INM and to determine whether this link is causal in neurogenesis. In conclusion, we propose that our data illustrate that cell cycle core regulators might have been coopted to elicit additional functions in parallel to cell cycle control. We show that a positive cell cycle regulator, CDC25B, unexpectedly reduces proliferative divisions and promotes differentiation. Cell cycle regulators are routinely described as deregulated in cancers and are associated with increased proliferation. Understanding their function outside the cell cycle is therefore crucial to characterising their molecular and cellular mechanisms of action and to foresee novel therapeutic strategies.

Materials and methods

Embryos

Fertile chicken eggs at 38°C in a humidified incubator yielded appropriately staged embryos (Hamburger and Hamilton, 1992). Animal related procedures were performed according to EC guidelines (86/609/CEE), French Decree no. 97/748 and CNRS recommendations.

Generating a *Cdc25b* floxed allele and a *Cdc25b* nesKO littermates

Experiments were performed in accordance with European Community guidelines regarding care and use of animals, agreement from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche number: C3155511, reference 01024.01, and CNRS recommendations. To disrupt *Cdc25b* function, we generated a modified allele of *Cdc25b* (Mouse Clinical Institute, IGBMC, Illkirch). Using Homologous recombination in embryonic cells (ES), we inserted two LoxP sites, flanking exon 4 to exon 7 of the *Cdc25b* gene (referred to as Floxed allele). Upon Cre-mediated excision, exons 4 to 7 are deleted and following intron splicing, a premature stop codon is generated, leading to a truncated protein of 134 aa. The activity of this remaining peptide has been tested in a cellular model and has no activity (not shown). The mouse strain used is C57BL6/JRj. We first generated a mutant mouse line (*Cdc25b*^{-/-}) by crossing *Cdc25b* floxed mice with PGK-Cre mice, resulting in an ubiquitous and permanent deletion of *Cdc25b*. In order to delete *Cdc25b* activity specifically at the onset of neurogenesis, we crossed *Cdc25b*^{fl/+} mice with transgenic mice expressing the Cre recombinase under the control of the rat *Nestin* (Nes) promoter and enhancer (Tronche et al., 1999). The effect of expressing Cre recombinase on proliferation and neurogenesis was evaluated by comparing *Cdc25b*^{fl/+} and *NestinCre;Cdc25b*^{fl/+} littermates. As there were no phenotypic differences between these embryos for any of the parameters that we measured (not shown), they were both included with the *Cdc25b*^{fl/-} littermates in the control group.

Statistical analysis of the mouse neural phenotype

For each experiment, at least three independent litters and three different slides per embryo were analyzed. To compare the number of neurons between control and conditional mutant embryos, we used a statistical model called the 'mixed effect model'. This model contains both the fixed effect, that is, the genotype of the embryo (control or conditional mutant) and random effects, that is, the variability induced by the age of the litter and by the embryo nested in the litter. Random effects were excluded using the R software and the package 'nlme', and we applied the following formula:

```
library(nlme)
result.lme <- lme(Neuronnumber ~ Genotype,
                  random = ~1|Litter/Embryo, data = data, method = "REML")
```

To test the effect of the genotype on the number of neuron, we next performed an ANOVA test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

DNA constructs and in ovo electroporation

In ovo electroporation experiments were performed using 1.5- to 2-day-old chickens as described previously (Peco et al., 2012). Loss of function was performed as described in (Peco et al., 2012). Gain-of-function experiments were performed using a vector expressing the various human CDC25 isoforms (hCDC25B3, hCDC25B3^{ΔCDK}, hCDC25B3^{ΔP ΔCDK}) under the control of a cis regulatory element of the mouse Cdc25B called pccRE. A control vector was generated with the βGal gene downstream of the pccRE. All gain-of-function experiments were performed at 1.5 μg/μl. For the Brainbow experiments, we used a pCX-Cre gift of X. Morin (Morin et al., 2007), at 0.5 ng/μl; Nucbow a gift of J. Livet (Loulrier et al., 2014) at 0.5 μg/μl. The Sox2p-GFP, Tis21p-RFP, and NeuroD-luciferase constructs were obtained from E. Marti and used at 1 μg/μl, 0.5 μg/μl and 1 μg/μl, respectively. pNLS EGFP-L2-PCNA was received from M.C. Cardoso (Leonhardt et al., 2000) and used at 0.5 μg/μl.

In situ hybridization and immunohistochemistry on mouse and chick embryos

Mouse embryos were dissected in cold PBS and fixed in 4% paraformaldehyde overnight at 4°C. Then they were embedded in 5% low-melting agarose before sectioning on a Leica vibratome, in 50 μm thick transversal sections. In situ hybridization was performed as published (Lacomme et al., 2012). Riboprobes to detect *mCDC25B* transcripts were synthesized from linearized plasmid containing the full *CDC25B* cDNA. Riboprobe sequence: ACTCCTGTCGAAAGGGCTTCTGAAGAAGATGACGGATTGTGGACATCCTGGAGAGTGATTTAAAGGATGACGAGAAGGTCCCCGCGGGCA TGGAGAACCTCATTAGTGCCCCACTGGTCAAAAAGCTGGATAAGGAAGAGGAACAGGATCTCA TCATGTTTCAGCAAGTGCCAGAGGCTCTCCGCTCCCCATCCATGCCATGCAGTGTGA TCCGACCCATCCTCAAGAGGCTAGAGCGGCCCCAGGACCGGGATGTGCCTGTCCAGAG- CAAGCGCAGGAAAAGTGTGACACCCCTGGAAGAGCAGCAGCTTGAAGAACCTAAGGCCCGTG TCTTCGCTCAAAGTCGCTGTGTCATGAGATTGAGAACATCCTGGATAGTGACCACCGTGGAC TGATCGGAGATTACTTAAGGCCTTCCTCCTGCAGACCGTGGATGGCAAACACCAAGACCTTAAG TACATCTCACCAGAACTATGGTGGCCCTGTAAACAGGCAAGTTCAGCAACATCGTGGAGAAA TTTGTCTATTGTGGACTGCAGATACCCCTATGAGTATGAAGGCGGGCATATCAAGAATGCTG TGAACCTGCCCCCTGGAACGGGATGCTGAGACCTTTCT. Immunohistochemistry was performed as described in (Lobjois et al., 2004). The antibodies used were the anti-Pax2 (Covance), guinea pig anti-Tlx3 (gift from C. Birchmeier, Müller et al. (2005), anti-Pax7 (Hybridoma Bank), and anti-Sox2 (Millipore). For chick embryos, proteins or transcripts were detected on 40 μm vibratome sections, as previously described (Peco et al., 2012). The antibodies used were: anti-HuC/D (Molecular Probes), anti-Sox2 (Chemicon), anti-PH3 (Upstate Biotechnology), anti-BrdU (mouse monoclonal, G3G4), anti-BrdU (rat anti-BrdU, AbD Serotec), anti-active caspase 3 (BD Biosciences), and anti-GFP (Invitrogen).

Cell proliferation and survival analyses

Cell proliferation was evaluated by incorporation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (Click-iT EdU Alexa Fluor 647 Imaging Kit, Invitrogen). 10 μ l of 250 μ M EdU solution were injected into chicken embryos harvested 30 min later, fixed for one hour and processed for vibratome sectioning. EdU immunodetection was performed according to manufacturer's instructions. Mitotic cells were detected using anti-PH3. G2-phase length was determined using the percentage of labeled mitoses (PLM) paradigm (Quastler and Sherman, 1959). EdU incorporation was performed as described above, except that a similar dose of EdU was added every 2 hr, and embryos were harvested from 30 to 180 min later. Embryos were fixed and labeled for both EdU and PH3. We then quantified the percentage of PH3 and EdU co-labeled nuclei with increasing times of exposure to EdU. The progression of this percentage is proportional to G2-phase duration. Cell death was analyzed by immunofluorescence, using the anti-active Caspase three monoclonal antibody (BD Biosciences).

EdU incorporation in mice

For EdU staining experiments in mouse, 100 μ l of 1 mg/ml EdU were injected intraperitoneally into pregnant mice. Litters were harvested 1, 2 or 3 hr following injection.

Imaging and data analysis

Slices (40 μ m) were analyzed using a SP5 Leica confocal microscope as described previously (Peco et al., 2012). Experiments were performed in triplicate. For each embryo, confocal analyses were performed on at least three slices. Confocal images were acquired throughout the slices at 3 μ m z intervals.

Tis21::RFP/Sox2::GFP Quantification

For each experimental slice, Z sections were acquired every 3 μ m, and blind cell quantifications were performed on one out of every three Z sections to avoid counting the same cell twice. For each slice, the percentage of cells is determined using the sum of counted Z sections. For each experimental condition, the number of embryos analyzed and of cells counted is indicated in the Figure legend.

In Vivo luciferase reporter assay

Embryos were electroporated with the DNAs indicated together with a NeuroDp-Luciferase reporter (Saade et al., 2013) and a renilla-construct (Promega) for normalization. GFP-positive neural tubes were dissected out at 48 hr after electroporation and homogenized in passive lysis buffer. Firefly- and renilla-luciferase activities were measured by the Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega), and the data are represented as the mean $\pm$ sem from at least 14 embryos per experimental condition.

Time-lapse imaging of cultured chick neural tube

1.5-days-old embryos were electroporated with a pNLS-EGFP-L2-PCNA (Leonhardt et al., 2000) vector, to distinguish the G2/M/G1 phases of the cell cycle, at 0.5 μ g/ μ l. 6 hr later, embryos were dissected, fluorescent neural tubes were transferred to a tissue chopper (Mc Ilwain) and 100 μ m thick transverse sections were sliced. Sections were collected in 199 culture medium (GIBCO) and were sorted out under a fluorescence microscope to control tissue integrity and the presence of isolated fluorescent cells along the dorso-ventral axis. Each slice was imbedded into 10 μ l of rat type I collagen (Roche; diluted at 80% with 1X MEM (GIBCO), 1X GlutaMax (GIBCO) and neutralizing bicarbonate (GIBCO)). Four neural tube-containing collagen drops (5 μ l) were distributed on a 35 mm glass-bottom culture dish (IBIDI). Collagen polymerization was performed at 38°C for 30 min and 1.5 ml of complete culture medium (199 medium, 5% FCS, 1X GlutaMax, Gentamicin 40 μ g/ml) was gently added. For time-lapse, images were acquired on an inverted microscope (Leica inverted DMI8) equipped with a heating enclosure (set up at 39°C), a spinning disk confocal head (CSU-X1-M1N, Yokogawa) a sCMOS camera and a 63X oil immersion objective (NA 1.4–0.7). We recorded 40 μ m thick z stacks (2 μ m z-steps) at 5 min intervals. IMARIS and ImageJ software were used for image processing and data analysis.

Statistics

Quantitative data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. Statistical analysis was performed using the Graph-Pad Prism software. Significance was assessed by performing ANOVA followed by the Student-Mann-Whitney test, (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ and n.s. non significant). See also Appendix 4.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Elisa Marti for sharing plasmids. We thank Drs. Bertrand B  naz  raf, Alice Davy, Bernard Ducommun, Xavier Morin and Alain Vincent for critical reading of the manuscript and Dr. Caroline Monod for improving the English. We thank the CBI animal facilities and the Toulouse Regional Imaging platform (TRI) for technical support. We acknowledge the Developmental Studies Hybridoma Bank, created by the NICHD of the NIH and maintained at The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242, for supplying monoclonal antibodies. Work in FP's laboratory is supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, Université P Sabatier, Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR), the Fondation pour la Recherche sur le Cancer (ARC; PJA 20131200138) and the Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC; CBD_14-V5-14_FRC). Manon Azais, Frédéric Bonnet and Mélanie Roussat are recipients of MESR studentships. Angie Molina is a recipient of IDEX UNITI and Fondation ARC. The funding entities had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Additional information

Funding

Funder	Author
Centre National de la Recherche Scientifique	Frédéric Bonnet Angie Molina Mélanie Roussat Manon Azais Sophie Bel Vialar Jacques Gautrais Fabienne Pituello Eric Agius
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique	Frédéric Bonnet Melanie Roussat Manon Azais
Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer	Angie Molina Fabienne Pituello
Université de Toulouse	Jacques Gautrais Fabienne Pituello Eric Agius
Fédération pour la Recherche sur le Cerveau	Fabienne Pituello

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions

Frédéric Bonnet, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology; Angie Molina, M  lanie Roussat, Data curation, Formal analysis, Investigation; Manon Azais, Data curation, Investigation; Sophie Bel-Vialar, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Writing—original draft; Jacques Gautrais, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Writing—original draft; Fabienne Pituello, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Validation, Investigation, Methodology, Writing—original draft, Project administration, Writing—review and editing; Eric Agius, Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Validation, Investigation, Methodology, Writing—original draft, Project administration, Writing—review and editing

Author ORCIDs

Jacques Gautrais  <http://orcid.org/0000-0002-7002-9920>

Eric Agius  <http://orcid.org/0000-0003-2123-9283>

Ethics

Animal experimentation: Experiments were performed in accordance with European Community guidelines regarding care and use of animals, agreement from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche number: C3155511, reference 01024.01 and the CNRS recommendations

Decision letter and Author response

Decision letter <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.038>

Author response <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.039>

Additional files**Supplementary files**

- Transparent reporting form

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.020>

Data availability

All data generated or analysed during this study are included in the manuscript and supporting files.

References

- Agathocleous M, Locker M, Harris WA, Perron M. 2007. A general role of hedgehog in the regulation of proliferation. *Cell Cycle* **6**:156–159. DOI: <https://doi.org/10.4161/cc.6.2.3745>, PMID: 17245127
- Agius E, Bel-Vialar S, Bonnet F, Pituello F. 2015. Cell cycle and cell fate in the developing nervous system: the role of CDC25B phosphatase. *Cell and Tissue Research* **359**:201–213. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1998-2>, PMID: 25260908
- Akhtar MW, Raingo J, Nelson ED, Montgomery RL, Olson EN, Kavalali ET, Monteggia LM. 2009. Histone deacetylases 1 and 2 form a developmental switch that controls excitatory synapse maturation and function. *Journal of Neuroscience* **29**:8288–8297. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0097-09.2009>, PMID: 19553468
- Albert M, Kalebic N, Florio M, Lakshmanaperumal N, Haffner C, Brandl H, Henry I, Huttner WB. 2017. Epigenome profiling and editing of neocortical progenitor cells during development. *The EMBO Journal* **36**:2642–2658. DOI: <https://doi.org/10.15252/embj.201796764>, PMID: 28765163
- Altschuler SJ, Wu LF. 2010. Cellular heterogeneity: do differences make a difference? *Cell* **141**:559–563. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.033>, PMID: 20478246
- Anderson DJ. 2001. Stem cells and pattern formation in the nervous system. *Neuron* **30**:19–35. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00260-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00260-4)
- Antal T, Krapivsky PL. 2010. Exact solution of a two-type branching process: clone size distribution in cell division kinetics. *Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment* **2010**:P07028. DOI: <https://doi.org/10.1088/1742-5468/2010/07/P07028>
- Arai Y, Pulvers JN, Haffner C, Schilling B, Nüsslein I, Calegari F, Huttner WB. 2011. Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nature Communications* **2**:154. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms1155>, PMID: 21224845
- Aressy B, Ducommun B. 2008. Cell cycle control by the CDC25 phosphatases. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **8**:818–824. DOI: <https://doi.org/10.2174/187152008786847756>, PMID: 19075563
- Aubert J, Dunstan H, Chambers I, Smith A. 2002. Functional gene screening in embryonic stem cells implicates Wnt antagonism in neural differentiation. *Nature Biotechnology* **20**:1240–1245. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt763>
- Baffet AD, Carabalona A, Dantas TJ, Doobin DD, Hu DJ, Vallee RB. 2016. Cellular and subcellular imaging of motor protein-based behavior in embryonic rat brain. *Methods in Cell Biology* **131**:349–363. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2015.06.013>, PMID: 26794523
- Baffet AD, Hu DJ, Vallee RB. 2015. Cdk1 activates Pre-mitotic nuclear envelope dynein recruitment and apical nuclear migration in neural stem cells. *Developmental Cell* **33**:703–716. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.04.022>, PMID: 26051540

- Bienvenu F**, Jirawatnotai S, Elias JE, Meyer CA, Mizeracka K, Marson A, Frampton GM, Cole MF, Odom DT, Odajima J, Geng Y, Zagozdzon A, Jecrois M, Young RA, Liu XS, Cepko CL, Gygi SP, Sicinski P. 2010. Transcriptional role of cyclin D1 in development revealed by a genetic–proteomic screen. *Nature* **463**:374–378. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature08684>
- Boutros R**, Lobjois V, Ducommun B. 2007. CDC25 phosphatases in Cancer cells: key players? good targets? *Nature Reviews Cancer* **7**:495–507. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrc2169>, PMID: 17568790
- Calegari F**, Haubensack W, Haffner C, Huttner WB. 2005. Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development. *Journal of Neuroscience* **25**:6533–6538. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0778-05.2005>, PMID: 16014714
- Caraballona A**, Hu DJ, Vallee RB. 2016. KIF1A inhibition immortalizes brain stem cells but blocks BDNF-mediated neuronal migration. *Nature Neuroscience* **19**:253–262. DOI: <https://doi.org/10.1038/nn.4213>, PMID: 26752160
- Cayuso J**, Martí E. 2005. Morphogens in motion: growth control of the neural tube. *Journal of Neurobiology* **64**:376–387. DOI: <https://doi.org/10.1002/neu.20169>, PMID: 16041754
- Coronado D**, Godet M, Bourillot PY, Taponnier Y, Bernat A, Petit M, Afanassieff M, Markossian S, Malashicheva A, Iacone R, Anastasiadis K, Savatier P. 2013. A short G1 phase is an intrinsic determinant of naïve embryonic stem cell pluripotency. *Stem Cell Research* **10**:118–131. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scr.2012.10.004>, PMID: 23178806
- Das RM**, Storey KG. 2012. Mitotic spindle orientation can direct cell fate and Bias notch activity in chick neural tube. *EMBO Reports* **13**:448–454. DOI: <https://doi.org/10.1038/embor.2012.42>, PMID: 22491029
- Das RM**, Storey KG. 2014. Apical abscission alters cell polarity and dismantles the primary cilium during neurogenesis. *Science* **343**:200–204. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1247521>, PMID: 24408437
- Del Bene F**, Wehman AM, Link BA, Baier H. 2008. Regulation of neurogenesis by interkinetic nuclear migration through an apical-basal notch gradient. *Cell* **134**:1055–1065. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.017>, PMID: 18805097
- Del Bene F**. 2011. Interkinetic nuclear migration: cell cycle on the move. *The EMBO Journal* **30**:1676–1677. DOI: <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.114>, PMID: 21540882
- Delaunay D**, Cortay V, Patti D, Knoblauch K, Dehay C. 2014. Mitotic spindle asymmetry: a wnt/PCP-regulated mechanism generating asymmetrical division in cortical precursors. *Cell Reports* **6**:400–414. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.026>, PMID: 24412369
- Gonzales KA**, Liang H, Lim YS, Chan YS, Yeo JC, Tan CP, Gao B, Le B, Tan ZY, Low KY, Liou YC, Bard F, Ng HH. 2015. Deterministic restriction on pluripotent state dissolution by Cell-Cycle pathways. *Cell* **162**:564–579. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.001>, PMID: 26232226
- Götz M**, Huttner WB. 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **6**:777–788. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm1739>, PMID: 16314867
- Gruber R**, Zhou Z, Sukchev M, Joerss T, Frappart PO, Wang ZQ. 2011. MCPH1 regulates the neuroprogenitor division mode by coupling the centrosomal cycle with mitotic entry through the Chk1-Cdc25 pathway. *Nature Cell Biology* **13**:1325–1334. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncb2342>, PMID: 21947081
- Hamburger V**, Hamilton HL. 1952. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Developmental Dynamics* **195**:231–272. DOI: <https://doi.org/10.1002/aja.1001950404>, PMID: 1304821
- Harris TE**. 1948. Branching processes. *The Annals of Mathematical Statistics* **19**:474–494. DOI: <https://doi.org/10.1214/aoms/1177730146>
- Hämmerle B**, Tejedor FJ. 2007. A novel function of DELTA-NOTCH signalling mediates the transition from proliferation to neurogenesis in neural progenitor cells. *PLoS ONE* **2**:e1169. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001169>, PMID: 18000541
- Hernandez-Miranda LR**, Müller T, Birchmeier C. 2017. The dorsal spinal cord and hindbrain: from developmental mechanisms to functional circuits. *Developmental Biology* **432**:34–42. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.10.008>, PMID: 27742210
- Hu DJ**, Baffet AD, Nayak T, Akhmanova A, Doye V, Vallee RB. 2013. Dynein recruitment to nuclear pores activates apical nuclear migration and mitotic entry in brain progenitor cells. *Cell* **154**:1300–1313. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.024>, PMID: 24034252
- Jiang Y**, Hsieh J. 2014. HDAC3 controls gap 2/mitosis progression in adult neural stem/progenitor cells by regulating CDK1 levels. *PNAS* **111**:13541–13546. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1411939111>, PMID: 25161285
- Johnston MD**, Edwards CM, Bodmer WF, Maini PK, Chapman SJ. 2007. Mathematical modeling of cell population dynamics in the colonic crypt and in colorectal Cancer. *PNAS* **104**:4008–4013. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0611179104>, PMID: 17360468
- Kicheva A**, Bollenbach T, Ribeiro A, Valle HP, Lovell-Badge R, Episkopou V, Briscoe J. 2014. Coordination of progenitor specification and growth in mouse and chick spinal cord. *Science* **345**:1254927. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1254927>, PMID: 25258086
- Kieffer I**, Lorenzo C, Dozier C, Schmitt E, Ducommun B. 2007. Differential mitotic degradation of the CDC25B phosphatase variants. *Oncogene* **26**:7847–7858. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210596>, PMID: 17599046
- Kimura H**, Miki Y, Nakanishi A. 2014. Centrosomes at M phase act as a scaffold for the accumulation of intracellular ubiquitinated proteins. *Cell Cycle* **13**:1928–1937. DOI: <https://doi.org/10.4161/cc.28896>, PMID: 24743317
- Kosodo Y**, Suetsugu T, Suda M, Mimori-Kiyosue Y, Toida K, Baba SA, Kimura A, Matsuzaki F. 2011. Regulation of interkinetic nuclear migration by cell cycle-coupled active and passive mechanisms in the developing brain. *The EMBO Journal* **30**:1690–1704. DOI: <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.81>, PMID: 21441895

