



HAL
open science

Fonction d'un régulateur du cycle cellulaire, la phosphatase CDC25B, au cours de la neurogenèse chez les Mammifères

Mélanie Roussat

► **To cite this version:**

Mélanie Roussat. Fonction d'un régulateur du cycle cellulaire, la phosphatase CDC25B, au cours de la neurogenèse chez les Mammifères. Biologie cellulaire. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2020. Français. NNT : 2020TOU30030 . tel-02987763

HAL Id: tel-02987763

<https://theses.hal.science/tel-02987763>

Submitted on 4 Nov 2020

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.



THÈSE

En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Mélanie ROUSSAT

Le 7 février 2020

**Fonction d'un régulateur du cycle cellulaire, la phosphatase
CDC25B, au cours de la neurogenèse chez les Mammifères**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **BIOLOGIE DU DEVELOPPEMENT**

Unité de recherche :

CBD - Centre de Biologie du Développement

Thèse dirigée par

Sophie BEL-VIALAR

Jury

Mme Michèle STUDER, Rapporteur

M. Laurent NGUYEN, Rapporteur

Mme Jeannette NARDELLI, Rapporteur

Mme Catherine SOULA, Examinatrice

Mme Sophie BEL-VIALAR, Directrice de thèse

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier l'Université Paul Sabatier et le Centre de Biologie du Développement, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse. Je tiens à remercier également les personnes suivantes :

Les membres de mon jury, Michèle Studer, Laurent Nguyen, Jeannette Nardelli et Catherine Soula, pour avoir pris le temps d'évaluer mon travail de thèse, et la riche discussion qui a conclu ce projet. Je remercie également les membres de mon comité de thèse, Alexandre Baffet et Laurence Liaubet, pour leurs précieux conseils, tant scientifiques que personnels.

Fabienne Pituello, pour m'avoir accueillie, dès le stage de Master I, dans le laboratoire et son équipe. Merci pour ta gentillesse, ta clairvoyance et ta positivité constante, on ne peut pas demander mieux d'une cheffe d'équipe !

Sophie Bel-Vialar, pour m'avoir fait confiance en m'encadrant pendant ces années. Il y a cinq ans tu m'as proposé ce tout nouveau projet. J'ai accepté ce défi avec enthousiasme, et on a fait un beau bout de chemin ensemble ! Merci pour ta pédagogie et ta disponibilité sans faille tout au long de cette aventure, on ne peut pas espérer meilleure directrice de thèse ! Merci également pour ta compréhension, ton ouverture d'esprit, et ton soutien pendant et après la thèse. Je sais que, quel que soit le chemin que je prendrai, je pourrais compter sur tes conseils !

Un grand merci à tous les membres de l'équipe Pituello, qui contribuent à la bonne ambiance quotidienne dans le labo :

Eric, pour ta bonne humeur et ton humour bien sûr, mais aussi ta franchise et les conversations sociologiques. François, pour ta gentillesse, ta disponibilité et ton aide dans le labo qui a grandement contribué au projet. Sofiane, malgré le peu de temps où nous nous sommes côtoyés, j'ai beaucoup apprécié nos conversations de bureau. C'est toi qui prends la relève maintenant, bonne thèse ! Enfin, Fred, qui était là à mes débuts en Master I & 2, merci pour les discussions Stargate et ton aide précieuse pour préparer le concours !

Merci à mes collègues et amis de bureau, sans qui ces années n'auraient pas été les mêmes ! Guillaume, pour alterner les moments de délires et de discussions sérieuses, les imitations Game of et Visiteurs, les conseils touristiques bretons ; Angie, pour ta joie de vivre quotidienne et ta positivité, les cours d'espagnol, et pour l'idée du voyage à Faro que je n'oublierai pas ! Merci également à Michelle, même si tu n'étais pas souvent présente dans le bureau, tu as marqué ta présence avec ton dynamisme et ta bonne humeur ! Je rajouterai ici David, bien que n'étant pas officiellement membre du bureau, beaucoup considèrent que tu en fais partie ! Merci pour les conversations quotidiennes Japon, Star Wars, One Piece, Last Man, Game of, Kaamelott et j'en oublie. Merci d'avoir été là pour me soutenir pendant les moments de doutes, pour ton hospitalité et ton amitié.

Cette thèse m'a donné l'occasion de participer à l'encadrement de formidables étudiantes, Alice, Lynda, Mina, Nora, et Gaïane. Merci pour votre patience avec mes explications et votre implication dans nos projets.

Un grand merci à Bertrand Bénazéraf, pour nos discussions scientifiques et personnelles. Merci pour tes explications éclairées sur le monde de la science, ton ouverture d'esprit, et tes conseils pour la suite.

Je tiens à remercier également « nos voisins du 2^{ème} » :

Cathy Soula et les membres de son équipe, Bruno, Cathy et Nathalie, pour être toujours disponibles *pour* un conseil, un service ou juste un moment papotage !

L'équipe d'Alice Davy, sans qui le projet cortex n'aurait pas connu le développement qu'il a eu. Je remercie chaleureusement Thomas, pour ton expertise FACS et ton savoir-être ; Christophe, pour ta bonne humeur (et ce même après 3 heures d'électropo en compagnie des moustiques) ; Momo, pour ta positivité, ta folie, ton soutien pendant les moments déprimés, nos conversations travaux ; Caroline, pour ton aide ces derniers mois avec les manips culture ; et Catherine et Isabelle pour leur gentillesse.

Merci également à l'équipe enseignante de Biodev, Pascale, Christiane, Valérie, Bruno, Anne, Gaëlle, pour m'avoir accompagné pendant ces deux années de monitorat qui ont été très enrichissantes.

Merci aux membres de la plateforme animalerie souris, dont le travail a été essentiel au projet, et notamment Laurence pour ta gentillesse et ta patience avec notre gestion des lignées !

Un grand merci enfin à tous les thésards : Maleaume, pour les sessions escalades, j'espère qu'il y en aura d'autres ! Cyril, mon binôme art plastique, pour les discussions Japon ; Damien, pour ta bonne humeur et ton entrain, j'ai beaucoup aimé partager avec toi le congrès à Alicante, le premier pour toi et le dernier pour moi ! Merci aux filles, Alex, Sandy, et Maylis, pour apporter une touche de sensibilité dans ce groupe très masculin, et enfin