- Körner K, Jérôme V, Schmidt T, Müller R. 2001. Cell cycle regulation of the murine cdc25B promoter: essential role for nuclear factor-Y and a proximal repressor element. *The Journal of Biological Chemistry* **276**:9662–9669. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M008696200>, PMID: 11104768
- Lacomme M, Liaubet L, Pituello F, Bel-Vialar S. 2012. NEUROG2 drives cell cycle exit of neuronal precursors by specifically repressing a subset of cyclins acting at the G1 and S phases of the cell cycle. *Molecular and Cellular Biology* **32**:2596–2607. DOI: <https://doi.org/10.1128/MCB.06745-11>, PMID: 22547683
- Lallemand Y, Luria V, Haffner-Krausz R, Lonai P. 1998. Maternally expressed PGK-Cre transgene as a tool for early and uniform activation of the cre site-specific recombinase. *Transgenic Research* **7**:105–112. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1008868325009>, PMID: 9608738
- Lange C, Calegari F. 2010. Cdks and cyclins link G1 length and differentiation of embryonic, neural and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle* **9**:1893–1900. DOI: <https://doi.org/10.4161/cc.9.10.11598>, PMID: 20436288
- Le Dréau G, Saade M, Gutiérrez-Vallejo I, Martí E. 2014. The strength of SMAD1/5 activity determines the mode of stem cell division in the developing spinal cord. *The Journal of Cell Biology* **204**:591–605. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.201307031>, PMID: 24515346
- Lee G, White LS, Hurov KE, Stappenbeck TS, Piwnica-Worms H. 2009. Response of small intestinal epithelial cells to acute disruption of cell division through CDC25 deletion. *PNAS* **106**:4701–4706. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0900751106>, PMID: 19273838
- Leonhardt H, Rahn HP, Weinzierl P, Sporbert A, Cremer T, Zink D, Cardoso MC. 2000. Dynamics of DNA replication factories in living cells. *The Journal of Cell Biology* **149**:271–280. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.149.2.271>, PMID: 10769021
- Li S, Mattar P, Ziyk D, Singh K, Chaturvedi CP, Kovach C, Dixit R, Kurrasch DM, Ma YC, Chan JA, Wallace V, Dilworth FJ, Brand M, Schuurmans C. 2012. GSK3 temporally regulates neurogenin 2 proneural activity in the neocortex. *Journal of Neuroscience* **32**:7791–7805. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1309-12.2012>, PMID: 22674256
- Lobjois V, Benazeraf B, Bertrand N, Medevielle F, Pituello F. 2004. Specific regulation of cyclins D1 and D2 by FGF and shh signaling coordinates cell cycle progression, patterning, and differentiation during early steps of spinal cord development. *Developmental Biology* **273**:195–209. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.05.031>, PMID: 15328007
- Locker M, Agathocleous M, Amato MA, Parain K, Harris WA, Perron M. 2006. Hedgehog signaling and the retina: insights into the mechanisms controlling the proliferative properties of neural precursors. *Genes & Development* **20**:3036–3048. DOI: <https://doi.org/10.1101/gad.391106>, PMID: 17079690
- Loeffler M, Roeder I. 2004. Conceptual models to understand tissue stem cell organization. *Current Opinion in Hematology* **11**:81–87. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.moh.0000133648.83991.af>, PMID: 15257023
- Losick R, Desplan C. 2008. Stochasticity and cell fate. *Science* **320**:65–68. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1147888>, PMID: 18388284
- Loulier K, Barry R, Mahou P, Le Franc Y, Supatto W, Matho KS, Ieng S, Fouquet S, Dupin E, Benosman R, Chédotal A, Beaurepaire E, Morin X, Livet J. 2014. Multiplex cell and lineage tracking with combinatorial labels. *Neuron* **81**:505–520. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.016>, PMID: 24507188
- Lukaszewicz AI, Anderson DJ. 2011. Cyclin D1 promotes neurogenesis in the developing spinal cord in a cell cycle-independent manner. *PNAS* **108**:11632–11637. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1106230108>, PMID: 21709239
- Míguez DG. 2015. A branching process to characterize the dynamics of stem cell differentiation. *Scientific Reports* **5**:13265. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep13265>, PMID: 26286123
- Ma ZQ, Liu Z, Ngan ES, Tsai SY. 2001. Cdc25B functions as a novel coactivator for the steroid receptors. *Molecular and Cellular Biology* **21**:8056–8067. DOI: <https://doi.org/10.1128/MCB.21.23.8056-8067.2001>, PMID: 11689696
- Miyata T, Okamoto M, Shinoda T, Kawaguchi A. 2014. Interkinetic nuclear migration generates and opposes ventricular-zone crowding: insight into tissue mechanics. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **8**:473. DOI: <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00473>, PMID: 25674051
- Molina A, Pituello F. 2017. Playing with the cell cycle to build the spinal cord. *Developmental Biology* **432**:14–23. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.12.022>, PMID: 28034699
- Morin X, Jaouen F, Durbec P. 2007. Control of planar divisions by the G-protein regulator LGN maintains progenitors in the chick neuroepithelium. *Nature Neuroscience* **10**:1440–1448. DOI: <https://doi.org/10.1038/nn1984>, PMID: 17934458
- MuhChyi C, Juliandi B, Matsuda T, Nakashima K. 2013. Epigenetic regulation of neural stem cell fate during corticogenesis. *International Journal of Developmental Neuroscience* **31**:424–433. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2013.02.006>, PMID: 23466416
- Murciano A, Zamora J, López-Sánchez J, Frade JM. 2002. Interkinetic nuclear movement may provide spatial clues to the regulation of neurogenesis. *Molecular and Cellular Neuroscience* **21**:285–300. DOI: <https://doi.org/10.1006/mcne.2002.1174>, PMID: 12401448
- Müller T, Anlag K, Wildner H, Britsch S, Treier M, Birchmeier C. 2005. The bHLH factor Olig3 coordinates the specification of dorsal neurons in the spinal cord. *Genes & Development* **19**:733–743. DOI: <https://doi.org/10.1101/gad.326105>, PMID: 15769945
- Norden C, Young S, Link BA, Harris WA. 2009. Actomyosin is the main driver of interkinetic nuclear migration in the retina. *Cell* **138**:1195–1208. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.032>, PMID: 19766571

- Olivera-Martinez I**, Schurch N, Li RA, Song J, Halley PA, Das RM, Burt DW, Barton GJ, Storey KG. 2014. Major transcriptome re-organisation and abrupt changes in signalling, cell cycle and chromatin regulation at neural differentiation in vivo. *Development* **141**:3266–3276. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.112623>, PMID: 25063452
- Pauklin S**, Madrigal P, Bertero A, Vallier L. 2016. Initiation of stem cell differentiation involves cell cycle-dependent regulation of developmental genes by cyclin D. *Genes & Development* **30**:421–433. DOI: <https://doi.org/10.1101/gad.271452.115>, PMID: 26883361
- Pauklin S**, Vallier L. 2013. The cell-cycle state of stem cells determines cell fate propensity. *Cell* **155**:135–147. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.031>, PMID: 24074866
- Peco E**, Escude T, Agius E, Sabado V, Medevielle F, Ducommun B, Pituello F. 2012. The CDC25B phosphatase shortens the G2 phase of neural progenitors and promotes efficient neuron production. *Development* **139**:1095–1104. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.068569>, PMID: 22318230
- Pilaz LJ**, Patti D, Marcy G, Ollier E, Pfister S, Douglas RJ, Betizeau M, Gautier E, Cortay V, Doerflinger N, Kennedy H, Dehay C. 2009. Forced G1-phase reduction alters mode of division, neuron number, and laminar phenotype in the cerebral cortex. *PNAS* **106**:21924–21929. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0909894106>, PMID: 19959663
- Quastler H**, Sherman FG. 1959. Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Experimental Cell Research* **17**:420–438. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(59\)90063-1](https://doi.org/10.1016/0014-4827(59)90063-1), PMID: 13672199
- Ramalho-Santos M**. 2004. Stem cells as probabilistic self-producing entities. *BioEssays* **26**:1013–1016. DOI: <https://doi.org/10.1002/bies.20053>, PMID: 15351971
- Saadaoui M**, Machicoane M, di Pietro F, Etoc F, Echard A, Morin X. 2014. Dlg1 controls planar spindle orientation in the neuroepithelium through direct interaction with LGN. *The Journal of Cell Biology* **206**:707–717. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.201405060>, PMID: 25202028
- Saade M**, Gonzalez-Gobartt E, Escalona R, Usieto S, Martí E. 2017. Shh-mediated centrosomal recruitment of PKA promotes symmetric proliferative neuroepithelial cell division. *Nature Cell Biology* **19**:493–503. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncb3512>, PMID: 28446817
- Saade M**, Gutiérrez-Vallejo I, Le Dréau G, Rabadán MA, Miguez DG, Buceta J, Martí E. 2013. Sonic hedgehog signaling switches the mode of division in the developing nervous system. *Cell Reports* **4**:492–503. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.038>, PMID: 23891002
- Sato N**, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. 2004. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nature Medicine* **10**:55–63. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm979>, PMID: 14702635
- Schenk J**, Wilsch-Bräuninger M, Calegari F, Huttner WB. 2009. Myosin II is required for interkinetic nuclear migration of neural progenitors. *PNAS* **106**:16487–16492. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0908928106>, PMID: 19805325
- Schwartz YB**, Pirrotta V. 2007. Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nature Reviews Genetics* **8**:9–22. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg1981>, PMID: 17173055
- Sela Y**, Molotski N, Golan S, Itskovitz-Eldor J, Soen Y. 2012. Human embryonic stem cells exhibit increased propensity to differentiate during the G1 phase prior to phosphorylation of retinoblastoma protein. *Stem Cells* **30**:1097–1108. DOI: <https://doi.org/10.1002/stem.1078>, PMID: 22415928
- Singh AM**, Sun Y, Li L, Zhang W, Wu T, Zhao S, Qin Z, Dalton S. 2015. Cell-Cycle control of bivalent epigenetic domains regulates the exit from pluripotency. *Stem Cell Reports* **5**:323–336. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.07.005>, PMID: 26278042
- Sohn J**, Kristjánsdóttir K, Safi A, Parker B, Kiburz B, Rudolph J. 2004. Remote hot spots mediate protein substrate recognition for the Cdc25 phosphatase. *PNAS* **101**:16437–16441. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0407663101>, PMID: 15534213
- Soufi A**, Dalton S. 2016. Cycling through developmental decisions: how cell cycle dynamics control pluripotency, differentiation and reprogramming. *Development* **143**:4301–4311. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.142075>, PMID: 27899507
- Spear PC**, Erickson CA. 2012. Apical movement during interkinetic nuclear migration is a two-step process. *Developmental Biology* **370**:33–41. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.06.031>, PMID: 22884563
- Thomas Y**, Peter M, Mechali F, Blanchard JM, Coux O, Baldin V. 2014. Kizuna is a novel mitotic substrate for CDC25B phosphatase. *Cell Cycle* **13**:3867–3877. DOI: <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.972882>, PMID: 25558830
- Tozer S**, Baek C, Fischer E, Goïame R, Morin X. 2017. Differential routing of Mindbomb1 via centriolar satellites regulates asymmetric divisions of neural progenitors. *Neuron* **93**:542–551. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.042>, PMID: 28132826
- Tronche F**, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schütz G. 1999. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nature Genetics* **23**:99–103. DOI: <https://doi.org/10.1038/12703>, PMID: 10471508
- Tsai JW**, Lian WN, Kemal S, Kriegstein AR, Vallee RB. 2010. Kinesin 3 and cytoplasmic dynein mediate interkinetic nuclear migration in neural stem cells. *Nature Neuroscience* **13**:1463–1471. DOI: <https://doi.org/10.1038/nn.2665>, PMID: 21037580
- Ueno H**, Nakajo N, Watanabe M, Isoda M, Sagata N. 2008. FoxM1-driven cell division is required for neuronal differentiation in early xenopus embryos. *Development* **135**:2023–2030. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.019893>, PMID: 18469223

- Vilas-Boas F**, Fior R, Swedlow JR, Storey KG, Henrique D. 2011. A novel reporter of notch signalling indicates regulated and random notch activation during vertebrate neurogenesis. *BMC Biology* **9**:58. DOI: <https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-58>, PMID: 21880129
- Vogel H**, Niewisch H, Matioli G. 1969. Stochastic development of stem cells. *Journal of Theoretical Biology* **22**: 249–270. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(69\)90004-6](https://doi.org/10.1016/0022-5193(69)90004-6), PMID: 5783913
- Wilcock AC**, Swedlow JR, Storey KG. 2007. Mitotic spindle orientation distinguishes stem cell and terminal modes of neuron production in the early spinal cord. *Development* **134**:1943–1954. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.002519>, PMID: 17470968
- Zhao BM**, Keasey SL, Tropea JE, Lountos GT, Dias BK, Cherry S, Raran-Kurussi S, Waugh DS, Ulrich RG. 2015. Phosphotyrosine substrate sequence motifs for dual specificity phosphatases. *Plos One* **10**:e0134984. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134984>, PMID: 26302245

Appendix 1

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.021>

Modeling the dynamics

In the appendices, we expose explicitly the hypotheses we made while interpreting the data of CDC25B experiments using a model of cell populations dynamics. In particular, we examine at the importance of a clear distinction between interpretations at the population level or at the cell level (**Altschuler and Wu, 2010**). The model is first exposed at the population scale in Appendix 2. We derive an analytical solution when fate parameters are considered unvaried over the time window of the analyses. We show that the evolution is governed by one parameter: the balance between proliferation and differentiation. The model at the population scale can match many scenarios at the cell scale. In Appendix 3, we consider two contrasted scenarios that produce the same dynamics at the population scale. The first scenario considers that all cells divide at the same rate (all cells share a common cycle length), and that the choice by a cell to produce a symmetric proliferative division, a symmetric neurogenic division or an asymmetric division is stochastic. Such a stochastic choice at the cell scale is a very common interpretation for stem cells dynamics (**Harris, 1948; Loeffler and Roeder, 2004; Anderson, 2001; Antal and Krapivsky, 2010; Vogel et al., 1969**), even in the presence of (non-autonomous) external signaling (**Losick and Desplan, 2008; Johnston et al., 2007; Ramalho-Santos, 2004**). In this interpretation, the proportions of the modes of division at the population scale (the statistical measure over a large number of cells) is a direct reflection of the probabilities at the individual scale, provided all cells divide asynchronously with the same cycle length. The second scenario is used to test the opposite possibility: that the proportion of the modes of division at the population scale only comes from differences in cycle lengths, each mode of division having a specific cycle length.

We then present in Appendix 4 how our model statistics were used to enlighten the data. We point out that our model was not designed to “fit the data” by tuning free parameters, since it has no free parameters at all. It is used to check whether the modes of divisions (MoD) measured at HH17 were well in accordance with the neuronal fractions measured at HH22 given the measured cell cycle length, doing so with as few assumptions as possible.

Models for proliferation/differentiation in the spinal cord have been proposed previously in (**Saade et al., 2013**) and (**Míguez, 2015**). However, a developmental switch has been incorporated in the first, which we do not use here. Also, we encounter a noteworthy difference between the second in (**Míguez, 2015**) and our model. In (**Míguez, 2015**), the model is built starting from cell description, and the limit to continuous-time population dynamics is taken considering that all mitoses are synchronous with a cell cycle length tending to 0 (which is implicit in equations 33-35 of (**Míguez, 2015**)-SI. Here, we first consider division rates at the population scale, and only then do we consider interpretations at the cell scale. Importantly, this difference between the two models yields different dynamics, especially when the balance between proliferation and differentiation of the progenitors is negative (i.e. in favor of differentiation). In the most extreme case (purely differentiating progenitors), our model still predicts the expected dynamics.

Appendix 2

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.022>

The model

We consider a population of cells $C(t)$ at time t , part of which are proliferating progenitors $P(t)$, part of which are differentiated neurons $N(t)$, with

$$C(t) = P(t) + N(t) \quad (4)$$

The dividing progenitors can undergo three kinds of fate, yielding:

- some proliferative divisions ending with two progenitors (pp-divisions)
- some asymmetric divisions ending with one progenitor and one neuron (pn-divisions)
- some terminal divisions ending with two neurons (nn-divisions)

We consider that the division of a cell in two cells is instantaneous (it is always possible to find a date before which there is one cell, and after which there are two cells).

We also consider that division events occur uniformly in time (asynchronously).

Let us denote :

η the rate at which P-cells undergo divisions (in fraction of the P-pool per unit time)

$\alpha_{pp}(t)$ the fraction of dividing cells undergoing pp-divisions

$\alpha_{pn}(t)$ the fraction of dividing cells undergoing pn-divisions

$\alpha_{nn}(t)$ the fraction of dividing cells undergoing nn-divisions

$P(0), N(0)$ the quantity of P-cells and N-cells known at time $t = 0$.

In general, the fractions of pp-, pn- and nn-divisions can evolve with time, under the constraint that $\alpha_{pp} + \alpha_{pn} + \alpha_{nn} = 1$, and so might as well the division rate.

The time change $\dot{P}(t)$ of pool $P(t)$ (resp. $\dot{N}(t)$) is then driven at time t by:

$$\begin{cases} \frac{dP}{dt} = \dot{P}(t) = -\eta P(t) + 2\alpha_{pp}(t)\eta P(t) + 1\alpha_{pn}(t)\eta P(t) \\ \frac{dN}{dt} = \dot{N}(t) = +2\alpha_{nn}(t)\eta P(t) + 1\alpha_{pn}(t)\eta P(t) \end{cases} \quad (5)$$

where in the first equation :

- $-\eta P(t)$ quantifies the rate at which P-cells disappear from the pool $P(t)$ because they divide. The quantity of disappearing P-cells between t and $t + dt$ is then $\eta P(t)dt$
- $\alpha_{pp}\eta P(t)$ quantifies the fraction of this quantity that undergoes a pp-division ; it doubles to yield 2 P and adds up to the pool $P(t)$ (hence the factor 2)
- $\alpha_{pn}\eta P(t)$ quantifies the fraction of this quantity that undergoes a pn-division ; it doubles to yield 1 P and 1 N, so only half (the P part) adds up to the pool $P(t)$ (hence the factor 1)

correspondingly in the second equation :

- $\alpha_{nn}\eta P(t)$ quantifies the fraction of this quantity that undergoes a nn-division ; it doubles to yield 2 N and adds up to the pool $N(t)$ (hence the factor 2)
- $\alpha_{pn}\eta P(t)$ is the fraction of this quantity that undergoes a pn-division ; it doubles to yield 1 P and 1 N and only half (the N part) adds up to the pool $N(t)$ (hence the factor 1)

Solutions with unvarying parameters

Considering a period of time during which the fractions of pp-, pn- and nn-divisions do not evolve with time, the dynamics can be written:

$$\begin{cases} \dot{P}(t) = -\eta P(t) + 2\alpha_{pp}\eta P(t) + 1\alpha_{pn}\eta P(t) \\ \dot{N}(t) = +2\alpha_{nn}\eta P(t) + 1\alpha_{pn}\eta P(t) \end{cases}$$

$$\begin{cases} \dot{P}(t) = (-1 + 2\alpha_{pp} + \alpha_{pn})\eta P(t) \\ \dot{N}(t) = (\alpha_{pn} + 2\alpha_{nn})\eta P(t) \end{cases} \quad (7)$$

Let $\gamma = -1 + 2\alpha_{pp} + \alpha_{pn}$.

Considering that $\alpha_{pp} + \alpha_{pn} + \alpha_{nn} = 1$, we have:

$$\begin{aligned} \alpha_{pn} + 2\alpha_{nn} &= \alpha_{pn} + 2(1 - \alpha_{pp} - \alpha_{pn}) \\ &= \alpha_{pn} + 2 - 2\alpha_{pp} - 2\alpha_{pn} \\ &= 1 - (-1 + 2\alpha_{pp} + \alpha_{pn}) \\ &= 1 - \gamma \end{aligned} \quad (8)$$

Hence,

$$\begin{cases} \dot{P}(t) = \gamma\eta P(t) \\ \dot{N}(t) = (1 - \gamma)\eta P(t) \end{cases} \quad (9)$$

and the solutions are of the general form:

$$\begin{cases} P(t) = P(0)e^{\gamma\eta t} \\ N(t) = N(0) + \int_0^t (1 - \gamma)\eta P(u) du \end{cases} \quad (10)$$

Plugging the first into the second, we have:

$$\begin{cases} P(t) = P(0)e^{\gamma\eta t} \\ N(t) = N(0) + (1 - \gamma)\eta P(0) \int_0^t e^{\gamma\eta u} du \end{cases} \quad (11)$$

Explicit solutions

For explicit solutions, we have to consider two cases: $\gamma = 0$ and $\gamma \neq 0$.

For $\gamma = 0$, we have:

$$\begin{cases} P(t) = P(0) \times 1 \\ N(t) = N(0) + \eta P(0) \int_0^t 1 du \end{cases}$$

so that:

$$\begin{cases} P(t) = P(0) \\ N(t) = N(0) + \eta P(0)t \end{cases} \quad (12)$$

In that case, the pool of progenitors is steady, and the pool of neurons increases linearly with time.

For $\gamma \neq 0$, solving the integral in the second equation yields:

$$\begin{cases} P(t) = P(0)e^{\gamma\eta t} \\ N(t) = N(0) + (1 - \gamma)\eta P(0) \left(\frac{1}{\eta\gamma} (e^{\eta\gamma t} - e^{\eta\gamma 0}) \right) \end{cases} \quad (13)$$

so that:

$$\begin{cases} P(t) = P(0)e^{\gamma\eta t} \\ N(t) = N(0) + P(0) \frac{1-\gamma}{\gamma} (e^{\eta\gamma t} - 1) \end{cases} \quad (14)$$

In that case, the evolution of the system depends on the sign of γ .

Meaning of γ

We note that, for a given mitosis rate η , the dynamics only depend upon γ .

We have $\gamma = 2\alpha_{pp} + \alpha_{pn} - 1 = 2\alpha_{pp} + \alpha_{pn} - (\alpha_{pp} + \alpha_{pn} + \alpha_{nn}) = \alpha_{pp} - \alpha_{nn}$.

The case $\gamma = 0$ (**Equation 12**) corresponds to $\alpha_{pp} = \alpha_{nn}$. Here, the P-pool is steady and can be considered as a source of N-cells emitted at the steady rate $\eta P(0)$ (N-cells per unit time):

$$N(t) = N(0) + \eta P(0)t \quad (\text{for } \alpha_{pp} = \alpha_{nn}) \quad (15)$$

The case $\alpha_{pp} > \alpha_{nn}$ yields $\gamma > 0$, so that the P-pool will increase with time. At the extreme, a purely proliferative P-pool corresponds to $\alpha_{pp} = 1$ and $\alpha_{nn} = 0$, hence $\gamma = 1$. In that case, the dynamics simplify to the classical proliferative equation for the P-pool, while the N-pool remains unchanged:

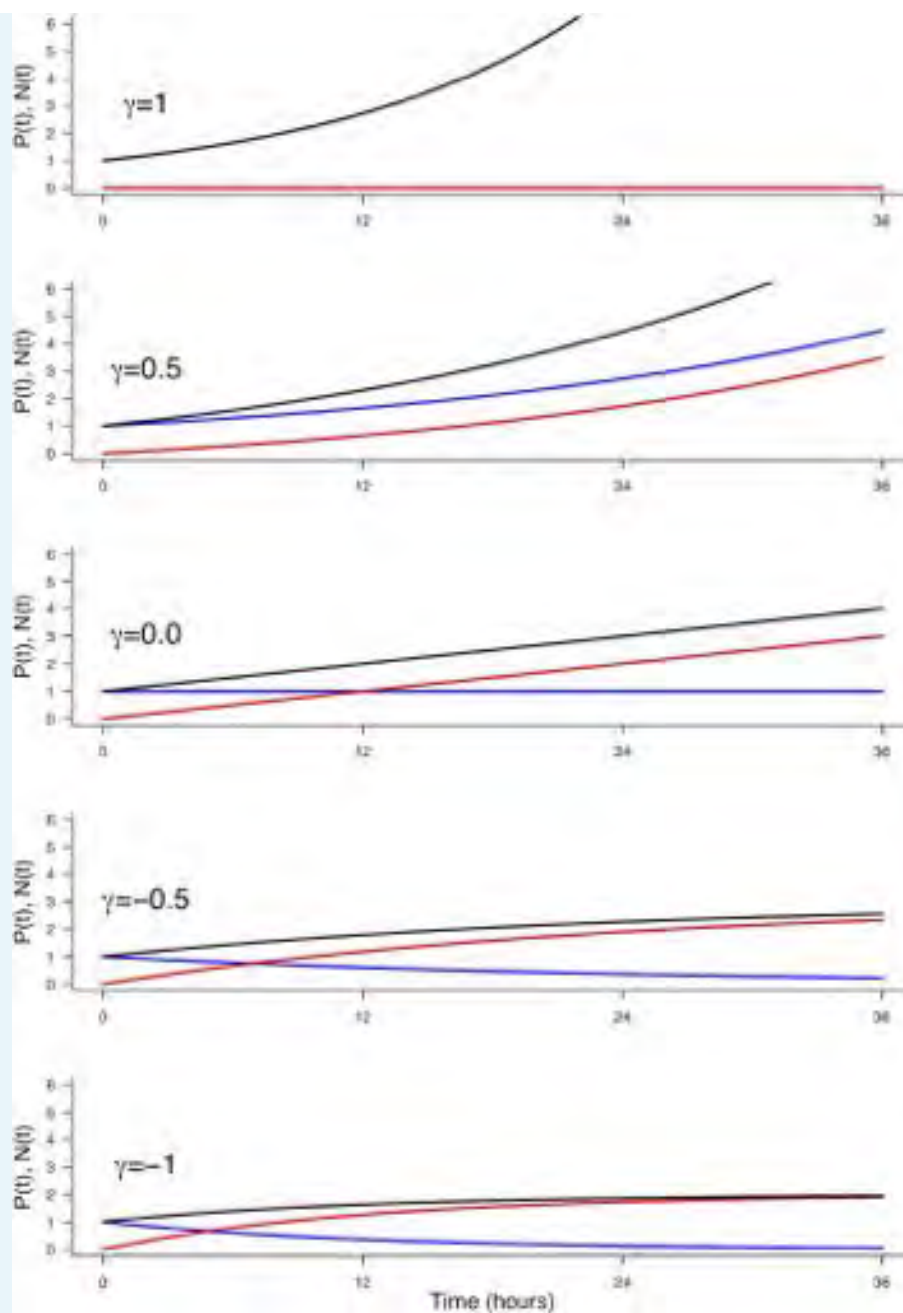
$$\begin{cases} P(t) = P(0)e^{\eta t} \\ N(t) = N(0) \end{cases} \quad (\text{for } \alpha_{pp} = 1, \alpha_{nn} = 0) \quad (16)$$

The case $\alpha_{pp} < \alpha_{nn}$ yields $\gamma < 0$, so that the P-pool will decrease with time. At the extreme, a fully differentiating P-pool corresponds to $\alpha_{pp} = 0$ and $\alpha_{nn} = 1$, hence $\gamma = -1$. In that case, the P-pool undergoes a classical exponential decay, and the N-pool increases in proportion to the remaining P-pool, up to $2P(0)$:

$$\begin{cases} P(t) = P(0)e^{-\eta t} \\ N(t) = N(0) + P(0)(-2)(e^{-\eta t} - 1) \\ \quad = N(0) + 2P(0)(1 - e^{-\eta t}) \end{cases} \quad (\text{for } \alpha_{pp} = 0, \alpha_{nn} = 1) \quad (17)$$

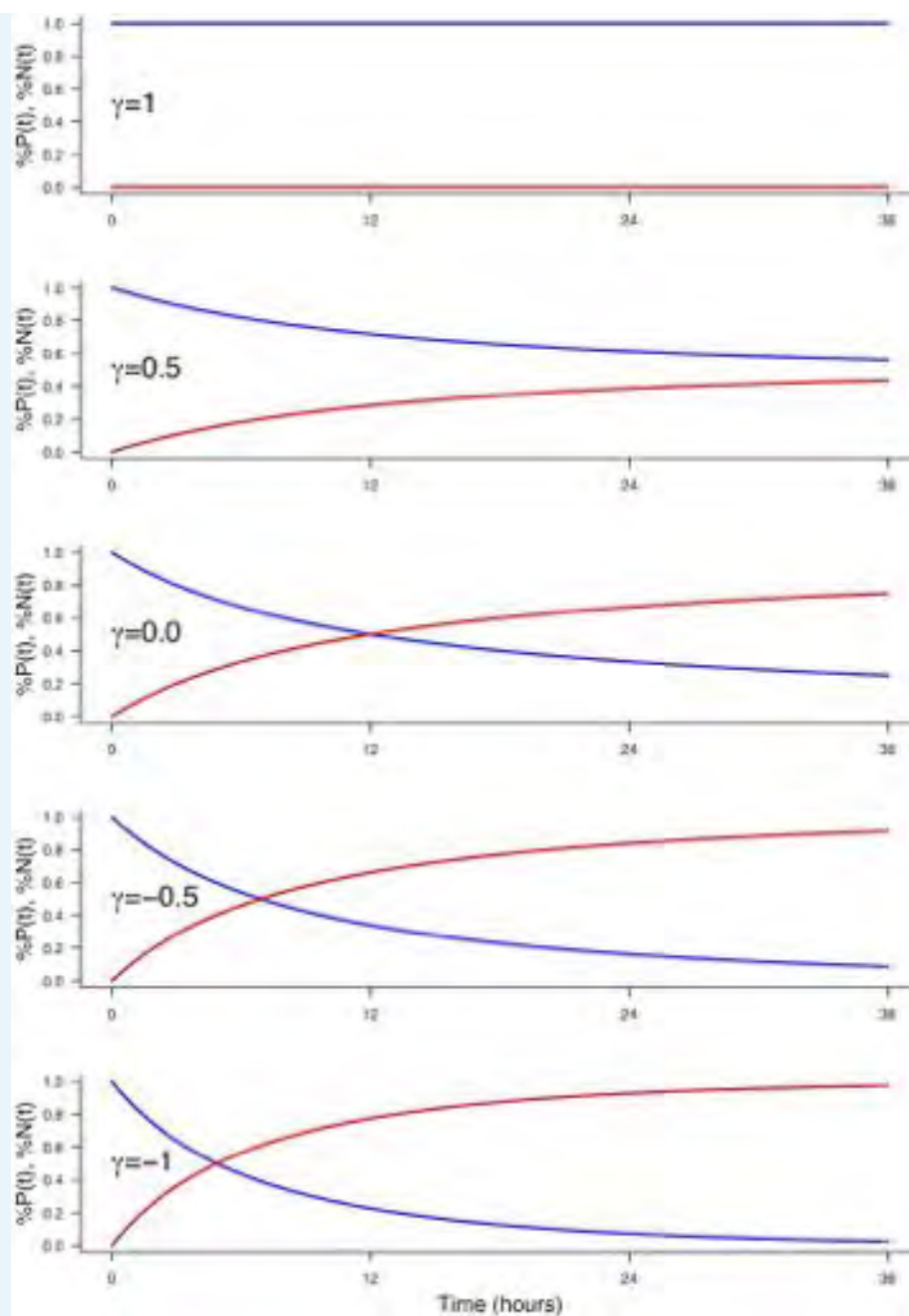
Regarding the total population $C(t) = P(t) + N(t)$ (**Appendix 2—Figure 1**), positive (or null) value of γ ($\alpha_{pp} \geq \alpha_{nn}$) allows an infinite growth of the total population $C(t)$ whereas the growth saturates as soon as $\gamma < 0$ ($\alpha_{pp} < \alpha_{nn}$). Since we made the hypothesis that the fate parameters were considered as steady over time, interpretations for the real biological system should take into account that these fate parameters actually change over longer time in the real system.

Regarding the fraction of neurons in the population, $N(t)/C(t)$ (**Appendix 2—Figure 2**), it increases as soon as $\gamma < 1$, yet at a rate depending on γ .



Appendix 2—figure 1. Effect of γ on the evolution of $P(t)$ (blue), $N(t)$ (red) and $C(t) = P(t) + N(t)$ (black). Parameters used: $P(0) = 1$, $N(0) = 0$, $\eta = 1/12$, corresponding to a cycle time of 12 hr.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.023>



Appendix 2—figure 2. Effect of γ on the evolution of the fractions $P(t)/C(t)$ (blue) and $N(t)/C(t)$ (red).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.024>

Appendix 3

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.025>

Interpretations at the individual cell scale

We have so far described the system at the population scale. At the individual scale, two different kinds of process (at least) would result in the same dynamics at the population scale described in **Equation 5**.

Probabilistic fates, with a common deterministic division rate

The most immediate interpretation is to consider that all cells undergo mitosis at the same rate, and that the fate of any mitosis is stochastic and probabilistically distributed according to $(\alpha_{pp}, \alpha_{pm}, \alpha_{mm})$. In that case, only the rate η (used in the equations at the population scale) has to be determined from a cell-scale model, since it depends upon the characteristic time τ_m between two mitoses at the cell scale.

Let us consider the hypothesis that mitosis happen exactly every τ_m for all cells (common deterministic division time), still asynchronously so that division dates are uniformly distributed over time (this is the most common hypothesis in the community). We want to express η as a function of τ_m .

For the sake of simplicity, let us consider the pure proliferative process ($\alpha_{pp} = 1$) so that we deal with only one population $P(t)$.

Let us start at time 0 with an initial pool $P_1(0)$ containing a very large number of cells (so that $P_1(t)$ can be considered as continuous). Since mitoses take a fixed time τ_m , their last division occurred before $t = 0$, the oldest division happened at $0 - \tau_m$ and they all will undertake a mitosis in the time interval $[0 .. 0 + \tau_m]$. Since divisions are uniformly distributed over time, the number performing a mitosis during a small time interval Δt is proportional to $\Delta t / \tau_m$ and $P_1(0)$. Hence, the loss in P_1 between t and $t + \Delta t$ is given by:

$$P_1(t + \Delta t) - P_1(t) = -P_1(0)\Delta t / \tau_m \quad (18)$$

$$\frac{P_1(t + \Delta t) - P_1(t)}{\Delta t} = -P_1(0) / \tau_m \quad (19)$$

Taking the limit $\Delta t \rightarrow 0$ yields:

$$\dot{P}(t) = \frac{dP_1(t)}{dt} = -P_1(0) / \tau_m \quad (20)$$

Considering $P_1(0)$, we then have:

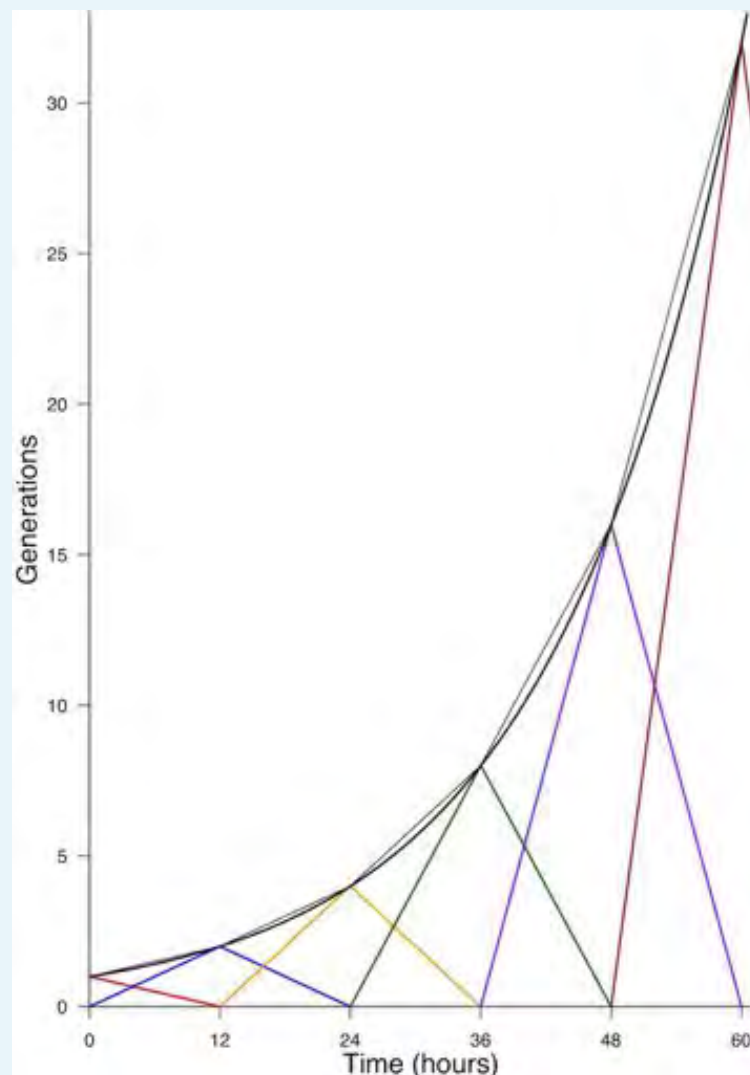
$$\begin{aligned} P_1(t) &= P_1(0) - (P_1(0) / \tau_m) t \\ &= P_1(0)(1 - t / \tau_m) \end{aligned} \quad (21)$$

Logically, $P_1(t)$ decreases linearly from $P_1(0)$ down to 0 at time $t = \tau_m$. Meanwhile, the output of each division will populate the next generation, say $P_2(t)$, at twice the rate P_1 disappears, up to $2P_1(0)$ at time $t = \tau_m$, from which P_2 will start decreasing doing mitosis and populate the third generation P_3 and so on... Such a process would then translate into a population growth which is piecewise linear (**Appendix 3—figure 1**), but very close to an exponential growth. If we equate at time τ_m the piecewise growth, and its exponential approximation at rate η , we have:

$$e^{\eta \tau_m} = P_2(\tau_m) = 2\eta = \ln 2 / \tau_m \quad (22)$$

Denoting $\tau_c = 1/\eta$ the characteristic time at the population scale, we then have: $\tau_c = \tau_m / \ln 2$. Hence, from an observed time τ_c at the population scale, we should infer (under

this model) that $\tau_m = \tau_c \ln 2$, that is $\tau_m \simeq 0.7\tau_c$ (e.g. if population cycle time is 12 hr, cell cycle time should be around 8h20).



Appendix 3—figure 1. Generations produced by an initial pool. $P_1(0) = 1$, under the hypothesis of a common deterministic division time $\tau_m = 12$ h. Each generation is reported by a color. The thin black curve indicates the total pool present at time t (adding the two generations). The thick black curve reports the continuous approximation $\exp(\ln 2 t / \tau_m)$ (**Equation 22**).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.026>

Deterministic fates, with specific division rates

Another way to produce the dynamics described in **Equation 5** at the population scale is to consider that each kind of fate result from a specific division time. In such a picture, the time needed to achieve a cycle deterministically determines the kind of fate.

To exhibit this interpretation, we rewrite **Equation 5** as follows:

$$\begin{cases} \dot{P}(t) = -\eta(\alpha_{pp} + \alpha_{pn} + \alpha_{nn})P(t) + 2\alpha_{pp}\eta P(t) + 1\alpha_{pn}\eta P(t) \\ \dot{N}(t) = 1\alpha_{pn}\eta P(t) + 2\alpha_{nn}\eta P(t) \end{cases} \quad (23)$$

Denoting $\eta_{pp} = \alpha_{pp}\eta$ (and correspondingly for η_{pn} and η_{nn}), we then have:

$$\begin{cases} \dot{P}(t) = -(\eta_{pp} + \eta_{pn} + \eta_{nn})P(t) + 2\eta_{pp}P(t) + 1\eta_{pn}P(t) \\ \dot{N}(t) = 1\eta_{pn}P(t) + 2\eta_{nn}P(t) \end{cases} \quad (24)$$

The interpretation is then that, from the pool $P(t)$, the cells leaving it at rate η_{pp} yield pp-divisions, those leaving it at rate η_{pn} yield pn-divisions, and the others, leaving it at rate η_{nn} , yield nn-divisions. Overall, the pool $P(t)$ depletes at the sum rate $\eta = \eta_{pp} + \eta_{pn} + \eta_{nn}$.

Correspondingly, the population cycle time $\tau_c = 1/\eta$ would then be given by:

$$\frac{1}{\tau_c} = \frac{1}{\tau_{pp}} + \frac{1}{\tau_{pn}} + \frac{1}{\tau_{nn}} \quad (25)$$

equivalently by:

$$\tau_c = \frac{\tau_{pp}\tau_{pn}\tau_{nn}}{\tau_{pn}\tau_{nn} + \tau_{pp}\tau_{nn} + \tau_{pp}\tau_{pn}} \quad (26)$$

We also note that the distribution of fates is then completely constrained by the $\tau_{pp}, \tau_{pn}, \tau_{nn}$ (under the constraint that mitosis events are uniformly distributed in time). Indeed, it remains true that the quantity leaving the P-pool during Δt to make pp-divisions is proportional to $\Delta t/\tau_{pp}$ (corr. for other fates). This implies in turn that the fraction α_{pp} leaving for an pp-division is τ_c/τ_{pp} , correspondingly, $\alpha_{pn} = \tau_c/\tau_{pn}$ and $\alpha_{nn} = \tau_c/\tau_{nn}$.

As a consequence, if we have experimental measures of τ_c and of a distribution among fates $\alpha_{pp}, \alpha_{pn}, \alpha_{nn}$, we must conclude that:

$$\tau_{pp} = \frac{\tau_c}{\alpha_{pp}}, \tau_{pn} = \frac{\tau_c}{\alpha_{pn}}, \tau_{nn} = \frac{\tau_c}{\alpha_{nn}} \quad (27)$$

For $\tau_c = 12$ h, and a distribution (0.6, 0.3, 0.1), we would obtain:

$$\tau_{pp} = 20 \text{ h}, \tau_{pn} = 40 \text{ h}, \tau_{nn} = 120 \text{ h} \quad (28)$$

The main point is then: if the ratios between fractions of fate $\alpha_{pp}, \alpha_{pn}, \alpha_{nn}$ resulted only from differences in rates $\eta_{pp}, \eta_{pn}, \eta_{nn}$, the ratios between rates must be the same as the ratios between fractions:

$$\frac{\eta_{pp}}{\eta_{nn}} = \frac{\alpha_{pp}}{\alpha_{nn}}; \frac{\eta_{pp}}{\eta_{pn}} = \frac{\alpha_{pp}}{\alpha_{pn}}; \frac{\eta_{pn}}{\eta_{nn}} = \frac{\alpha_{pn}}{\alpha_{nn}} \quad (29)$$

With $\alpha_{pp} = 0.6$, $\alpha_{nn} = 0.1$, we would have $\tau_{nn} = (\alpha_{pp}/\alpha_{nn})\tau_{pp} = 6 \tau_{pp}$.

If we exclude the possibility that a nn-division is six times as long as a pp-division, then the distribution of fates can not be exclusively determined by differences in fate-based cycle times. It does not exclude that a given kind of fate (e.g. proliferative divisions pp) would require a longer time to be achieved than others, it excludes that such differences would suffice per se to explain the differences between the fractions of fates.

Appendix 4

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.027>

Model predictions using (noisy) data

We obtain experimental measures with this system at different times after electroporation (time 0 hr): the fractions $f_N(24)$ of neurons at 24 hr and $f_N(48)$ at 48 hr (the fraction among the electroporated cells), the distribution of fates at 24 hr as well as an estimate of $\tau_c = 12$ hours. We hypothesize that the fate distribution is steady between 24 hr and 48 hr after electroporation, that is the 24 hr between quantification of the mode of division and progenitors and neuron counting. We use the model to check the consistency of these data with the model.

Knowing the fractions of neurons at 24 h and 48 h, confidence intervals upon the fate distribution

The first test of consistency was to determine the range of distribution of fates which was able to explain the transition from $f_N(24)$ to $f_N(48)$.

If we had a system with only symmetric divisions (e.g. some value for α_{pp} , $\alpha_{nn} = 1 - \alpha_{pp}$, with $\alpha_{pn} = 0$), we first ensured that one pair ($f_N(24)$, $f_N(48)$) would be compatible with only one fate distribution.

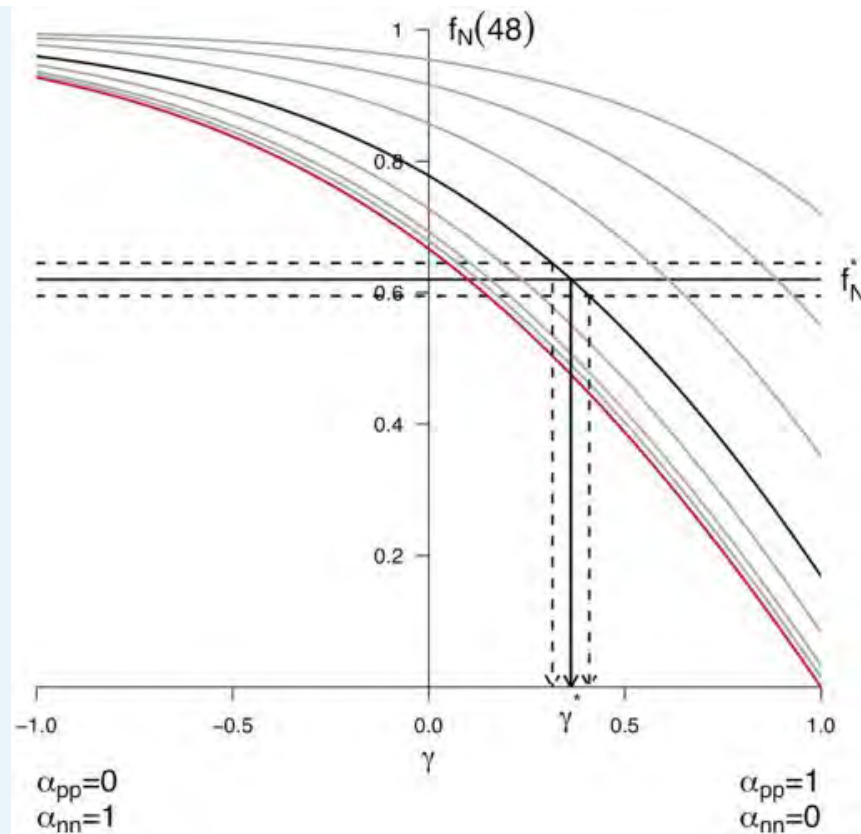
Considering $P(24) + N(24) = 1$ arbitrary total amount of cells at 24 hr, we can plug $N(24) = f_N(24)$ and $P(24) = 1 - f_N(24)$ into **Equation 14** and get:

$$\begin{cases} P(48) = (1 - f_N(24))e^{24\gamma\eta} \\ N(48) = f_N(24) + (1 - f_N(24))\frac{1-\gamma}{\gamma}(e^{24\gamma\eta} - 1) \end{cases} \quad (30)$$

where $P(48)$, $N(48)$ correspond to the amount obtained at 48 hr from this arbitrary amount of 1 at 24 hr. We have $f_N(48) = N(48)/(N(48) + P(48))$, yielding :

$$f_N(48) = \frac{\left[f_N(24) + (1 - f_N(24))\frac{1-\gamma}{\gamma}(e^{24\gamma\eta} - 1) \right]}{\left[f_N(24) + (1 - f_N(24))\frac{1-\gamma}{\gamma}(e^{24\gamma\eta} - 1) \right] + \left[(1 - f_N(24))e^{24\gamma\eta} \right]} \quad (31)$$

which holds for any initial cell amount (**Appendix 4—figure 1**).



Appendix 4—figure 1. Predicted $f_N(48)$ from $f_N(24)$ for every distribution of symmetric division. The different curves correspond to different starting values $f_N(24)$ taken in $(0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 0.9, 0.95)$. The bold line corresponds to $f_N(24) = 0.6$, the red line to $f_N(24) = 0.0$. Each curve reports the predicted value for $f_N(48)$ starting from the corresponding $f_N(24)$, and for all possible distributions of fates given by $\gamma = \alpha_{pp} - \alpha_{nn}$ (x-axis). Each combined $(f_N(24), \gamma)$ yields only one predicted $f_N(48)$. Conversely, experimental values for the pair $(f_N(24), f_N(48))$ allow to retrieve the corresponding γ theoretical value. As an example, the value corresponding to the arbitrary value $f_N^* = 0.62$ was retrieved numerically using **Equation 31**. We found $\gamma^* = 0.362$, yielding $\alpha_{pp} = 0.681$ and $\alpha_{nn} = 0.319$. Confidence interval upon the distributions of fates can also be drawn using the experimental noise about $f_N(48)$, as illustrated here considering $f_N^* \pm 2.5\%$.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.028>

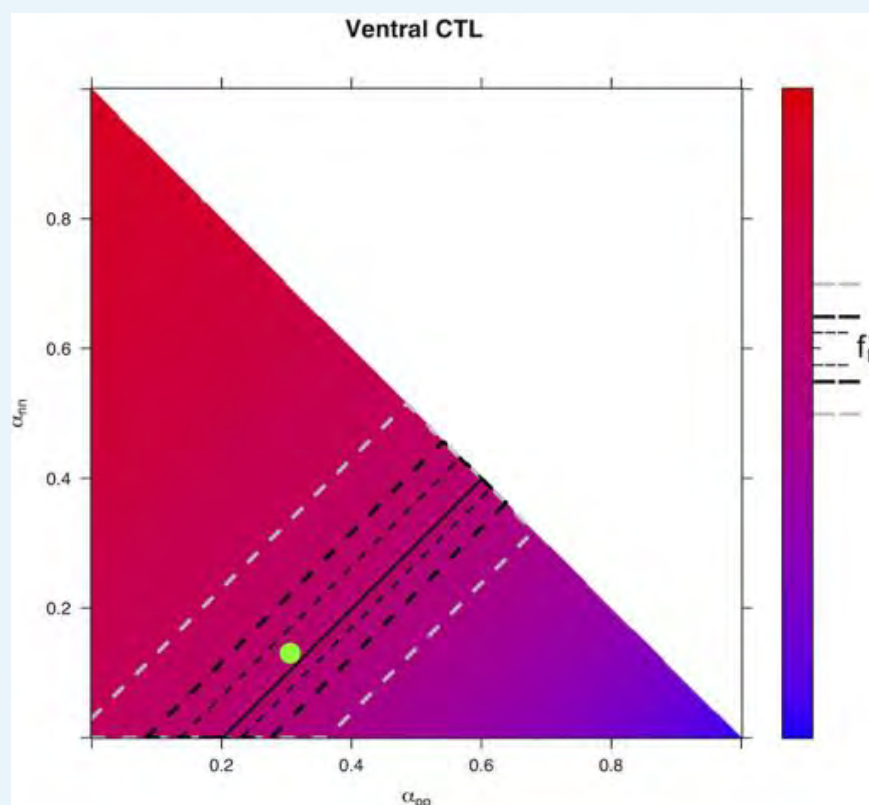
Now considering the full system with the three kinds of division, there is more than one unique triplet $(\alpha_{pp}, \alpha_{pn}, \alpha_{nn})$ that is compatible with the unique value of observed $(f_N(24), f_N(48))$. For instance, less nn-divisions can be compensated for by more pn-divisions, yielding the same $f_N(48)$.

We used the model in the same spirit as in **Appendix 4—figure 1** to compute the predicted values for $f_N(48)$ for all possible fate triplets. For the system with symmetric-only divisions above, the space of parameters for division is one-dimensional: γ corresponds to one value of α_{pp} , which constrains in turn the value of α_{nn} . With the three kinds of division, this space of parameters becomes two-dimensional: we need to fix α_{pp} and α_{nn} , and α_{pn} is then constrained. Hence the predictions should be drawn over a two-dimensional map.

We compute those maps for each experimental condition, starting from the corresponding observed value $f_N(24)$ (fixing the observed initial condition corresponds here to drawing only the bold curve in **Appendix 4—figure 1**). Then, we determine numerically the subset of fate triplets compatible with the $f_N(48) = f_N^*$ measured in the condition. We also determined

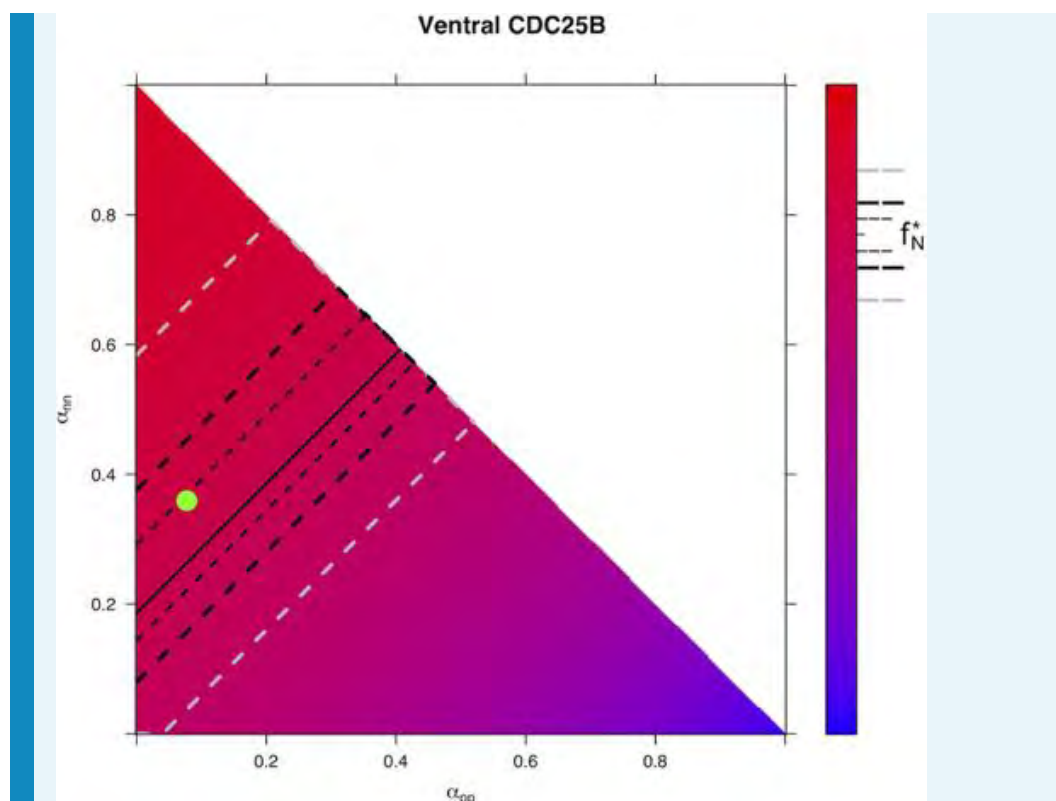
numerically the confidence regions for the distributions of fates that can yield $f_N^* \pm 2.5\%$, $f_N^* \pm 5\%$ and $f_N^* \pm 10\%$.

In the end, we also report the distribution of fates that was actually measured in each condition, and check in which confidence interval it is (Ventral zone: **Appendix 4—figure 2**, **Appendix 4—figure 3**, **Appendix 4—figure 4**, Dorsal zone: **Appendix 4—figure 5**, **Appendix 4—figure 6**, **Appendix 4—figure 7**).



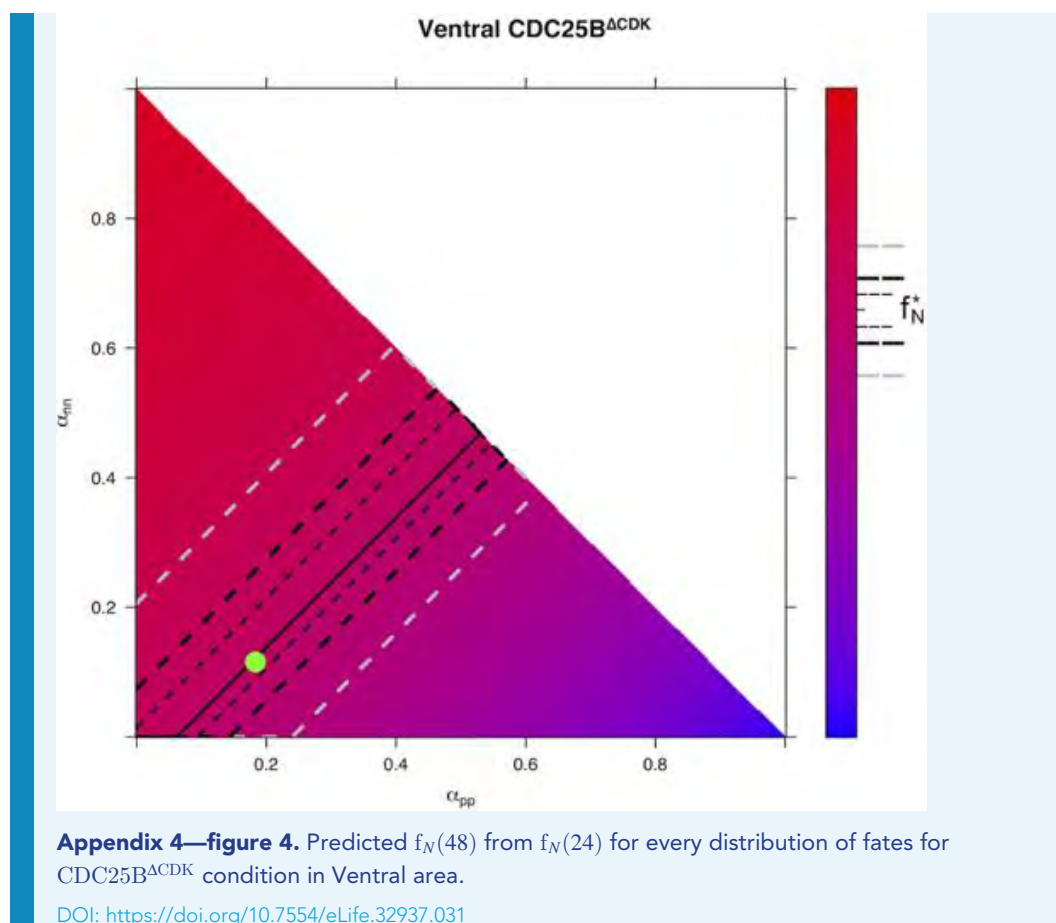
Appendix 4—figure 2. Predicted $f_N(48)$ from $f_N(24)$ for every distribution of fates for control condition in Ventral area. The color scale indicates $f_N(48)$. It is computed from the model, starting from the experimental value of $f_N(24)$ in the prevailing condition, and using all possible distributions of fates α_{pp} (x-axis), α_{nn} (y-axis) and $\alpha_{pn} = 1 - \alpha_{pn} - \alpha_{nn}$. The upper side of the triangle corresponds to $\alpha_{pn} = 0$. Confidence interval upon the predicted distributions of fates are drawn for the experimental value $f_N(48) = f_N^*$. Plain line: all distributions of fates giving exactly f_N^* . Region delimited by thin dotted line: all distributions of fates compatible with $f_N^* \pm 2.5\%$, thick dotted line : $f_N^* \pm 5\%$, gray dotted line: $f_N^* \pm 10\%$. Green dot: observed distribution of fates.

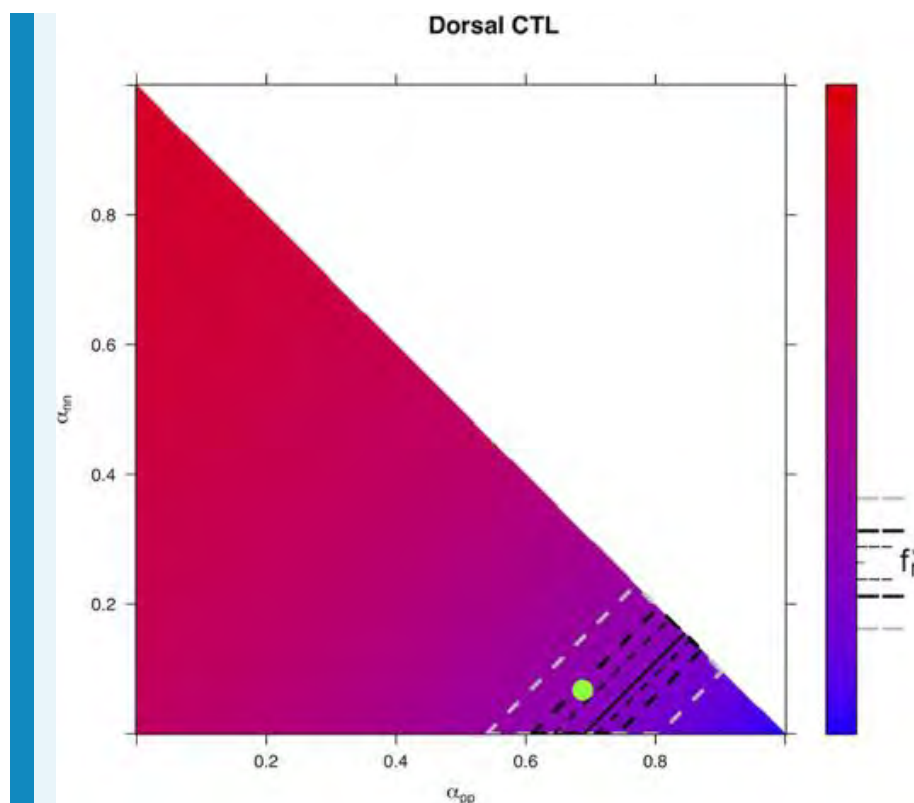
DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.029>



Appendix 4—figure 3. Predicted $f_N(48)$ from $f_N(24)$ for every distribution of fates for CDC25B condition in Ventral area.

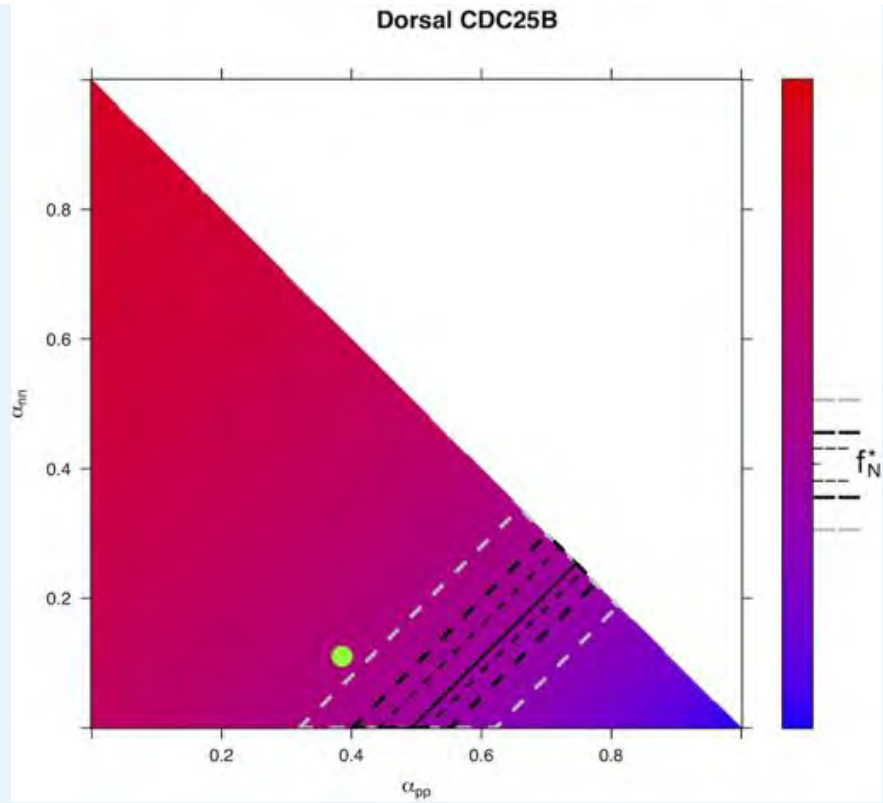
DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.030>





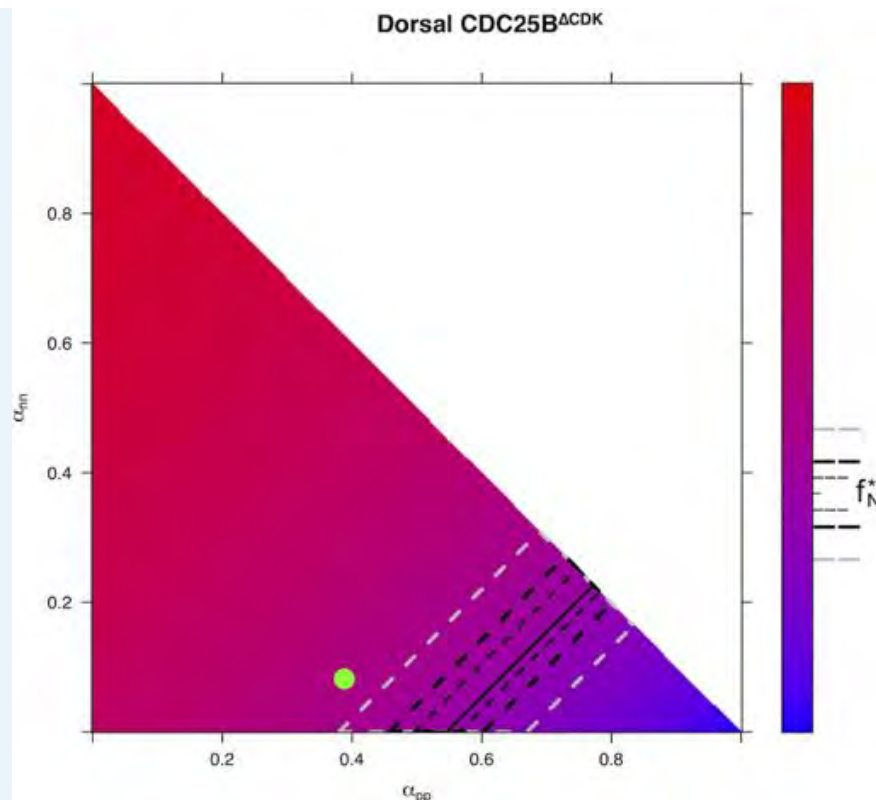
Appendix 4—figure 5. Predicted $f_N(48)$ from $f_N(24)$ for every distribution of fates for control condition in Dorsal area.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.032>



Appendix 4—figure 6. Predicted $f_N(48)$ from $f_N(24)$ for every distribution of fates for CDC25B condition in Dorsal area.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.033>



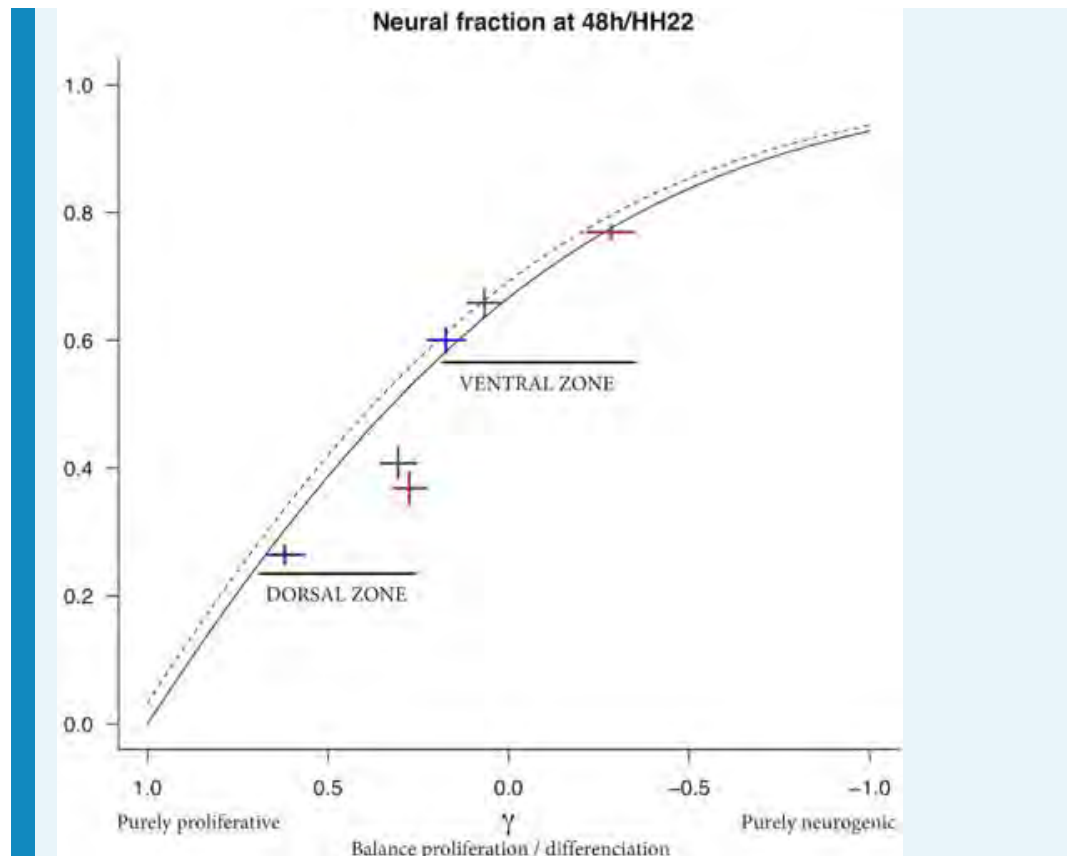
Appendix 4—figure 7. Predicted $f_N(48)$ from $f_N(24)$ for every distribution of fates for $CDC25B^{ACDK}$ condition in Dorsal area.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.034>

Predicted fraction of neurons at 48 hr knowing the fractions of neurons and the fate distribution at 24 hr

To compute the predicted fractions of neurons at 48 hr (after electroporation) reported in the main text (**Figure 6C**), we used **Equation 31**, parametrized by the data obtained for the averaged fraction of neurons at 24 hr (a.e.), the fate distribution at 24 hr (a.e.), and the cell cycle 12 hr.

All predictions are gathered in **Appendix 4—figure 8** as a function of the change in the proliferation/differentiation balance of the progenitors, induced by the $CDC25B$ and the $CDC25B^{ACDK}$ experiments. Together, the observations indicate that $CDC25B$ and $CDC25B^{ACDK}$ result in an increased proportion of neurons 48 hr a.e. (HH22).



Appendix 4—figure 8. Predicted $f_N(48)$ from $f_N(24)$ varying the balance proliferation/differentiation γ . Plain line reports the model prediction for the dorsal zone, dotted line the model prediction for the ventral zone (predictions differ due to differences in the initial fraction $f_N(24)$ in the two zones). The experimental data are reported by crosses (cross arm lengths are 95% CI). Blue cross: CTL, red cross: CDC25B, green cross: CDC25B^{ACDK}.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.035>

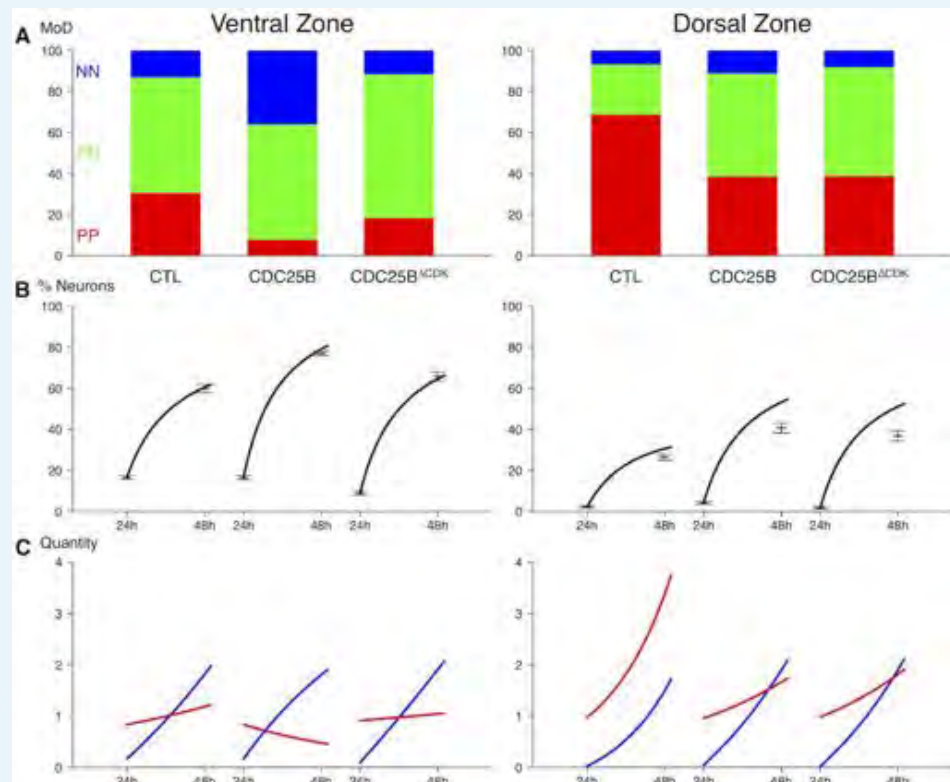
Such an increased proportion of neurons is actually compatible with two dynamical scenarios regarding how the absolute amounts of the two pools (progenitors, neurons) are modified by CDC25B gain-of-function: scenario (1) a speed-up of the neuron pool so that it increases faster under the gain-of-function at the expense of the progenitor pool expansion, or scenario (2) a decrease of the progenitor pool while the pool of neurons keeps the same expansion rate. Which scenario is relevant depends on how CDC25B affects the balance γ between proliferation and differentiation.

The progenitor pool can increase only if $\gamma > 0$, which implies $\alpha_{pp} > \alpha_{nn}$. In this case, the two pools can increase (scenario 1), their respective growth rates are controlled by γ and the neurogenic effect of CDC25B gain-of-function will produce a greater absolute number of neurons in the end (at 48h/HH22). Otherwise ($\gamma < 0$, that is $\alpha_{pp} < \alpha_{nn}$), the neuron pool can increase at about the same rate, yielding the same absolute number of neurons at 48 hr/HH22, and the increased fraction of neurons reflects a depletion of the progenitor pool (scenario 2).

The model enlightens which is the most probable scenario for the dynamical impact of CDC25B manipulation, since we can compute the underlying evolution of the absolute amounts of the two pools that determines the evolution of the neuronal fraction (**Appendix 4 — figure9C**).

Under CDC25B gain-of-function in the dorsal neural tube (**Appendix 4 — figure9C-right**), the percentage of progenitors performing pp-divisions stays greater than the percentage of those performing nn-divisions ($38.6\% > 11.3\%$, $\alpha_{pp} > \alpha_{nn}$) and the balance is still positive ($\gamma = 0.386 - 0.113 = 0.273 > 0$), so the pool of progenitors still increases but at a lower rate than

the control (where $\gamma = 0.663 - 0.078 = 0.585$). The higher percentage of neurons at 48 hr/HH22 then results from an even higher absolute number of neurons (scenario 1).



Appendix 4—figure 9. Summary of the data and predictions. (A) Observed distributions of modes of divisions (MoD) for the three conditions and the two zones. (B) Predicted evolutions of the neuronal fraction from $f_N(24)$ to $f_N(48)$ given the observed distribution of fates (lines) and observed fractions at 24 hr and 48 hr. (C) Corresponding evolution in numbers of the two pools (Red: progenitors, Blue: neurons).

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.036>

By contrast, in the ventral neural tube, the balance shifts from $\gamma = 0.393 - 0.127 = 0.266$ in the control to $\gamma = 0.069 - 0.407 = -0.338$, becoming negative under CDC25B gain-of-function (scenario 2). Accordingly, the absolute number of neurons at 48 hr/HH22 is poorly affected, but the pool of progenitors declines, explaining the higher fraction of neurons (**Appendix 4 — figure9C-left**).

7.3 Article : Timing the spinal cord development with neural progenitor cells losing their proliferative capacity : a theoretical analysis, Azaïs et al. , en révision à *Neural Dev.* 2019.

SHORT REPORT

Timing the spinal cord development with neural progenitor cells losing their proliferative capacity: a theoretical analysis.

Manon Azaïs¹, Eric Agius², Stéphane Blanco³, Angie Molina², Fabienne Pituello², Jean-Marc Tregan³, Anaïs Vallet¹ and Jacques Gautrais^{1*}

*Correspondence:

jacques.gautrais@univ-tlse3.fr

¹Centre de Recherches sur la Cognition Animale (CRCA), Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse; CNRS, UPS, France
Full list of author information is available at the end of the article

Abstract

In the developing neural tube in chicken and mammals, neural stem cells proliferate and differentiate according to a stereotyped spatiotemporal pattern. Several actors have been identified in the control of this process, from tissue-scale morphogens patterning to intrinsic determinants in neural progenitor cells. In a previous study (Bonnet et al. eLife 7, 2018), we have shown that the CDC25B phosphatase promotes the transition from proliferation to differentiation by stimulating neurogenic divisions, suggesting that it acts as a maturing factor for neural progenitors. In this previous study, we set up a mathematical model linking fixed progenitor modes of division to the dynamics of progenitors and differentiated populations. Here, we extend this model over time to propose a complete dynamical picture of this process. We start from the standard paradigm that progenitors are homogeneous and can perform any type of divisions (proliferative division yielding two progenitors, asymmetric neurogenic divisions yielding one progenitor and one neuron, and terminal symmetric divisions yielding two neurons). We calibrate this model using data published by Saade et al. (Cell Reports 4, 2013) about mode of divisions and population dynamics of progenitors/neurons at different developmental stages. Next, we explore the scenarios in which progenitors population is actually split into two different pools, one of which is composed of cells that have lost the capacity to perform proliferative divisions. The scenario in which asymmetric neurogenic division would induce such a loss of proliferative capacity appears very relevant.

Keywords: CDC25B; neural tube; neural progenitors; spinal cord; proliferation; differentiation; proliferative capacity; modeling

Introduction

How can a small number of apparently initially homogeneous neural stem cells (NSCs) give rise to the tremendous diversity of differentiated neurons and glia found in the adult central nervous system (CNS) ? The long-standing paradigm just claims: by proliferating first, and then restricting the kind of cells a progenitor can produce given its situation in time and space. How the progenitors fate progression occurs in different contexts is still under scrutiny.

In *Drosophila*, NSCs are multi-potent and divide asymmetrically to generate different types of progenies in a stereotypical manner. The study of mechanisms by which a single NSC can generate a wide repertoire of neural fates in this system is in fast progress [1]. In particular, several studies have highlighted the deterministic role of a series of sequentially expressed transcription factors in the temporal specification of *Drosophila* NSCs [2], albeit further studies substantiated that they are possibly under the control of some extrinsic (especially nutritional) factors [3].

In the mammalian cerebral cortex, the diversity of neural progenies has been linked to different types of cortical progenitors [4]. Beside expressing specific transcription factors, a set of criteria allows classifying the various types of cortical progenitors, including the apical or basal location of mitosis, their cell polarity and morphological features and proliferative capacity [5].

In the developing spinal cord, morphogen gradients have been identified that induce neural progenitor cells to express specific combination of transcription factors and thereby adopt different identities based on their position along the dorsoventral axis [6, 7, 8]. This spatial patterning system ensures that different types of neurons are generated in an adequate stereotypical spatial order. The molecular players that control this spatial specification and their mode of action have been characterized [7]. However, little is known yet about how *temporal* differentiation of neural progenitor cells is orchestrated, namely what controls the timing of their transition from proliferation to differentiation at a given location [9].

Unlike cortical progenitors, spinal progenitors appear as a homogeneous population. They all divide apically and display the same morphology: an elongated shape with cytoplasmic connections to both the apical and basal surfaces. Spinal neural progenitors perform three modes of cell division: proliferative division that generates two progenitors (PP), asymmetric neurogenic division giving rise to a progenitor

and a neuron (PN), and terminal neurogenic division producing two neurons (NN). The temporality of the transitions among the three modes of division (hereafter MoD) is critical in the control of the temporality of differentiation. Interestingly, we identified a G2/M cell cycle regulator, the CDC25B phosphatase whose expression correlates temporally and spatially remarkably well with areas where neurogenesis occurs [10, 9]. Moreover, CDC25B induces the conversion of proliferating neural progenitor cells into differentiating neurons by promoting sequentially neurogenic divisions, PN and NN [11]. We thus propose that CDC25B acts as a maturing factor that progressively restricts the mode of division of neural progenitor cells. Following our previous study on the maturing role of CDC25B in the control of neurogenesis [11], our question here is to examine whether this maturation can be due to an accumulating number of progenitors losing their proliferative capacity.

From that point of view, we note that ventral neural progenitors in the neural tube have been already shown to display a fate switch, transiting from early motoneurons production to late oligodendroglial production, under the control of Shh induction [12]. Here, we consider the possibility that a similar kind of switch operates sooner in the same population and sustains the transition from pure proliferative divisions to neurogenic divisions.

To examine this hypothesis, we start from the model of MoD transition we have proposed in our previous paper about the instrumental role that CDC25B plays in the progression from proliferative to neurogenic divisions [11]. In the spirit of Lander et al. [13], modeling is used here as a way to gain clarity in the face of intricacy. To this end, we have first extended our model presented in [11]. This model considered MoD as stationary over the 24 hours of our experiment. We now consider their change over time in order to extend this model over the full dynamics of ventral spinal cord motoneurons production. This extension over time uses the data published by Marty's team [14] who measured the two essential components of this system at different times of spinal cord development: MoD on the one hand, and dynamics of Progenitors / Neurons (P/N) populations on the other hand.

From the modeling point of view, we point out the importance of being unequivocal about what the experimentally measured entities are in this system, and what are the conceptual entities we are thinking with. Namely, we propose below a first

model which is based on the observable entities only (MoD and P/N evolutions). We use this model to make the link between these observable entities and check how experimentally measured evolution of modes of divisions can explain the evolution of cellular populations of progenitors (P-cells) and neurons (N-cells).

Next, we explore the idea that the temporality of the transitions among the three modes of division is based on a loss of proliferative capacity in some progenitors. To implement this hypothesis, we have to define two non observable kinds of progenitors, one of which is unable to perform proliferative divisions. We identify three scenarios compatible with this hypothesis. In order to check the structural consequences of each scenario, we reconstruct for each of them what the progression of their MoD should be if we take as a constraint that they must match the observable ones, and concurrently produce the correct evolution of P/N cells.

In the end, we advocate that one scenario is of great relevance: the hypothesis that asymmetric neurogenic division would induce the loss of proliferative capacity in the self-renewed progenitor. We offer a speculative additional component to the model so that robustness against small perturbations is secured. We discuss our findings compared to the model proposed by Marty's team to explain their own data [14]. We finally suggest that lineage tracing may now be the best experimental avenue to go further in the understanding of how the progression from proliferative to neurogenic divisions is timed.

Results

Minimal Model for the Dynamics with three Modes of Division

We start from the model with fixed MoD proportions we designed in Bonnet et al. [11], incorporating here the possibility for the MoD to evolve with time. We consider a population of cells at time t , some of which are proliferating progenitors $P(t)$, and others are differentiated neurons $N(t)$. The dividing progenitors can undergo three kinds of division, yielding:

- symmetric proliferative divisions ending with two progenitors (pp-divisions)
- asymmetric self-renewing divisions ending with one progenitor and one neuron (pn-divisions)
- symmetric consumptive neurogenic divisions ending with two neurons (nn-divisions)

Let us denote :

η the rate at which P-cells undergo divisions (in fraction of the P-pool per unit time)

$\alpha_{pp}(t)$ the fraction of dividing cells undergoing pp-divisions

$\alpha_{pn}(t)$ the fraction of dividing cells undergoing pn-divisions

$\alpha_{nn}(t)$ the fraction of dividing cells undergoing nn-divisions

The fractions of pp-, pn- and nn-divisions can evolve with time, under the constraint that $\alpha_{pp}(t) + \alpha_{pn}(t) + \alpha_{nn}(t) = 1$.

The time derivative $\dot{P}(t)$ of pool $P(t)$ (resp. $\dot{N}(t)$) is then given by the balance equation at time t , reading:

$$\begin{cases} \dot{P}(t) = -\eta(t)P(t) & +2\alpha_{pp}(t)\eta(t)P(t) + 1\alpha_{pn}(t)\eta(t)P(t) \\ \dot{N}(t) = & +2\alpha_{nn}(t)\eta(t)P(t) + 1\alpha_{pn}(t)\eta(t)P(t) \end{cases} \quad (1)$$

where in the first equation :

- $-\eta(t)P(t)$ quantifies the rate at which P-cells disappear from the pool $P(t)$ because they divide. The quantity of disappearing P-cells between t and $t+dt$ is then $\eta(t)P(t)dt$
- $\alpha_{pp}(t)\eta(t)P(t)$ quantifies the fraction of this quantity that undergoes a pp-division ; it doubles to yield 2 P and adds up to the pool $P(t)$ (hence the factor 2)
- $\alpha_{pn}(t)\eta(t)P(t)$ quantifies the fraction of this quantity that undergoes a pn-division ; it doubles to yield 1 P and 1 N, so only half (the P part) adds up to the pool $P(t)$ (hence the factor 1)

Correspondingly in the second equation :

- $\alpha_{nn}(t)\eta(t)P(t)$ quantifies the fraction of this quantity that undergoes a nn-division ; it doubles to yield 2 N and adds up to the pool $N(t)$ (hence the factor 2)
- $\alpha_{pn}(t)\eta(t)P(t)$ is the fraction of this quantity that undergoes a pn-division ; it doubles to yield 1 P and 1 N and only half (the N part) adds up to the pool $N(t)$ (hence the factor 1)

System (1) is a textbook continuous-time representation of population dynamics.

It is a very good approximation of the evolution of progenitors and neurons, con-

sidering that division events are instantaneous (M-phase is very short compared to the cell cycle duration), and occur uniformly in time (asynchronously) [11].

Since $\alpha_{pp} + \alpha_{pn} + \alpha_{nn} = 1$, system (1) can be rewritten:

$$\begin{cases} \dot{P}(t) &= (\alpha_{pp}(t) - \alpha_{nn}(t))\eta P(t) \\ \dot{N}(t) &= (1 - (\alpha_{pp}(t) + \alpha_{nn}(t)))\eta P(t) \end{cases} \quad (2)$$

so that the general form of the solution for the evolution of the pools is given by:

$$\begin{cases} P(t) = P(0) \exp \left[\int_0^t (\alpha_{pp}(\tau) - \alpha_{nn}(\tau))\eta(\tau) d\tau \right] \\ N(t) = N(0) + \int_0^t (1 - (\alpha_{pp}(\tau) + \alpha_{nn}(\tau)))\eta(\tau) P(\tau) d\tau \end{cases} \quad (3)$$

Starting from an initial configuration, $P(0) = 1, N(0) = 0$ at time t_0 and considering a steady rate $\eta(t) = \eta$, the system evolution will be only driven by the two functions $\alpha_{pp}(t)$ and $\alpha_{nn}(t)$.

Calibration from data for the embryonic spinal cord

In the embryonic spinal cord, pp-divisions are largely dominant at the beginning of the process so that proliferation increases the pool of progenitors for a while, but their proportion decreases with time so that the process ends with terminal neurogenic divisions.

Estimations of MoD were collected by Saade et al.[14] at discrete times (Fig. 1a), as well as the corresponding evolutions of the pools of progenitors and neurons (Fig. 1b). We used these MoD data to calibrate the two continuous time functions $\alpha_{pp}(t)$ and $\alpha_{nn}(t)$, with $\alpha_{pn}(t)$ being constrained to be their complement to 1 (Fig. 1a).

From a minimalistic approach, we constrain the shape of the two functions with a minimal set of parameters. The pp-divisions display an evolution from $\alpha_{pp}(t_0) = 1$ down to $\alpha_{pp}(t \rightarrow \infty) = 0$. This transition will be characterized by a characteristic

time τ_{pp} , with $\alpha_{pp}(\tau_{pp}) = 0.5$, and a characteristic scale σ_{pp} indicating the sharpness of transition. A standard form for this is:

$$\alpha_{pp}(t) = \frac{1}{2} \left[1 - \tanh \left(\frac{t - \tau_{pp}}{\sigma_{pp}} \right) \right] \quad (4)$$

Least-square error estimation of the two parameters yields: $\tau_{pp} = 67.0$ hpf and $\sigma_{pp} = 8.0$ hpf. The adjusted profile fits rather well the data (sq. error = 0.007).

We fit the same kind of tanh profile for the evolution of nn-divisions from $\alpha_{nn}(t_0) = 0$ to $\alpha_{nn}(t \rightarrow \infty)$, following:

$$\alpha_{nn}(t) = \frac{1}{2} \alpha_{nn}(t \rightarrow \infty) \left[1 + \tanh \left(\frac{t - \tau_{nn}}{\sigma_{nn}} \right) \right] \quad (5)$$

We lack the data to fit exactly the plateau value and we set the reasonable value $\alpha_{nn}(t \rightarrow \infty) = 0.8$. Least-square error estimation of the two parameters yields: $\tau_{nn} = 79.3$ hpf and $\sigma_{nn} = 14.5$ hpf (sq. error = 0.03).

With these profiles for $\alpha_{pp}(t)$ and $\alpha_{nn}(t)$, the evolution of the P-pool evolves according to (details in Methods Eq 18):

$$\frac{P(t)}{P(0)} = \exp \left[\frac{\eta}{2} \left(\begin{array}{c} \left[t - \sigma_{pp} \ln \left(\frac{\cosh((t - \tau_{pp})/\sigma_{pp})}{\cosh(-\tau_{pp}/\sigma_{pp})} \right) \right] \\ -\alpha_{nn,\infty} \left[t + \sigma_{nn} \ln \left(\frac{\cosh((t - \tau_{nn})/\sigma_{nn})}{\cosh(-\tau_{nn}/\sigma_{nn})} \right) \right] \end{array} \right) \right] \quad (6)$$

Setting $P(0) = 1, N(0) = 0$ at time $t_0 = 44$ hpf and $\eta = 1/12$ hours [15, 11], this system yields a good account of the evolution of P,N pools as measured by Saade et al.[14] (Fig. 1b, original data were rescaled to correspond to the number of cells per progenitor originally present). At the beginning, the large bias towards pp-divisions amplifies the pool of progenitors up to a maximum value: $P_{max}[CTL] = 5$ per initial progenitor at around $t_{maxp}[CTL] = 72$ hpf. Then, the production of neurons raises mainly due to pn-divisions, until nn-divisions become dominant over pn-divisions (at around 82-83 hpf). The pool of progenitors depletes to zero while nn-divisions

increase the pool of neurons up to a plateau value of $N(t \rightarrow \infty)[CTL] = 17.6$ neurons per progenitor initially present. We note that this evolution, and especially $N(t \rightarrow \infty)$ is highly sensitive to the chosen initial condition $(t_0, P(t_0))$. This point is addressed below.

Incorporating CDC25B experiments

Bonnet et al.[11] have performed a series of experimental manipulations of the expression of CDC25B phosphatase in this biological system. Their experimental measures are the proportions of progenitors / neurons, and a corresponding measure of the modes of division, depending on the experimental conditions : Control (CTL), Gain of Function (CDC25B GoF) using the wild-type form of CDC25B, and Gain of Function using a CDC25B modified to be unable to interact with its known substrates CDKs (CDC25B^{ΔCDK} GoF).

Modes of division were measured by Bonnet et al.[11] at stage HH17, and fit well with the MoDs measured by Saade et al.[14] at time 72 hpf (Fig 1-a, circle dots). However, to make the correspondence between P/N fractions reported in Bonnet et al.[11] and the P/N evolution measured in Saade et al.[14], we had to consider that the former correspond respectively to times 60 hpf and 84 hpf on the time scale in Saade et al.[14] (i.e. 12 h before and after 72 hpf, keeping the correct interval of 24h in between).

To check the power of this simple model, we now explore the hypothesis that CDC25B GoF has only an effect upon the schedule of MoD transitions. We expect that GoF should trigger differentiation sooner in time, and indeed, the measured MoD in the GoF experiment can be fitted by shifting the three time profiles 8 hours sooner (Fig 1-c). Interestingly, at time 72 hpf, this strongly affects α_{pp} and α_{nn} but leaves α_{pn} unchanged.

The corresponding evolutions of the pools P/N are strongly affected, since the progenitors lack time to proliferate, reaching now a maximum of $P_{max}[GoF] = 2.6$ per initial progenitor at around $t_{maxp}[GoF] = 64$ hpf (Fig 1-d). As a consequence, the pool of neurons increases sooner, but reaches a plateau value nearly half of that of the CTL condition, $N(t \rightarrow \infty)[GoF] = 9.2$ neurons per initial progenitor. The proportions P/N measured by Bonnet et al.[11] fit well with this picture.

The case of $\text{CDC25B}^{\Delta\text{CDK}}$ GoF yields a different prediction. Here, the pp-divisions had to be advanced by 2 hours while the nn-divisions had to be delayed by 4 hours to correspond to the ones measured by Bonnet et al.[11] (fig. 1e). As a result, the main effect of $\text{CDC25B}^{\Delta\text{CDK}}$ GoF is to greatly promote pn-divisions, so they appear sooner and reach a higher proportion. This suggests that $\text{CDC25B}^{\Delta\text{CDK}}$ GoF promotes self-renewing neurogenic pn-divisions, but fails to promote the transition from pn-divisions to nn-divisions as does CDC25B GoF.

Here again, the predicted dynamics of the two pools fit well the proportions P/N measured by Bonnet et al.[11] (fig. 1f). Remarkably, since the pn-divisions are neutral to the balance proliferation / differentiation, these dynamics are almost identical to the CTL case. We note that the effect of $\text{CDC25B-}\Delta\text{CDK}$ could not be detected by measuring only the P/N pools evolution.

Altogether, the model given by the system 1 (PN model) expresses the dynamics at the population scale, yielding the evolution of the two kinds of cells: the pool of progenitors, and the pool of neurons. Being formulated at the population scale, the variables and the parameters represent averages over a large ensemble of cells. In the biological system, those averages can correspond to numerous scenarios at the cell level. Nonetheless, the model dynamics produced by Eqs. 3, 4, 5 should be taken as a point of reference because any scenario at the cell scale should reproduce these dynamics at the population scale. In that sense, PN model should be regarded as a way to describe a strong constraint over the set of possible cell-scale scenarios and a guide to narrow the research of mechanistic explanations. In the next section, we will use it as such in order to explore three scenarios incorporating a loss of proliferative capacity at the cell scale as a means to time the progression from proliferative to purely neurogenic divisions.

Models with loss of proliferative capacity

PN model is compatible with the simplest interpretation at the cell level: that each dividing cell is liable to stochastically produce the three possible MoD, in proportion to what is measured at the population scale. Since the data show that progenitors MoD display an irreversible vanishing of pp-divisions with time, we now explore alternative models in which we explicitly introduce loss of proliferative

capacity at the cell scale, so that more and more dividing progenitors cannot perform proliferative divisions.

This loss of proliferative capacity at the cell scale implies that the pool of progenitors is actually composed of different kinds of dividing cells. Let's consider the case with only two kinds of dividing cells, denoted G and A , where only cells of type G are able to perform proliferative divisions ($G \rightarrow (G, G)$). A -cells would be produced by non proliferative MoD of G -cells when they stochastically adopt the alternative MoD, producing daughter cells with no proliferative capacity. The total pool of dividing cells (progenitors in the model 1) becomes $P(t) = G(t) + A(t)$.

The loss of proliferative capacity in cells of type A implies that they cannot give birth to a cell of type G nor perform proliferative divisions ($A \rightarrow (A, A)$). Hence, they can only undergo asymmetric self-renewing neurogenic division $A \rightarrow (A, N)$ or symmetric consumptive neurogenic division $A \rightarrow (N, N)$.

The only choice left then is to define the pair of cells produced by non proliferative MoD of G -cells. The only four possibilities are:

- 1 $G \rightarrow (G, A)$: asymmetric non-neurogenic division

One cell keeps proliferative capacity (keeps type G) and one cell loses it (becomes type A).

- 2 $G \rightarrow (A, A)$: symmetric non-neurogenic division

The two daughter cells lose proliferative capacity but keep self-renewing capacity (both become type A).

- 3 $G \rightarrow (A, N)$: asymmetric neurogenic division

Both cells lose proliferative capacity, with one cell keeping self-renewing capacity (becomes type A) and the other cell will become a neuron.

- 4 $G \rightarrow (N, N)$: symmetric neurogenic division

The two cells will become neurons, with no proliferative nor self-renewing capacity.

Using the nomenclature established in [5], the types and effects of those MoD are summarized in Table 1.

We note that the fourth possibility would correspond to PN model (since no cell of type A would even be produced), but with such parameters that no asymmetric di-

vision would appear at all. We discard it in the spinal cord context since asymmetric divisions are observed. We examine below the three other scenarios, naming them after the specific non-proliferative MoD of the G-cells: GGA-model, GAA-model and GAN-model.

MoD	Type	Effect	Present in model
$G \rightarrow (G, G)$	Symmetric proliferative	Proliferative	GGA, GAA, GAN
$G \rightarrow (G, A)$	Asymmetric self-renewing	Proliferative	GGA
$G \rightarrow (A, A)$	Symmetric consumptive	Proliferative	GAA
$G \rightarrow (A, N)$	Asymmetric consumptive	Neurogenic	GAN
$G \rightarrow (N, N)$	Symmetric consumptive	Neurogenic	PN
$A \rightarrow (A, N)$	Asymmetric self-renewing	Neurogenic	GGA, GAA, GAN
$A \rightarrow (N, N)$	Symmetric consumptive	Neurogenic	GGA, GAA, GAN

Table 1 Description of the MoD in the three models with loss of proliferative capacity. In symmetric divisions, the two daughter cells display the same identity. In asymmetric divisions, the two daughter cells have different identities. In self-renewing divisions, one of the daughter cells has the same identity as the mother cell. In consumptive divisions, the two daughter cells differ in identity from the mother cell. In neurogenic divisions, at least one daughter cell is a neuron.

Structural flaw of GGA model

Under the GGA model, the MoD are : $G \rightarrow (G, G)$ and $G \rightarrow (G, A)$ for the G-cells. They can then perform either proliferative divisions or self-renewing divisions. As a consequence, this model cannot structurally account for the decreasing of the P-pool after 73 hpf. Even if their MoDs evolve from proliferative in the beginning to self-renewing in the end, the early proliferation would lead to a given amount of G-cells that could not decrease later and the G-pool would stabilize. When stabilized, it would continuously produce A-cells at a constant rate by self-renewing division. Since these A-cells would in turn differentiate into neurons, that would produce a population of neurons growing to infinite: the structure of the model would trap the dynamics in a perpetual regime of permanent production of neurons. This model is then to be rejected because of its structure. Incidentally, we note that this rejection based on the structure of the model is an indication that not *any* model with loss of proliferative capacity could fit the observed dynamics.

Predictions of GAN model

Writing explicitly the balance of evolution, the dynamics of GAN model obeys:

$$\left\{ \begin{array}{l} \dot{G}(t) = \eta [-G(t) + 2\alpha_{GGG}(t)G(t)] \\ \dot{A}(t) = \eta [-A(t) + \alpha_{GAN}(t)G(t) + \alpha_{AAN}(t)A(t)] \\ \dot{N}(t) = \eta [\alpha_{GAN}(t)G(t) + 2\alpha_{ANN}(t)A(t) + \alpha_{AAN}(t)A(t)] \\ \alpha_{GGG}(t) + \alpha_{GAN}(t) = 1 ; \alpha_{AAN}(t) + \alpha_{ANN}(t) = 1 \end{array} \right. \quad (7)$$

Let's denote $\gamma_G(t) = \alpha_{GAN}(t)$ and $\gamma_A(t) = \alpha_{ANN}(t)$.

Using the fourth line of system (7), system (7) simplifies to (omitting time dependencies for clarity):

$$\left\{ \begin{array}{l} \dot{G} = \eta (1 - 2\gamma_G) G \\ \dot{A} = \eta (\gamma_G G - \gamma_A A) \\ \dot{N} = \eta (\gamma_G G + (1 + \gamma_A) A) \end{array} \right. \quad (8)$$

showing that the evolution is fully determined by $\gamma_G(t)$ and $\gamma_A(t)$. To calibrate these two time-continuous functions, we will use the evolutions of MoD in the PN model for the three conditions (CTL, CDC25B GoF, CDC25B^{ΔCDK} GoF).

For this, we establish the correspondence between GAN model variables and PN model variables :

$$\left\{ \begin{array}{l} P(t) = G(t) + A(t) \\ \alpha_{pp}(t) = (1 - \gamma_G(t)) \frac{G(t)}{G(t) + A(t)} \\ \alpha_{pn}(t) = \gamma_G(t) \frac{G(t)}{G(t) + A(t)} + (1 - \gamma_A(t)) \frac{A(t)}{G(t) + A(t)} \\ \alpha_{nn}(t) = \gamma_A(t) \frac{A(t)}{G(t) + A(t)} \end{array} \right. \quad (9)$$

To establish this correspondence, we have considered that the observable $\alpha_{\bullet\bullet}(t)$ functions express the proportions of each MoD among a total number of divisions. They can be regarded as a probability that a given division is of a given kind of MoD. Hence, to reconstruct a given observable MoD, we have to multiply the probability that the corresponding kind of progenitor would adopt this MoD by the proportion of this kind of progenitors among the total number of progenitors. For instance, the probability observing a pp-division, $\alpha_{pp}(t)$ (the observable proportion of proliferative divisions), is the probability that a given progenitor is of type G (namely $G(t)/(G(t) + A(t))$) times the probability that this progenitor performs an $G \rightarrow (G, G)$ division ($\alpha_{GGG}(t) = 1 - \gamma_G(t)$). We proceed this way for the three kinds of observable MoD, considering that the observed asymmetric divisions α_{pn} aggregate the asymmetric divisions $G \rightarrow (A, N)$ by the G pool and asymmetric divisions $A \rightarrow (A, N)$ by the A pool.

As shown in Methods, analytical inversion of the evolution of γ_G can be matched very well by a tanh ansatz, so we used the same function for the evolution of γ_A . To calibrate $\gamma_G(t)$ and $\gamma_A(t)$, we used the continuous time functions fitting the MoD in PN model to fit the two parameters of this ansatz by a least-square error procedure (full details are given in Methods [GAN calibration](#)).

The fitted parameters are reported in table 2, and the corresponding predictions for the evolutions of cells population are given in Fig. 2.

Table 2 Parameters found for the GAN model (in hpf).

	CTL	CDC25B GoF	CDC25B ^{ΔCDK} GoF
τ_G	68.1	60.1	66.3
τ_A	65.4	57.6	76.4
σ_G	8.7	8.7	8.7
σ_A	8.6	8.6	10.7

In the CTL case, we found a remarkable convergence of the MoD evolutions for G -cells and A -cells and we recover a perfect prediction for the evolution of $P(t)$ and $N(t)$ populations.

The typical time of MoD progression is 68hpf for the G -cells and 65.5hpf for the A -cells, and their progression rates are practically identical. In the beginning, the G -pool is mainly proliferating, while $G \rightarrow (G, G)$ is dominant over $G \rightarrow (A, N)$, for about 20 hours (Fig. 2a, green, $\gamma_G(t) < 0.5$ before 68 hpf). This yields a growth of the G pool up to a peak at 4.5 G -cells (per initial G -cells) at 68 hpf (Fig. 2b, green). They represent 88% of P -cells at that time. After that peak, G -cells slowly decreases while populating A and N cells through $G \rightarrow (A, N)$ divisions. From that time, A -cells are produced up to a peak from which terminal neurogenic divisions $A \rightarrow (N, N)$ become dominant so the A -pool decreases and neural production ends, with about 20 neurons per initial progenitor.

We note that the MoD of A -cells are already very skewed in favor of $A \rightarrow (N, N)$ at the time they become to be produced by $G \rightarrow (A, N)$ divisions (Fig. 2a, blue, $\gamma_A(t) > 0.65$ after 68 hpf). Hence, most A -cells are consumed by terminal divisions as soon as they are produced. Seeing this, we checked an even simpler scenario with only three modes of division: $G \rightarrow (G, G)$, $G \rightarrow (A, N)$, $A \rightarrow (N, N)$ so a progenitor issued from an asymmetric division (A -cells) would always differentiate into two neurons at the next cycle. This yields practically the same results (Fig. S1).

In the CDC25B GoF case, the 8-hours advanced evolution of the MoD in PN model directly translates into an equivalent and parallel 8-hours advanced evolution for G and A MoD, which is not surprising given the calibration method.

Contrastingly, the evolution of these MoD differs in the case of CDC25B^{ΔCDK} GoF. As expected, the small advanced α_{pp} profile little affects the progression of G -cells MoD. However, the 4-hours delayed α_{nn} profile translates into a threefold larger delay for the A -cells MoD, namely they are shifted 11-hours later than in

the CTL condition (76.4 hpf vs 65.4 hpf). As a consequence, the $A \rightarrow (A, N)$ MoD becomes operative since it is still around 0.5 when A -cells reach their peak. In the end, the production of neurons is very similar to the CTL value.

Overall, this structure for introducing a type of cells with no more proliferative capacity appears perfectly compatible with the available data. Under this model, the evolutions of the MoD have two striking features: they show a monotone progression, and they are very similar to each other, opening the possibility that they could be under the control of a same regulation process (see below).

Predictions of GAA model

The dynamics of this model obey:

$$\left\{ \begin{array}{l} \dot{G}(t) = \eta [-G(t) + 2\alpha_{GGG}(t)G(t)] \\ \dot{A}(t) = \eta [-A(t) + 2\alpha_{GAA}(t)G(t) + \alpha_{AAN}(t)A(t)] \\ \dot{N}(t) = \eta [2\alpha_{ANN}(t)A(t) + \alpha_{AAN}(t)A(t)] \\ \alpha_{GGG}(t) + \alpha_{GAA}(t) = 1 ; \alpha_{AAN}(t) + \alpha_{ANN}(t) = 1 \end{array} \right. \quad (10)$$

Denoting $\gamma_G(t) = \alpha_{GAA}(t)$ and $\gamma_A(t) = \alpha_{ANN}(t)$, system (10) simplifies to:

$$\left\{ \begin{array}{l} \dot{G} = \eta (1 - 2\gamma_G) G \\ \dot{A} = \eta (2\gamma_G G - \gamma_A A) \\ \dot{N} = \eta (1 + \gamma_A) A \end{array} \right. \quad (11)$$

The correspondences between GAA scenario variables and the variables in PN model are:

$$\left\{ \begin{array}{l} \alpha_{pp}(t) = (1 - \gamma_G(t)) \frac{G(t)}{G(t) + A(t)} + \gamma_G(t) \frac{G(t)}{G(t) + A(t)} \\ \alpha_{pn}(t) = (1 - \gamma_A(t)) \frac{A(t)}{G(t) + A(t)} \\ \alpha_{nn}(t) = \gamma_A(t) \frac{A(t)}{G(t) + A(t)} \\ P(t) = G(t) + A(t) \end{array} \right. \quad (12)$$

We used MoD fitted in PN model to calibrate the two MoD functions $\gamma_G(t)$ and $\gamma_A(t)$ the same way as we did for GAN model (full details in Methods [GAA calibration](#)). The fitted parameters are given in table 3 and the predicted evolutions are given in Fig. 3.

Table 3 Parameters found for the GAA model (in hpf).

	CTL	CDC25B GoF	CDC25B ^{ΔCDK} GoF
τ_G	59.8	51.9	58.1
τ_A	78.9	69.4	87.2
σ_G	3.4	3.2	3.4
σ_A	41.5	48.6	33.8

Under CTL condition, we observe an abrupt and early switch of the G -cells MoD, from dominant $G \rightarrow (G, G)$ MoD before 60 hpf to dominant $G \rightarrow (A, A)$ MoD after 60 hpf (Fig. 3a, green). As a consequence, the P-pool is made of only G -cells up to that time (Fig. 3b, black and green curves). After that proliferative burst, G -cells mainly differentiate into A -cells, and the former become dominant in the system (Fig. 3b, blue curve). Contrastingly, the MoD of A -cells evolves smoothly (Fig. 3a, blue) and the characteristic time of their switch is as late as 79 hpf. This leaves time for A -cells to produce neurons by self-renewing divisions $A \rightarrow (A, N)$ and to compensate for the early stopping of proliferative divisions by G -cells. After 79 hpf, A -cells engage more and more in terminal differentiation until their extinction.

The evolutions of $P = G + A$ and N pools produced by these calibrated MoD match very well the measured ones (Fig. 3b, black and red curves).

In CDC25B GoF condition, the 8-hours advance of MoD in PN model is directly reflected in the MoD for the G -cells (Fig. 3c). This is expected given the calibration procedure, and this is true also for the progression of the MoD for the A -cell, although their slopes are further smoothened. This results into P/N evolutions under GoF condition that match the profiles under PN model (Fig. 3d).

In CDC25B^{ΔCDK} GoF condition, the switch of MoD for the G -cells happens slightly sooner than in CTL condition (Fig. 3d, green), so that the total number of A cells produced by $G \rightarrow (A, A)$ is a bit lower (and hence so are $P = G + A$ cells). On the contrary, the switch of MoD for the A -cells are delayed by about 5 hours (Fig. 3e, blue). This is consistent with the observation that pn-divisions in PN model are favored under CDC25B^{ΔCDK} GoF condition where they operate for a longer time than in the CTL condition. Eventually, A -cells are fewer but self-renew longer and yield the same number of neurons as in CTL condition in the end.

Overall, this structure for introducing a type of cells with no more proliferative capacity also appears compatible with the available data for the P/N evolutions. We note however that the MoD profiles obtained by analytical inversion do not fit the MoD fitted to the ansatz (details in Methods [GAA calibration](#)).

Models comparison

Since the three models PN, GAA and GAN can be fitted to correctly predict the evolutions of P/N populations, they can only be discriminated by their capacity to reflect the measured evolutions of observable MoD, namely to account for both MoD and P/N evolutions at the same time. Importantly, we note that the three models do not differ in degrees of freedom, since they all have four parameters (two parameters per tanh function), so differences are only attributable to the difference in their structures. In Fig. 4, we report the reconstruction of observable MoD from the hidden MoD in the GAN and GAA models, along with the MoD directly fitted at the PN level. Visual inspection is sufficient to prefer GAN model over GAA model.

GAN and PN models however differ only slightly. We note a difference at the beginning of the process where nn-divisions rise up later in GAN model than in PN

model and seem more adequate. This difference is due to the fact that, in GAN model, nn-divisions are $A \rightarrow (N, N)$ divisions convoluted by the population of A-cells so they cannot appear before the A-pool has increased. In PN model, they can happen earlier through nn-divisions of P-cells that are present from the beginning.

Overall, if the temporality of the transition among the three modes of division should be controlled by a loss of proliferative capacity in more and more progenitors, then the structure of GAN model should be retained as the best scenario.

Securing robustness against initial conditions and perturbations

In the calibration of PN model, we have mentioned that the obtained dynamics were highly sensitive to the chosen initial condition $(t_0, P(t_0))$. This is also true for GAN model. In terms of dynamical systems theory, PN and GAN models are *non autonomous linear systems of ODE* because we have considered so far that the evolutions of MoD were decoupled from the evolutions of cells population (MoD were taken as inputs, cells production as outputs) as if MoD were controlled by an external process insensitive to the current amount of cells. In linear models, the final number of produced neurons must be proportional to $P(t_0)$, hence the sensitivity.

For the sake of completeness of our modeling proposal, we now speculate about formal refinement that could secure robustness against initial conditions or perturbations. To secure robustness, we have to introduce some feedback control so that the state of the system (the current amount of P/N or G/A/N cells) would directly affect the MoD (see e.g. [13]). For instance, the current amount of *P*-cells could favor the progression to neurogenic divisions, so that the accumulation of *P*-cells by initial proliferation would finally promote more and more nn-divisions. The current amount of *N*-cells could as well favor neurogenic divisions, so that few *N*-cells in the beginning would promote pp-divisions (proliferation) while later accumulation of *N*-cells would progressively dampen proliferation down. We have systematically explored every possible combination [16], and we present here the one that appeared as the most consistent with the data: the one in which the MoD evolutions are controlled by the total amount of cells.

In the terminology of dynamical systems, the PN model with feedback (hereafter denoted PN+fb model) becomes *autonomous non linear*, following :

$$\begin{cases} \dot{P}(t) &= (\alpha_{pp}(P, N) - \alpha_{nn}(P, N))\eta P(t) \\ \dot{N}(t) &= (1 - (\alpha_{pp}(P, N) + \alpha_{nn}(P, N)))\eta P(t) \end{cases} \quad (13)$$

To establish the form of this feedback control, we plot the MoD as a function of the total amount of cells all along the process in PN model (Fig. 5a, black curves). This suggests, here again, using tanh as an ansatz and the control takes the form:

$$\begin{cases} \alpha_{pp}(P, N) = \frac{1}{2} \left[1 - \tanh \left(\frac{P + N - \kappa_{pp}}{s_{pp}} \right) \right] \\ \alpha_{nn}(P, N) = \frac{1}{2} \left[1 + \tanh \left(\frac{P + N - \kappa_{nn}}{s_{nn}} \right) \right] \end{cases} \quad (14)$$

The fitted functions are reported in Fig. 5a (red curves), with $\kappa_{pp} = 6.4$, $\kappa_{nn} = 13.2$, $s_{pp} = 3$ and $s_{nn} = 13.2$.

Using system (13) with (14), we recover the dynamics of MoD and P/N populations (Fig. 5b and c). Importantly, the MoD are now controlled by the evolution of P/N cells and are not the result of a direct fitting anymore.

Likewise, the GAN model would become:

$$\begin{cases} \dot{G} = \eta (1 - 2\gamma_G(G + A + N)) G \\ \dot{A} = \eta (\gamma_G(G + A + N)G - \gamma_A(G + A + N)A) \\ \dot{N} = \eta (\gamma_G(G + A + N)G + (1 + \gamma_A(G + A + N))A) \end{cases} \quad (15)$$

However, plotting the MoD as a function of the total amount of cells (Fig. 5d, black curves) suggests that both MoD could be driven by one and the same feedback. Denoting $\gamma \equiv \gamma_G (= \gamma_A)$, GAN+fb is finally:

$$\begin{cases} \dot{G} = \eta G (1 - 2\gamma(G + A + N)) \\ \dot{A} = \eta (G - A) \gamma(G + A + N) \\ \dot{N} = \eta [A + (G + A) \gamma(G + A + N)] \end{cases} \quad (16)$$

with

$$\gamma(G, A, N) = \frac{1}{2} \left[1 + \tanh \left(\frac{G + A + N - \kappa_{gan}}{s_{gan}} \right) \right] \quad (17)$$

The fitted function is reported in Fig. 5d (red curve), with $\kappa_{gan} = 6.9$ and $s_{gan} = 3.5$. Here again, the MoD are now controlled by the evolution of G/A/N cells and not the result of a direct fitting anymore. Using system (16) with (17), we recover the dynamics of MoD and G/A/N populations (Fig. 5e and f).

By introducing this feedback control, the dynamics would gain robustness against (reasonable) perturbations and converge to the same amount of neurons (three illustrations are given in Fig. S2). In the end, GAN model appears quite relevant as it allows to robustly account for the whole process with only two parameters κ_{gan}, s_{gan} (in addition to η) and it matches very well the data.

Discussion

Our question was to test whether the progression from proliferation to neurogenic divisions can be explained by a loss of proliferative capacity in an increasing proportion of progenitors. To this end, we have first established a general restriction-free model with progenitors able to perform any kind of division (PN model). Fitting the evolution of its MoDs (PP, PN, NN) from data published by Saade et al [14], we found smooth MoDs time-profiles that can account for the evolution of the P and N pools reported in [14]. We consider that this general model reflects Sox2 progenitors and HuC/D neurons immunostaining together with the biomarkers which allow differentiating proliferative versus neurogenic divisions [14]. We take it as a benchmark to constrain refined scenarios with heterogeneous progenitors. We note that its general structure is also compatible with a broad description of progenitors / neurons evolution in the neocortex [17, 18]. It should hold as well for other neural tube zones, such as the dorsal area where CDC25B is expressed at the peak of neuronal production [10, 11]. We characterized the behavior of this model under CDC25B GoF experiments carried out by some of us [11] and this gives support to the hypothesis that the action of this phosphatase could be to advance MoD progression, acting there as a maturation factor.

Next we have explored three model structures embedding a loss of proliferative capacity in progenitors, introducing two different progenitors population with the structural constraint that one of them cannot do proliferative divisions. For the three models compatible with this constraint, we have derived the corresponding system of evolution equations. One model (GGA) has been discarded because it could not structurally account for the observed evolutions. For the two other models (GAN, GAA), we have established the correspondence between the evolution of their MoDs and the evolution of the MoDs observed in the benchmark PN model. This correspondence was used to calibrate their parameters and compute their predictions. From these two models, only GAN model appeared to be structurally compatible with observed MoD and P/N evolutions at the same time. In this model, the MoD of *G* and *A* cells evolve at a common pace in the CTL condition, opening the possibility that both are under control of the same regulators. CDC25B GoF accelerates them the same way while CDC25B^{ΔCDK} GoF only delays MoD of *A*-cells.

We note that our modeling proposition displays an important difference with the model proposed by Saade et al. themselves [14] (see also [19]): we do not detect a strong switch of MoD at the population level. Their basic model incorporates an all-or-nothing switch at time $t^* \simeq 80$ hpf with only proliferative divisions (pp) before t^* and only neurogenic divisions (pn or nn) after t^* . This is equivalent to a loss of proliferative capacity that would apply to progenitors all at once, at time t^* . Translated in terms of GAN model, all *G*-cells would instantly become *A*-cells at time t^* , whatever their phase in cell cycle. They next extend this model to allow smoother transitions, division asynchrony, accelerating cell cycle and a *de novo* incorporation of new progenitors under the induction of Shh. Even with this smoother model, their fitting yields a sharp extinction of pp-divisions at 73 hpf (from 60% to 0% within one hour). It is difficult to determine how this finding is constrained by the initial choice in their basic model, but this predicted evolution of the MoD appears at odd with their experimental observations of MoD and can predict a meaningful evolution of the P/N populations only due to the *ad hoc* additional source that compensates for the early and sharp extinction of proliferative pp-divisions.

We observe that our model does not incorporate a source of progenitors so the structures of the models are different. We also note that the fitting procedures were not the same. Saade et al. fit the 13 free parameters of their extended model using *an error minimization algorithm with respect to the experimental data* [14] (Extended Experimental Procedures — Mathematical Modeling). As we understand this sentence, they fit the MoD profiles and the source intensity so that the predicted dynamics of the P/N populations matched as close as possible the observed evolution. We have proceeded differently: we have minimized the error between the modeled MoD evolution and the observed MoD evolution, and only then we have checked how the predicted P/N evolutions match or not the observed ones. As a consequence of our procedure, the MoD profiles in the PN and in the GAN models are by construction as close as possible to the observed MoD, and we have no freely adjustable parameters.

Importantly, both procedures have to set an initial condition (i.e. an absolute time 0 at which we fix the initial pool of progenitors), and since proliferative processes are exponential, evolutions of P/N populations are highly sensitive to that choice. We can guess that a small change (by more or less two hours) of that “time 0” in Saade et al. model would have a strong effect upon the required intensity of their additional source. Our first versions of PN and GAN models are to the same extent sensitive to the choice of “time 0”. This sensitivity to initial conditions and timing is due to the fact that these models consider the evolution of MoD as decoupled from the evolution of the populations. The crucial point here is that the relative error for experimental data is the highest at early time, because there are few progenitors then, and the developmental stage is only determinable with an error of the same extent (more or less two hours).

To gain robustness against the indetermination of “time 0”, we have incorporated an hypothetical feedback process so that the evolution of the MoD could be regulated by the state of the system at any time. In these second versions (PN+fb, GAN+fb), there is no need anymore to specify an absolute time scale for the evolution of MoD since it is paced by the evolution of the cells population. This opens new questions about the regulation of CDC25B by upstream signaling, since the maturation factor should itself be under the control of a regulator sensitive to the local amount of cells in the system (e.g. its local extension).

Finally, we advocate that our GAN models (GAN or GAN+fb) indeed incorporate a switch mechanism, but it is specified at the cell level: the switch operates when a daughter of a G-cell loses its proliferative capacity and becomes an A-cell. Considering that a A-cell loses its proliferative capacity during the M-phase of its G-parent, it would only display its new division modes (AAN, ANN) at its next M-phase. At the population scale, this cell-based MoD switching would then require at least one cell cycle time length to fully display. This is the order of time we observe in the GAN models where the MoD progression at the population level happens over one cell cycle length (12 hours). Under the hypothesis of asynchronous divisions, the smooth progression of MoD in GAN models at the population scale is then compatible with an abrupt signaling event at the cell scale.

From a modeling standpoint (where modeling is used as a way to gain clarity in the face of intricacy [13]), GAN models displays several interesting features compared to PN model. First, CDC25B GoF effect is the same for both models: it hastens MoD progression to neurogenic divisions. Secondly, CDC25B^{ΔCDK} GoF effect can be interpreted straightforwardly in GAN model: the phosphatase unable to interact with its CDK substrate just delays the progression of A-cells MoD (it maintains A-cells in self-renewing mode for a longer time). By contrast, CDC25B^{ΔCDK} GoF effect appears as compound in PN model, so it would ask for a convoluted explanation for the differential effect upon advanced pp-divisions and delayed nn-divisions. Thirdly, GAN model can be considered as simpler to interpret from a mechanistic point of view since both types of progenitors display the same monotone evolution of their MoDs. Introducing feedback control to secure some robustness, we showed that MoDs could be under the control of the same signal accumulating monotonously over time, and reflecting directly the system size. With this feedback control, GAN+fb could account for the whole dynamics with only three parameters: η which basically represents the unit time of the dynamics, and the two parameters of the feedback control: κ_{gan} determines the critical size of the total population above which neurogenic divisions become dominant, and s_{gan} determines how sharp the feedback is. In contrast, PN model would call for a specific explanation of the non monotone evolution of pn-divisions as well as an explanation of the complicated progression among MoDs (five parameters in PN+fb).

Still, the lack of clear discrimination between PN and GAN models is interesting because it shows that the two biological hypotheses (one kind of progenitors able to perform the three kinds of division versus two kinds of progenitors with a loss of proliferative capacity in one kind) can produce predictions compatible with both the MoD and populations evolutions. Since these measures are averages over population, this calls for alternative experimental strategies to support further the plausibility of GAN model. Actually, the two models yield very different predictions if we consider the distributions of content in progenitors/neurons issued from a single initial progenitors (distribution of progenitors/neurons within clones, see Methods [PN and GAN models predictions for clones contents](#) for an illustration). So, the most appealing alternative would be to collect data at the cell scale, either by performing lineage tracing or collecting data about clones contents.

Methods

Solving $P(t)$ from Eq.3

$$\begin{aligned}
 P(t) &= P(0) \exp \left[\eta \int_0^t (\alpha_{pp}(\tau) - \alpha_{nn}(\tau)) d\tau \right] \\
 &= P(0) \exp \left[\eta \int_0^t \left(\frac{1}{2} \left[1 - \tanh \left(\frac{\tau - \tau_{pp}}{\sigma_{pp}} \right) \right] \right. \right. \\
 &\quad \left. \left. - \frac{1}{2} \alpha_{nn,\infty} \left[1 + \tanh \left(\frac{\tau - \tau_{nn}}{\sigma_{nn}} \right) \right] \right) d\tau \right] \\
 &= P(0) \exp \left[\eta \left(\left(\frac{1}{2} t - \frac{\sigma_{pp}}{2} \ln \left[\frac{\cosh((t - \tau_{pp})/\sigma_{pp})}{\cosh(-\tau_{pp}/\sigma_{pp})} \right] \right) \right. \right. \\
 &\quad \left. \left. - \left(\frac{\alpha_{nn,\infty}}{2} t + \frac{\alpha_{nn,\infty} \sigma_{nn}}{2} \ln \left[\frac{\cosh((t - \tau_{nn})/\sigma_{nn})}{\cosh(-\tau_{nn}/\sigma_{nn})} \right] \right) \right) \right]
 \end{aligned} \tag{18}$$

hence :

$$\frac{P(t)}{P(0)} = \exp \left[\frac{\eta}{2} \left(\begin{array}{c} \left[t - \sigma_{pp} \ln \left(\frac{\cosh((t - \tau_{pp})/\sigma_{pp})}{\cosh(-\tau_{pp}/\sigma_{pp})} \right) \right] \\ -\alpha_{nn,\infty} \left[t + \sigma_{nn} \ln \left(\frac{\cosh((t - \tau_{nn})/\sigma_{nn})}{\cosh(-\tau_{nn}/\sigma_{nn})} \right) \right] \end{array} \right) \right] \tag{19}$$

GAN calibration

Estimating $\gamma_G(t)$ from $\alpha_{GGG}(t)$

Under the GAN model, we have at any time the structural correspondence between the two models:

$$\alpha_{GGG}(t)G(t) = \alpha_{pp}(t)P(t) \tag{20}$$

Setting $G(0) = 1$, we have an explicit solution for $G(t)$ depending on $\alpha_{GGG}(t)$ only:

$$G(t) = G(0) \exp \left[\eta \int_0^t (2\alpha_{GGG}(\tau) - 1) d\tau \right] \tag{21}$$

so we have :

$$\alpha_{GGG}(t)G(0) \exp \left[\eta \int_0^t (2\alpha_{GGG}(\tau) - 1) d\tau \right] = \alpha_{pp}(t)P(t) \tag{22}$$

We seek a direct expression for $\alpha_{GGG}(t)$ despite $\alpha_{GGG}(t)$ appears twice, with once in an integral term.

The lhs (left-hand-side) term can be rewritten:

$$\begin{aligned} & \alpha_{GGG}(t)G(0) \exp \left[\eta \int_0^t (2\alpha_{GGG}(\tau) - 1) d\tau \right] \\ &= \alpha_{GGG}(t)G(0) \exp \left[2\eta \int_0^t \alpha_{GGG}(\tau) d\tau \right] \exp[-\eta t] \end{aligned} \quad (23)$$

Plugging into Eq.22, and grouping α_{GGG} terms on the left side, we have:

$$\alpha_{GGG}(t) \exp \left[2\eta \int_0^t \alpha_{GGG}(\tau) d\tau \right] = \frac{1}{G(0)} \alpha_{pp}(t) P(t) \exp(\eta t) \quad (24)$$

The lhs can be read as a time-derivative:

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{1}{2\eta} \exp \left[2\eta \int_0^t \alpha_{GGG}(\tau) d\tau \right] \right) = \frac{1}{G(0)} \alpha_{pp}(t) P(t) \exp(\eta t) \quad (25)$$

Integrating both sides over $[0..t]$:

$$\int_0^t dt' \frac{d}{dt'} \left(\frac{1}{2\eta} \exp \left[2\eta \int_0^{t'} \alpha_{GGG}(\tau) d\tau \right] \right) = \int_0^t d\tau \frac{1}{G(0)} \alpha_{pp}(\tau) P(\tau) \exp(\eta \tau) \quad (26)$$

Solving the lhs integral:

$$\frac{1}{2\eta} \exp \left(2\eta \int_0^t \alpha_{GGG}(\tau) d\tau \right) - \frac{1}{2\eta} = \int_0^t d\tau \frac{1}{G(0)} \alpha_{pp}(\tau) P(\tau) \exp(\eta \tau) \quad (27)$$

Rearranging terms and taking the ln of both sides :

$$\int_0^t \alpha_{GGG}(\tau) d\tau = \frac{1}{2\eta} \ln \left(1 + \frac{2\eta}{G(0)} \int_0^t d\tau \alpha_{pp}(\tau) P(\tau) \exp(\eta \tau) \right) \quad (28)$$

Taking the time derivatives of both sides:

$$\begin{aligned} \alpha_{GGG}(t) &= \frac{d}{dt} \left(\frac{1}{2\eta} \ln \left(1 + \frac{2\eta}{G(0)} \int_0^t d\tau \alpha_{pp}(\tau) P(\tau) \exp(\eta \tau) \right) \right) \\ &= \frac{1}{2\eta} \frac{d}{dt} \ln \left(1 + \frac{2\eta}{G(0)} \int_0^t d\tau \alpha_{pp}(\tau) P(\tau) \exp(\eta \tau) \right) \end{aligned} \quad (29)$$

Solving the derivative in the rhs:

$$\alpha_{GGG}(t) = \frac{1}{2\eta} \frac{\frac{2\eta}{G(0)} \alpha_{pp}(t) P(t) \exp(\eta t)}{1 + \frac{2\eta}{G(0)} \int_0^t d\tau \alpha_{pp}(\tau) P(\tau) \exp(\eta \tau)} \quad (30)$$

which simplifies to:

$$\alpha_{GGG}(t) = \frac{\alpha_{pp}(t) P(t) \exp(\eta t)}{G(0) + 2\eta \int_0^t d\tau \alpha_{pp}(\tau) P(\tau) \exp(\eta \tau)} \quad (31)$$

so we can estimate $\gamma_G(t) = 1 - \alpha_{GGG}(t)$ from :

$$\gamma_G(t) = 1 - \frac{\alpha_{pp}(t) P(t) \exp(\eta t)}{G(0) + 2\eta \int_0^t d\tau \alpha_{pp}(\tau) P(\tau) \exp(\eta \tau)} \quad (32)$$

using the evolution of $\alpha_{pp}(t)$ (Eq. 4) and $P(t)$ (Eq. 6) obtained in the three experimental conditions.

The results are given in figure S2 (green curves).

We note that calibrating $\gamma_G(t)$ by this method only yields a raw unparameterized temporal series. The obtained results however strongly suggest an hyperbolic tangent shape (tanh) as an ansatz for this evolution, following:

$$\gamma'_G(t, \tau_G, \sigma_G) = \frac{1}{2} \left[1 + \tanh \left(\frac{t - \tau_G}{\sigma_G} \right) \right] \quad (33)$$

To parametrize γ'_G , we seek the pair (τ_G^*, σ_G^*) that minimizes the error between the evolution predicted by system (7) and the observed evolutions in the PN model (1). Using eq.22, we then seek to minimize the error function:

$$E(\tau_G, \sigma_G) = \int_0^T dt \left(\hat{\alpha}_{pp}(t) \hat{P}(t) - (1 - \gamma'_G(t, \tau_G, \sigma_G)) G(0) \exp \left[\eta \int_0^t (1 - 2\gamma'_G(\tau, \tau_G, \sigma_G)) d\tau \right] \right)^2 \quad (34)$$

We used Nelder-Mead optimization from R-software 'optim' using time-discretized series with $\Delta t = 0.01$ hour, $T = 96$ h.

The tanh ansatz appears to match perfectly the analytically derived time series (Fig. S2, black curves), so we parametrize γ_G with the corresponding parameters τ_G^* and σ_G^* :

$$\gamma_G(t) = \frac{1}{2} \left[1 + \tanh \left(\frac{t - \tau_G^*}{\sigma_G^*} \right) \right] \quad (35)$$

The fitted values for (τ_G^*, σ_G^*) under the three experimental conditions are given in table 2.

Estimating γ_A .

Considering the parameter for the evolution of population A , the structural correspondence is:

$$\gamma_A(t) \frac{A(t)}{G(t) + A(t)} = \alpha_{nn}(t) \quad (36)$$

Here, $A(t)$ is governed by:

$$\dot{A}(t) = \eta [\gamma_G(t)G(t) - \gamma_A(t)A(t)] \quad (37)$$

so we can not obtain an explicit solution for $A(t)$ as a function of $\gamma_A(t)$.

Hence, we proceed with the ansatz method, testing a tanh shape for $\gamma_A(t)$, following:

$$\gamma_A(t, \tau_A, \sigma_A) = \frac{1}{2} \left[1 + \tanh \left(\frac{t - \tau_A}{\sigma_A} \right) \right] \quad (38)$$

Since $\gamma_G(t)$ and $G(t)$ are known from section above, we can then use eq.37 to numerically solve the evolution of population A, once given $\gamma_A(t, \tau_A, \sigma_A)$. We denote $A(t, \tau_A, \sigma_A)$ this numerical solution.

We then seek the pair (τ_A^*, σ_A^*) that minimizes the square error:

$$E(\tau_A, \sigma_A) = \int_0^T dt \left(\alpha_{nn}(t) - \gamma_A(t, \tau_A, \sigma_A) \frac{A(t, \tau_A, \sigma_A)}{G(t) + A(t, \tau_A, \sigma_A)} \right)^2 \quad (39)$$

using Nelder-Mead optimization over time-discretized series (with $\Delta t = 0.01$ hour, $T = 96h$).

The fitted values for (τ_A^*, σ_A^*) under the three experimental conditions are given in table 2.

The tanh ansatz seems to be highly relevant since the predicted evolutions for the evolution of the P,N populations are well in accordance with the observed ones (Fig. 2).

GAA calibration

Estimating $\gamma_G(t)$ from $\alpha_{GGG}(t)$

Under GAA model, we have the structural correspondence between the two models:

$$\begin{aligned} \alpha_{pp}(t) &= (1 - \gamma_G(t)) \frac{G(t)}{G(t) + A(t)} + \gamma_G(t) \frac{G(t)}{G(t) + A(t)} \\ &= \frac{G(t)}{G(t) + A(t)} \end{aligned} \quad (40)$$

Using $P(t) = G(t) + A(t)$, we obtain:

$$G(t) = \alpha_{pp}(t) (G(t) + A(t)) = \alpha_{pp}(t) P(t) \quad (41)$$

Setting $G(0) = 1$, we have an explicit solution for $G(t)$ depending on $\gamma_G(t)$ only:

$$G(t) = G(0) \exp \left[\eta \int_0^t (2\alpha_{GGG}(\tau) - 1) d\tau \right] \quad (42)$$

so we have :

$$G(0) \exp \left[\eta \int_0^t (2\alpha_{GGG}(\tau) - 1) d\tau \right] = \alpha_{pp}(t) P(t) \quad (43)$$

We seek a direct expression for $\alpha_{GGG}(t)$.

From Eq. 43, we have:

$$\int_0^t \alpha_{GGG}(\tau) d\tau = \frac{1}{2\eta} \ln \left[\frac{1}{G(0)} \alpha_{pp}(t) P(t) \exp(\eta t) \right] \quad (44)$$

Taking the time derivatives of both sides, we obtain:

$$\alpha_{GGG}(t) = \frac{1}{2\eta} \left[\frac{\dot{\alpha}_{pp}(t)P(t) + \alpha_{pp}(t)\dot{P}(t)}{\alpha_{pp}(t)P(t)} + \eta \right] \quad (45)$$

so we can estimate $\gamma_G(t) = 1 - \alpha_{GGG}(t)$ from this expression, using the evolution of $\alpha_{pp}(t)$ (Eq. 4) and $P(t)$ (Eq. 6) obtained in the three experimental conditions, and numerical derivation for $\dot{\alpha}_{pp}(t)$ and $\dot{P}(t)$.

The results are given in figure S3 (green curves). It appeared that the estimated functions $\gamma_G(t)$ violate the constraint of belonging to the interval $[0..1]$. This is the sign that this model can not at the same time be adjusted to the MoD of PN model and predict correct evolutions for the P,N populations.

Notwithstanding, we proceeded with the ansatz method in order to examine which $\gamma_G(t)$ would yield correct predictions for the P,N populations. Setting a tanh shape for it,

$$\gamma_G(t, \tau_G, \sigma_G) = \frac{1}{2} \left[1 + \tanh \left(\frac{t - \tau_G}{\sigma_G} \right) \right] \quad (46)$$

we then seek the pair (τ_G^*, σ_G^*) that minimizes the error of prediction upon $\hat{\alpha}_{pp}(t)\hat{P}(t)$, given by:

$$E(\tau_G, \sigma_G) = \int_0^T dt \left(\hat{\alpha}_{pp}(t)\hat{P}(t) - \exp \left[\int_0^t d\tau \eta (1 - 2\gamma_G(\tau, \tau_G, \sigma_G)) \right] \right)^2 \quad (47)$$

We used Nelder-Mead optimization over time-discretized series (with $\Delta t = 0.01$ hour, $T = 96h$).

The fitted values for (τ_G^*, σ_G^*) under the three experimental conditions are given in table 3.

Estimating γ_A

To estimate γ_A for model GAA, we proceeded the same way as for the model GAN, except that we used:

$$\dot{A}(t) = \eta [2\gamma_G(t)G(t) - \gamma_A(t)A(t)] \quad (48)$$

The fitted values for (τ_A^*, σ_A^*) under the three experimental conditions are given in table 3.

The tanh ansatz can then be adjusted to produce predicted evolutions of P,N populations in accordance with the observed ones (Fig. 3).

PN and GAN models predictions for clones contents.

We illustrate here that even if PN and GAN models yield the same predictions regarding the averaged populations of progenitors and neurons they produce, they however differ in predictions if we consider the distributions of contents in progenitors/neurons issued from a single initial progenitors (distribution of progenitors/neurons within clones). Due to the stochastic nature of the MoD embedded in the model, each initial progenitor should indeed produce a stochastic tree of descent. Clone contents are then defined here by the pairs (number of progenitors, number of neurons) obtained after a number C of cell cycles. For instance, if an initial P -cell undergoes a first division of PN MoD, it will produce one neuron of generation 1, and one progenitor of generation 1. If the latter undergoes a nn-division, it will produce two neurons of generation 2, so in the end the content of the clone after two cell cycles will be (0,3). Another initial P -cell could undergo a first pp-division producing two progenitors of generation 1; if one of them undergoes a pp-division, and the other one undergoes a nn-division, this will end in a (2,2) clone content at generation 2. We can then compute the statistical distribution of these contents by repeatedly sample stochastic production of trees of descent.

To build this illustration simply, we consider here MoD that are fixed in time, and we compute the distribution of clones contents produced by G -cells after two cell cycles (we used 10^6 stochastic samples under each model). To make predictions comparable, we fix the MoD under both models including feedback control at the

values they have at the same time point. We chose that time point as 68 hpf, i.e. the time at which MoD of G -cells becomes predominantly neurogenic in GAN model (the conclusions are independent of that choice). Hence, the MoD values we used are: $\alpha_{pp} = 0.4975$ and $\alpha_{nn} = 0.135$ in PN model, and $\gamma_G = \gamma_A = 0.446$ in GAN model. Importantly for the comparison, both models expectedly predict similar amounts of averaged number of P/N -cells after two generations ($P_2 = 1.86$ and $N_2 = 1.51$ with PN model, and $P_2 = 1.96$ and $N_2 = 1.59$ with GAN model; in both cases, the observed proportions of progenitors are 55.2% at generation 2).

The expected clone contents are reported in table 4 for PN model and in table 5 for GAN model (in these tables, empty cells are unreachable contents). The different clone contents would not appear with same probabilities under the two scenarios. For instance, clones made of $(P, N) = (0, 3)$ should appear in 5% of clones under PN model whereas they should appear in 20% of clones under GAN model. Even more discriminative, the content $(P, N) = (2, 1)$ which is the most expected under PN model should not appear at all under GAN model (at generation 2 of a G -cell). Further theoretical work is needed to build completely usable predictions to be compared with experimental data, taking into account asynchronous divisions, time mixing of G/A populations in the GAN model and MoD evolving with time or by feedback control.

Table 4 PN predictions for the expected fraction of each clone contents (P, N) at generation 2.

P	N				
	0	1	2	3	4
0			13.4	04.9	00.9
1			13.4	04.9	
2		18.3	13.4		
3		18.2			
4	12.3				

Table 5 GAN predictions for clone contents at generation 2

P	N				
	0	1	2	3	4
0				19.9	
1			24.8		
2			11.0		
3		27.3			
4	17.0				

List of abbreviations

BMP: Bone Morphogenetic Protein

CDC25B: Cell division cycle 25 B phosphatase

CDK: Cyclin-dependent kinases

CNS: Central Nervous System

CTL: Control

NSC: Neural Stem Cells

MoD: Mode of Division

Shh: Sonic Hedgehog

Declarations

Authors' contributions

MA, EA, JG, AM, FP and AV contributed to the conceptualization. MA, SB, JG, JMT and AV contributed to the formal developments. MA, EA, JG, AM and FP wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

Work in FP's laboratory is supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, Université P. Sabatier, Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR), the Fondation pour la Recherche sur le Cancer (ARC; PJA 20131200138) and the Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC; CBD_14-V5-14_FRC). Work in JG's laboratory is supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, Université P. Sabatier, Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-15-CE13- 0010-01). Manon Azaïs is recipient of MESR studentships. Angie Molina is a recipient of IDEX UNITI and Fondation ARC. The funding entities had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests

The authors declare that no competing interests exist.

Availability of data and materials

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article (and its additional files).

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Author details

¹Centre de Recherches sur la Cognition Animale (CRCA), Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse; CNRS, UPS, France. ²Centre de Biologie du Développement (CBD), Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse; CNRS, UPS, France. ³LaPlaCE, Université de Toulouse; CNRS, UPS, France.

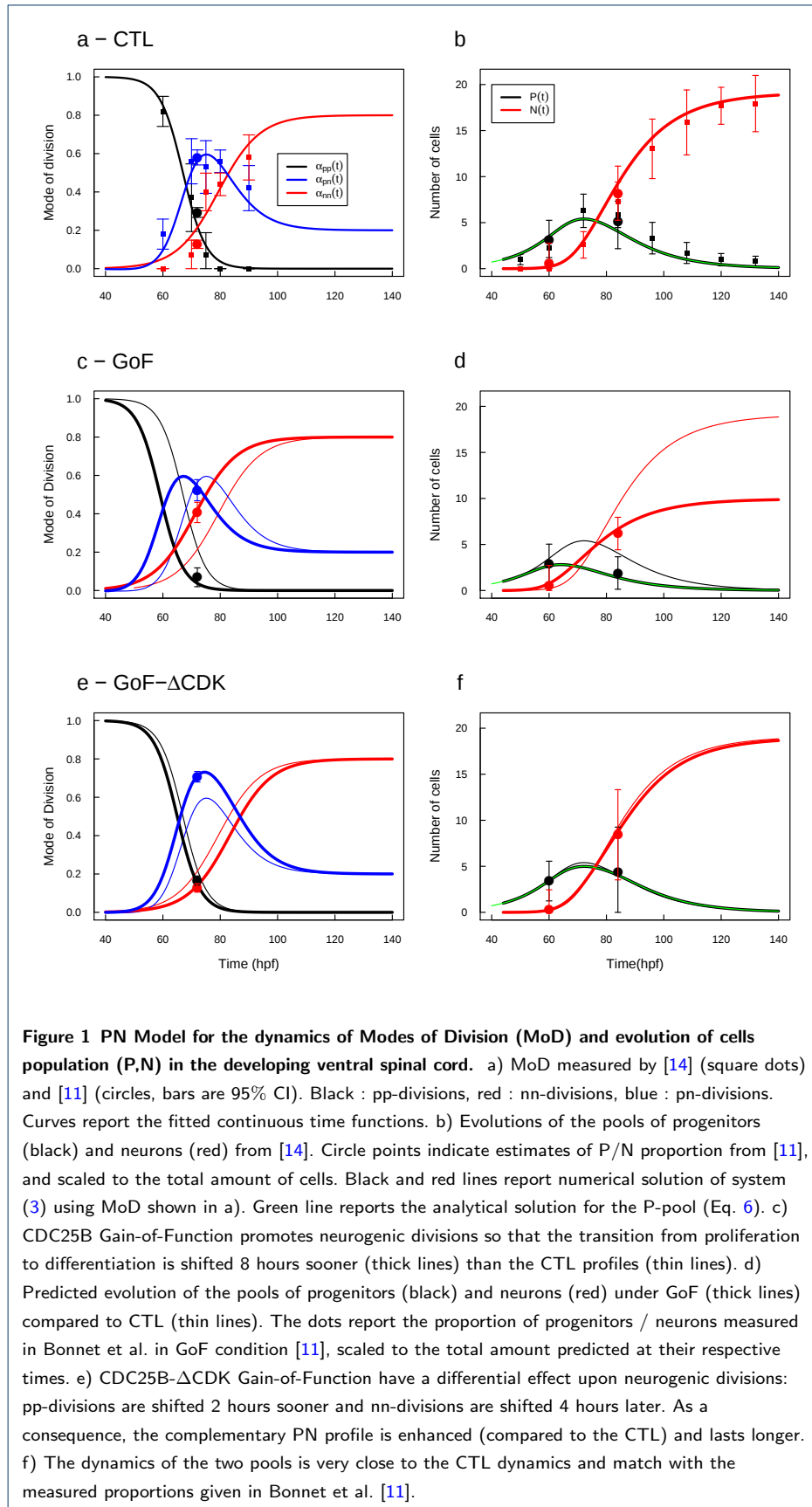
Acknowledgements

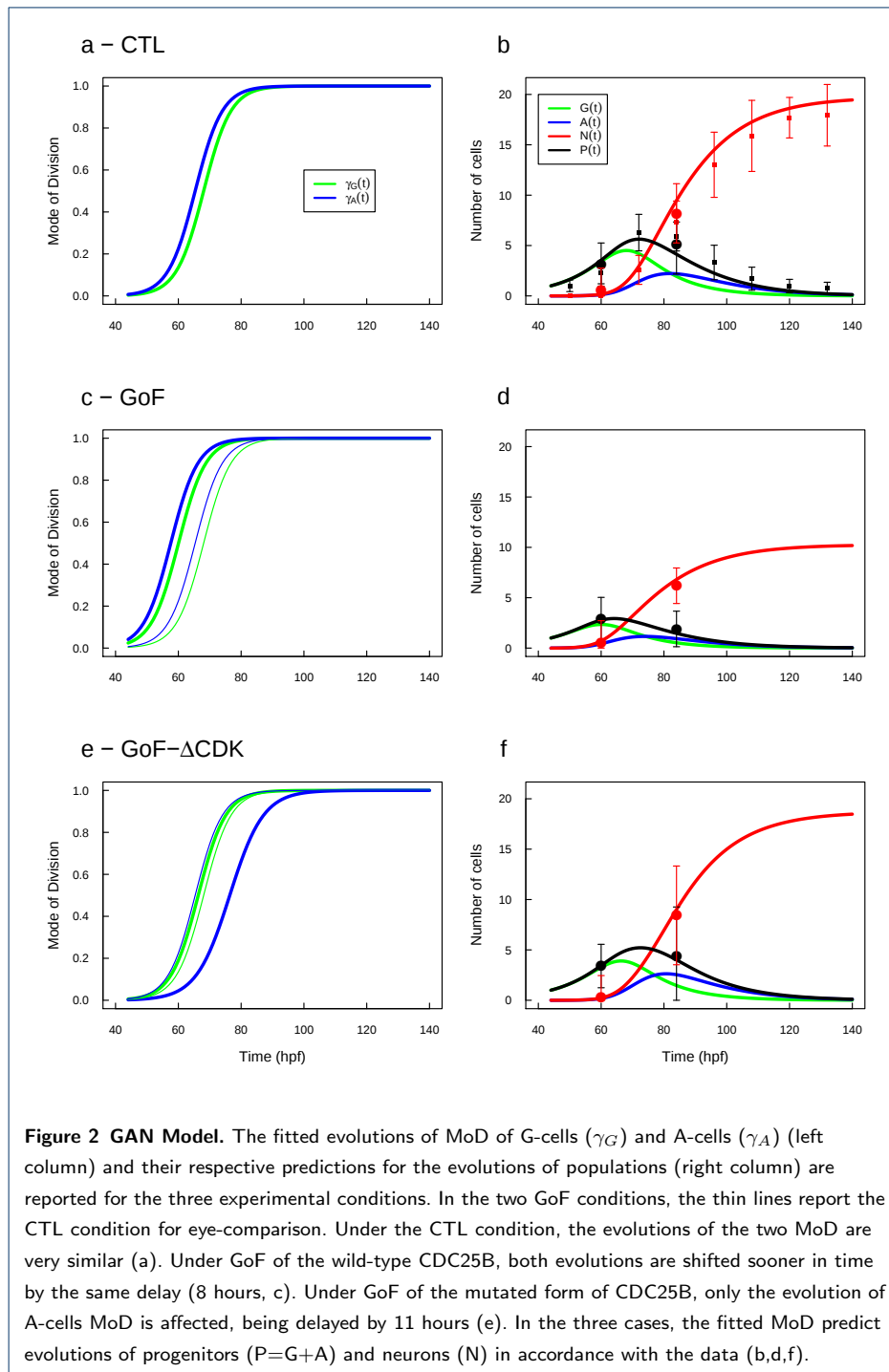
MA warmly thanks Leah Edelstein-Keshet for the 3-months stay in her lab at the onset of this project.

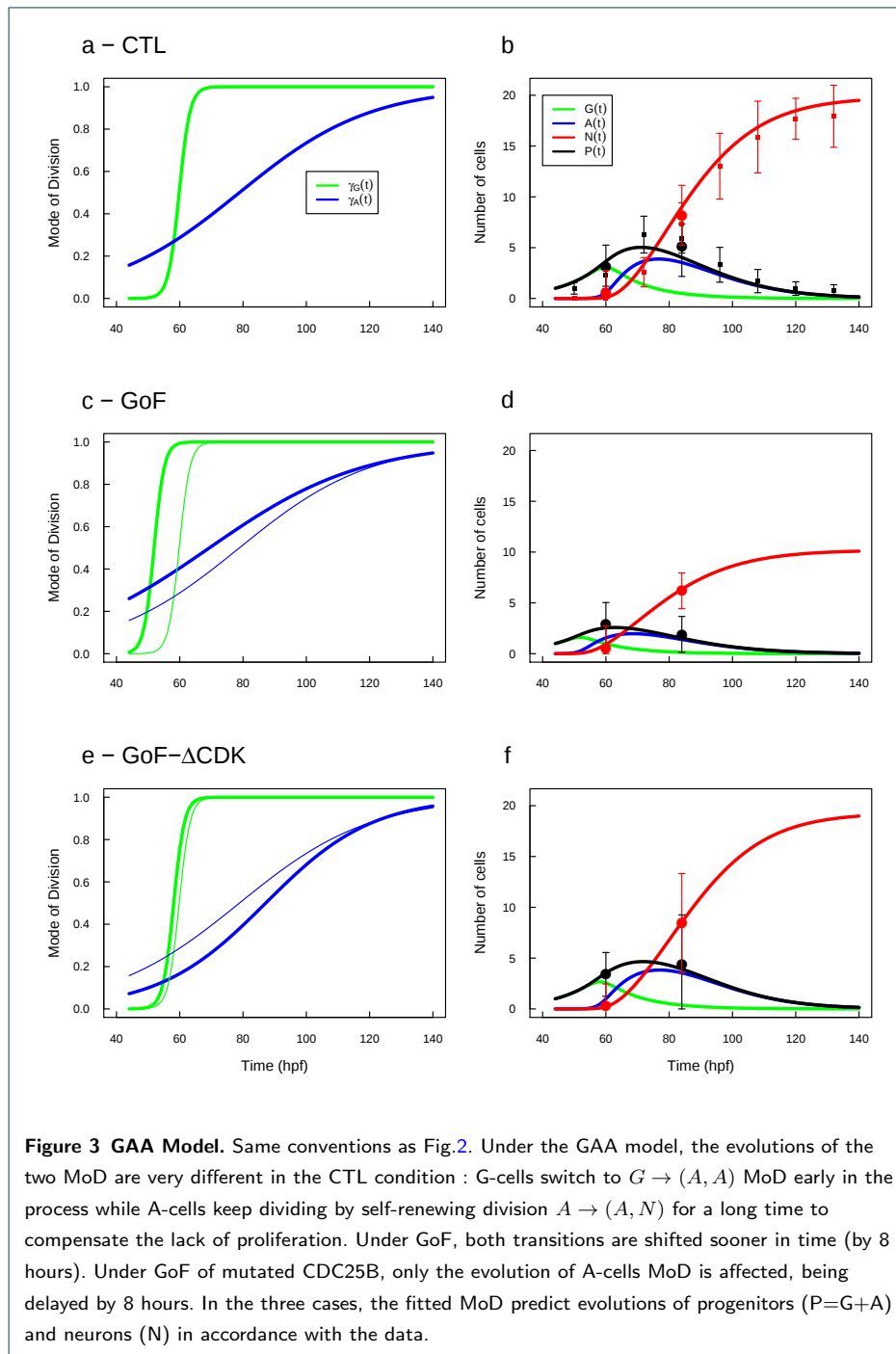
References

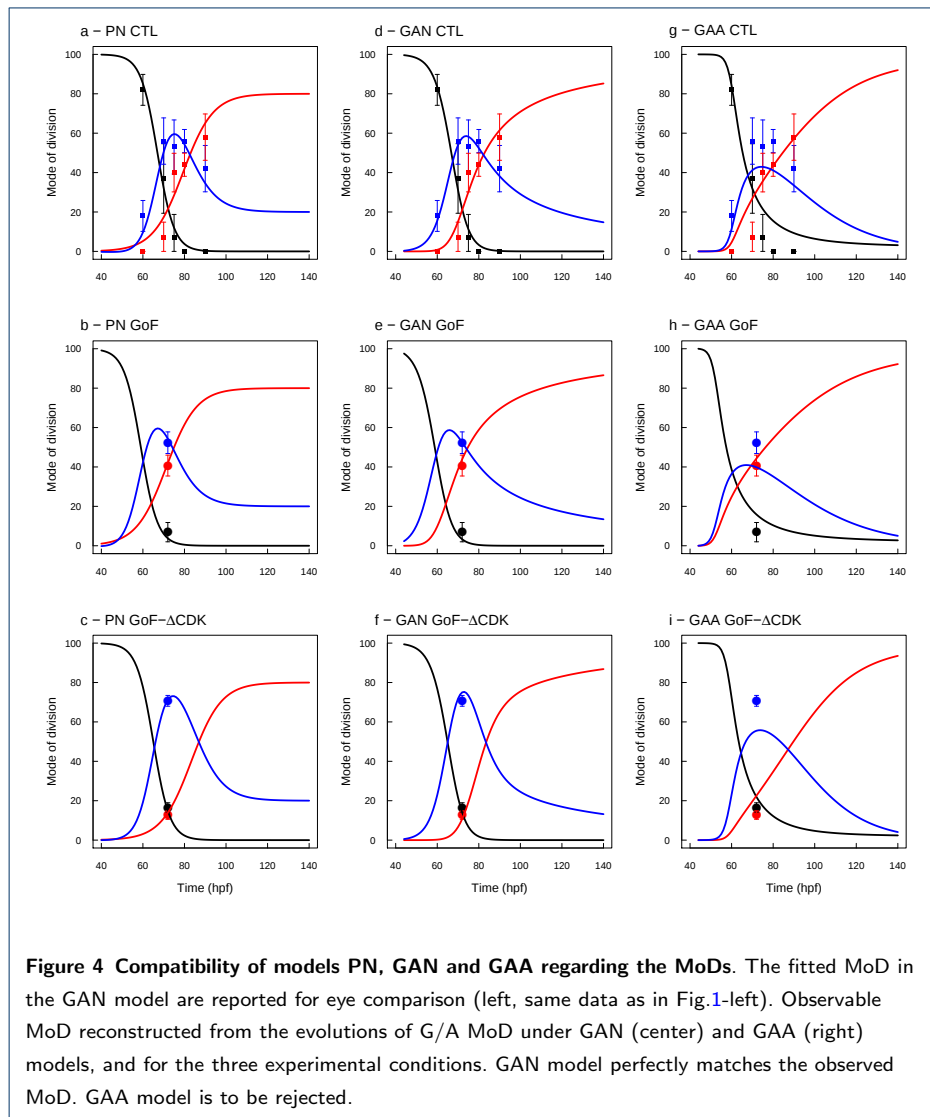
1. Doe, C.Q.: Temporal Patterning in the *Drosophila* CNS. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **33**, 219–40 (2017). doi:[10.1146/annurev-cellbio-111315](https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315)
2. Kang, K.H., Reichert, H.: Control of neural stem cell self-renewal and differentiation in *Drosophila*. *Cell and Tissue Research* **359**(1), 33–45 (2015). doi:[10.1007/s00441-014-1914-9](https://doi.org/10.1007/s00441-014-1914-9)
3. Syed, M.H., Mark, B., Doe, C.Q.: Playing Well with Others: Extrinsic Cues Regulate Neural Progenitor Temporal Identity to Generate Neuronal Diversity. *Trends in Genetics* **33**(12), 933–942 (2017). doi:[10.1016/j.tig.2017.08.005](https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.08.005)
4. Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Menezes, J.R.L., Macklis, J.D.: Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nature reviews. Neuroscience* **8**(6), 427–37 (2007). doi:[10.1038/nrn2151](https://doi.org/10.1038/nrn2151)
5. Taverna, E., Götz, M., Huttner, W.B.: The Cell Biology of Neurogenesis: Toward an Understanding of the Development and Evolution of the Neocortex vol. 30, pp. 465–502 (2014). doi:[10.1146/annurev-cellbio-101011-155801](https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155801). <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-cellbio-101011-155801>
6. Kicheva, A., Bollenbach, T., Ribeiro, A., Valle, H.P., Lovell-Badge, R., Episkopou, V., Briscoe, J.: Coordination of progenitor specification and growth in mouse and chick spinal cord. *Science* **345**(6204), 1254927–1254927 (2014). doi:[10.1126/science.1254927](https://doi.org/10.1126/science.1254927)
7. Kicheva, A., Briscoe, J.: Developmental Pattern Formation in Phases. *Trends in Cell Biology* **25**(10), 579–591 (2015). doi:[10.1016/j.tcb.2015.07.006](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.006)
8. Zagorski, M., Tabata, Y., Brandenburg, N., Lutolf, M.P., Tkačik, G., Bollenbach, T., Briscoe, J., Kicheva, A.: Decoding of position in the developing neural tube from antiparallel morphogen gradients. *Science* **356**(6345), 1379–1383 (2017). doi:[10.1126/science.aam5887](https://doi.org/10.1126/science.aam5887)
9. Agius, E., Bel-Vialar, S., Bonnet, F., Pituello, F.: Cell cycle and cell fate in the developing nervous system: the role of CDC25B phosphatase. *Cell and Tissue Research* **359**(1), 201–213 (2015). doi:[10.1007/s00441-014-1998-2](https://doi.org/10.1007/s00441-014-1998-2)
10. Peco, E., Escude, T., Agius, E., Sabado, V., Medevielle, F., Ducommun, B., Pituello, F.: The CDC25B phosphatase shortens the G2 phase of neural progenitors and promotes efficient neuron production. *Development* **139**(6), 1095–1104 (2012). doi:[10.1242/dev.068569](https://doi.org/10.1242/dev.068569)
11. Bonnet, F., Molina, A., Roussat, M., Azaïs, M., Vialar, S., Gautrais, J., Pituello, F., Agius, E.: Neurogenic decisions require a cell cycle independent function of the CDC25B phosphatase. *eLife* **7** (2018). doi:[10.7554/eLife.32937](https://doi.org/10.7554/eLife.32937)

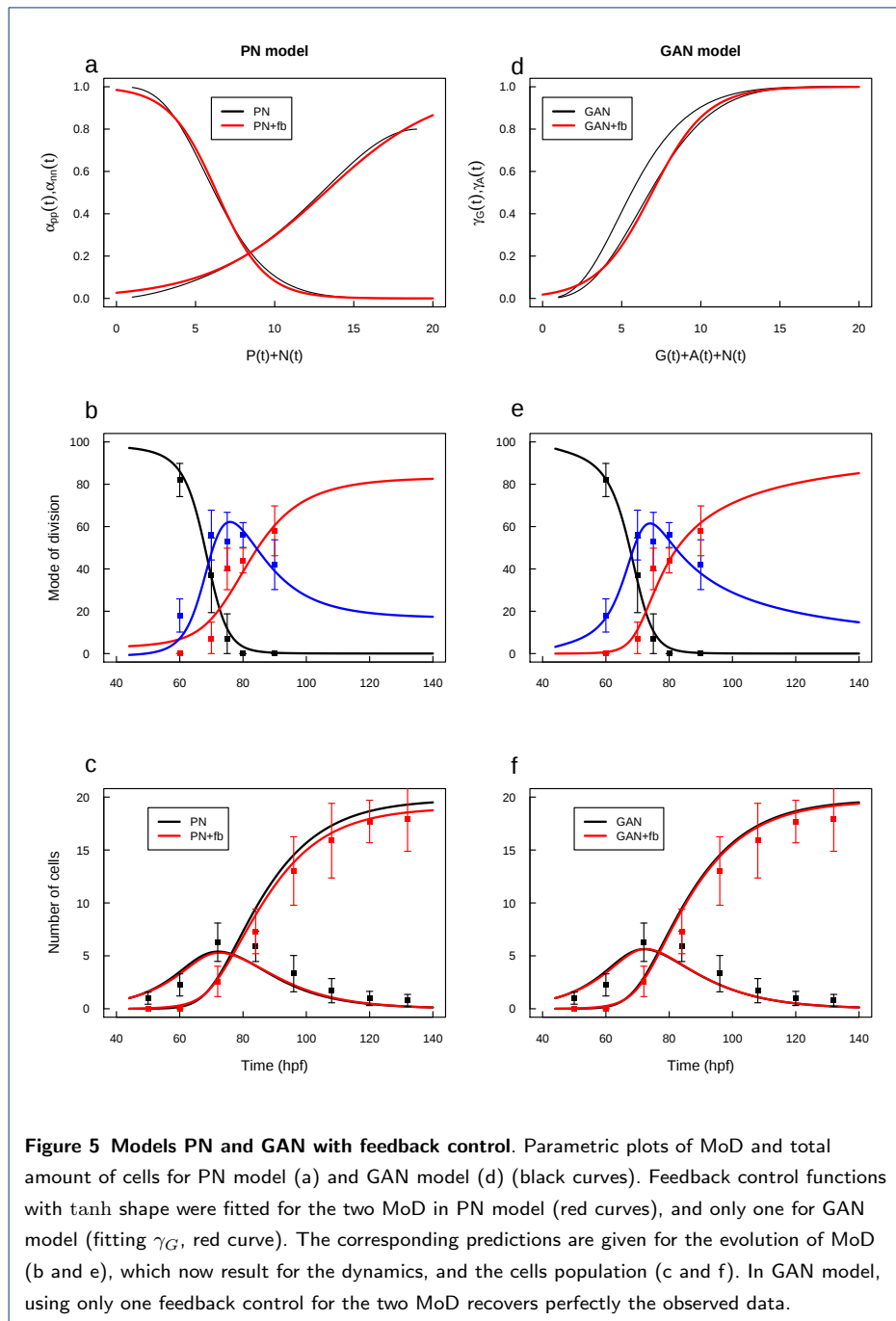
12. Danesin, C., Soula, C.: Moving the Shh Source over Time: What Impact on Neural Cell Diversification in the Developing Spinal Cord? *Journal of Developmental Biology* **5**(2), 4 (2017). doi:[10.3390/jdb5020004](https://doi.org/10.3390/jdb5020004)
13. Lander, A.D., Gokoffski, K.K., Wan, F.Y.M., Nie, Q., Calof, A.L.: Cell lineages and the logic of proliferative control. *PLoS biology* **7**(1), 15 (2009). doi:[10.1371/journal.pbio.1000015](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000015)
14. Saade, M., Gutiérrez-Vallejo, I., LeDréau, G., Rabadán, M.A., Miguez, D.G., Buceta, J., Martí, E.: Sonic hedgehog signaling switches the mode of division in the developing nervous system. *Cell Reports* **4**(3), 492–503 (2013). doi:[10.1016/j.celrep.2013.06.038](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.038)
15. Molina, A., Pituello, F.: Playing with the cell cycle to build the spinal cord. *Developmental Biology* **432**(1), 14–23 (2016). doi:[10.1016/j.ydbio.2016.12.022](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.12.022)
16. Azaïs, M.: Embryogenèse de la moelle épinière: de la dynamique collective observable à une proposition de modèle comportemental à l'échelle cellulaire. Phd thesis (in french), Université de Toulouse (December 2018)
17. Takahashi, T., Nowakowski, R.S., Caviness, V.S.: The leaving or Q fraction of the murine cerebral proliferative epithelium: a general model of neocortical neuronogenesis. *The Journal of neuroscience* **16**(19), 6183–96 (1996)
18. Nowakowski, R.S., Caviness, V.S., Takahashi, T., Hayes, N.L.: Population dynamics during cell proliferation and neuronogenesis in the developing murine neocortex. *Results and problems in cell differentiation* **39**, 1–25 (2002)
19. Míguez, D.G.: A Branching Process to Characterize the Dynamics of Stem Cell Differentiation. *Scientific Reports* **5**(1), 13265 (2015). doi:[10.1038/srep13265](https://doi.org/10.1038/srep13265)







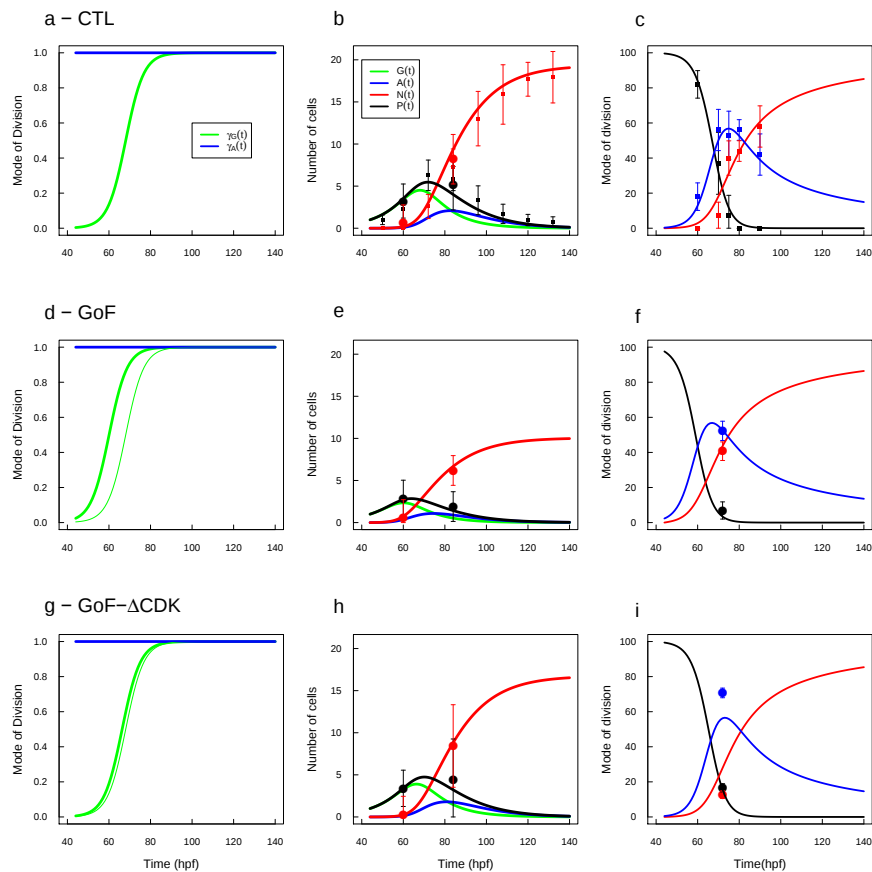




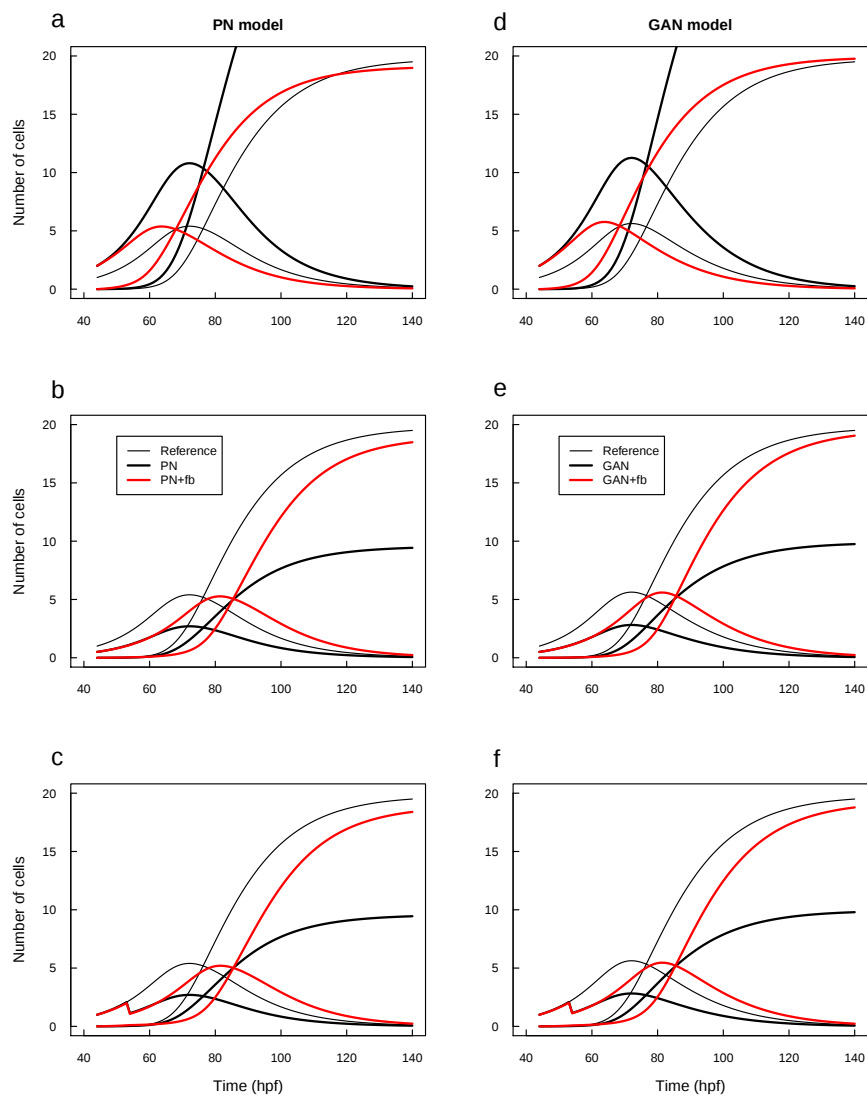
Additional Files

Additional file 1 — DataAndCode.R

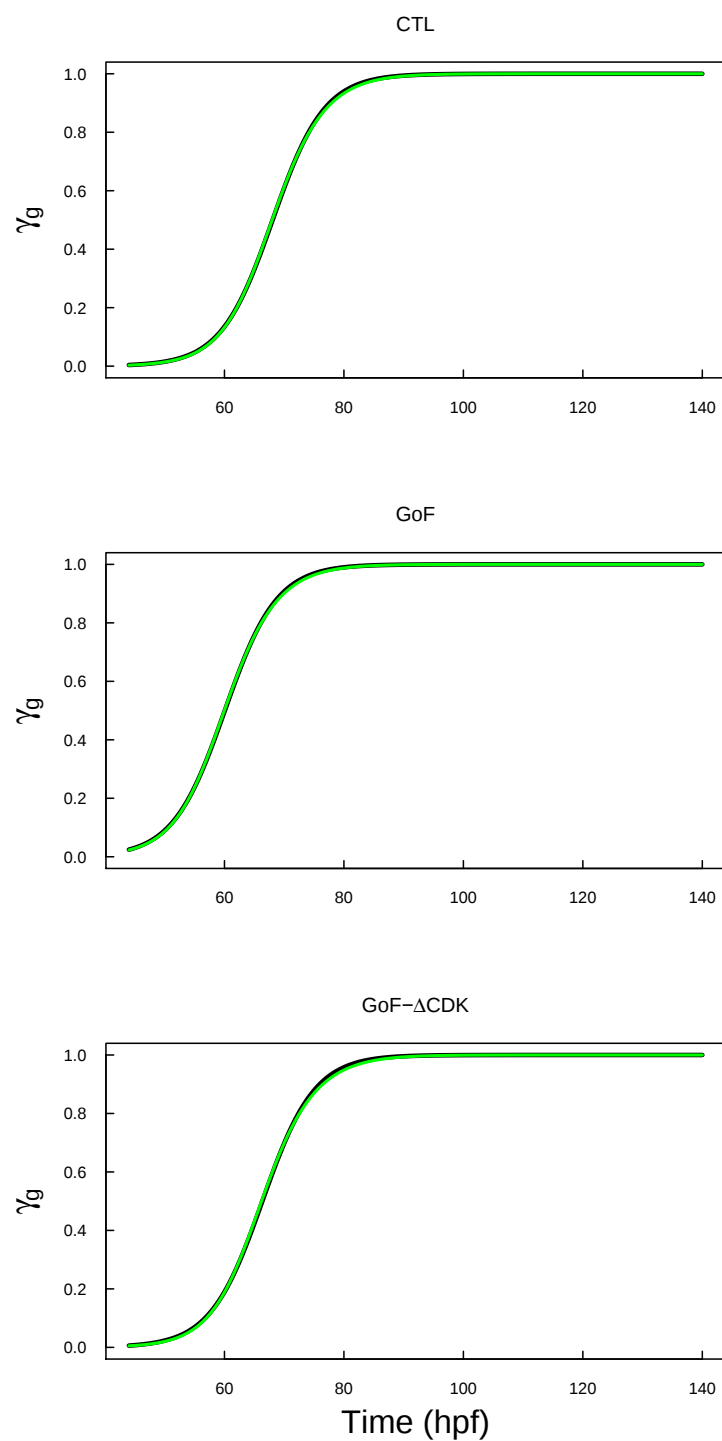
All data and codes used to generate the figures are contained in the R script DataAndCode.R.



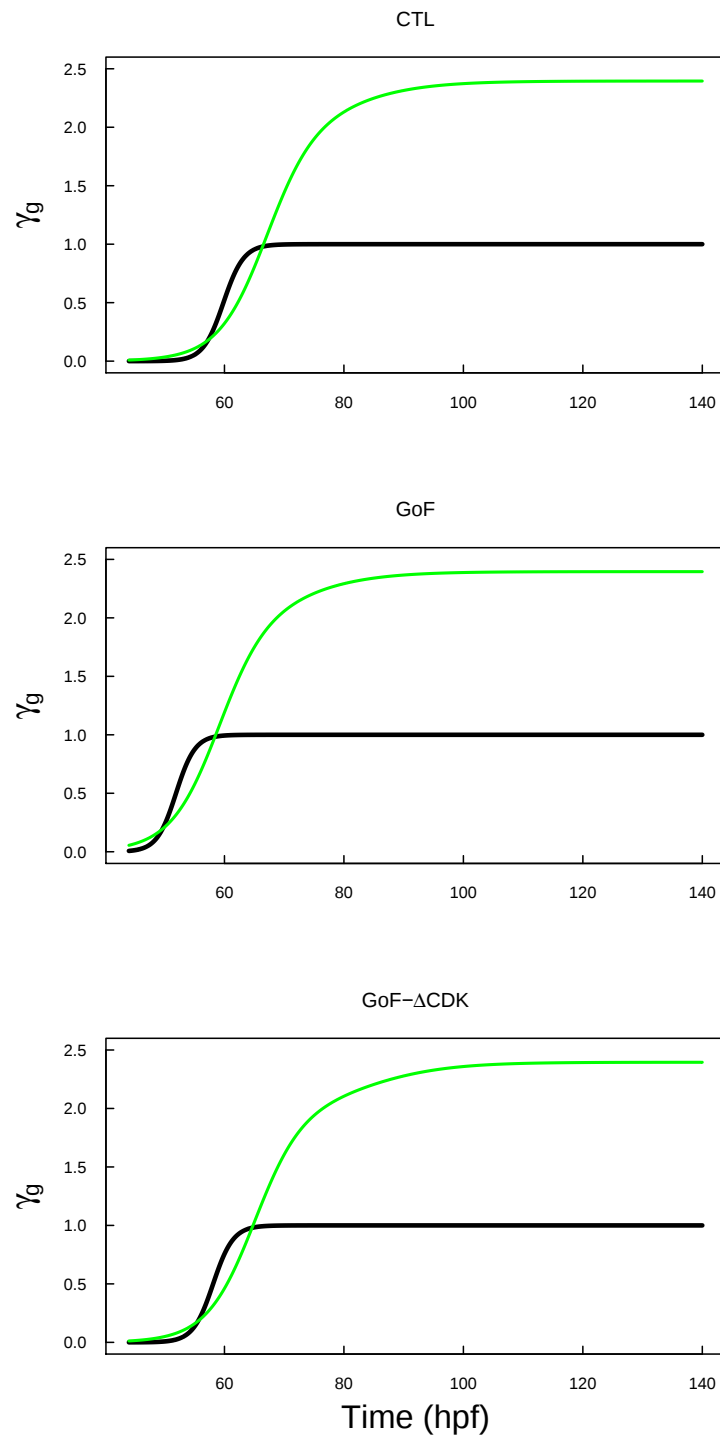
Supplemental figure S1 — Simplified GAN Model. Same legend as Fig. 2. The simplified version of GAN model is when a A -cell only performs $A \rightarrow (N, N)$ divisions, so $\gamma_A(t)$ is forced to the value 1 at any time. This simplified version yields predictions which are practically identical to GAN predictions, except a slight difference in the early rise of nn-divisions, and an incorrect prediction for the MoD under the GoF of mutated CDC25B experiment (i).



Supplemental figure S2 — Illustrations of robustness against initial condition and perturbation in PN+fb and GAN+fb models. In all plots, the unperturbed dynamics P/N populations predicted by PN and GAN models are reported for eye reference (black thin lines), the perturbed dynamics predicted by PN and GAN models are reported to show the sensitivity to perturbation (black thick lines), and the perturbed dynamics predicted by PN+fb and GAN+fb are reported to show how the sensitivity is canceled by the introduction of the feedback control. The perturbations are: (first line) the dynamics starts with twice as much progenitors, (second line) the dynamics starts with half as much progenitors, (third line) at time 54 hpf, the population of progenitors is divided by two, as if one progenitor cell would die at that time, or equivalently, as if "time 0" would have been set at 54 hpf. In all cases, the models with feedback control converge to about the same final amount of neurons.



Supplemental figure S3 — Analytical and least-square fitted $\gamma_G(t)$ for GAN model. Predicted evolution of $\gamma_G(t)$ obtained by analytical inversion are reported in green. Fitted tanh ansatz are reported in black and perfectly overlap.



Supplemental figure S4 — Analytical and least-square fitted $\gamma_G(t)$ for GAA model. Same conventions as in Fig. S3. In GAA model, the analytical inversion of $\gamma_G(t)$ yields an evolution that violates the constraint of belonging to the interval $[0..1]$ (green curves). Fitted tanh ansatz are reported in black.

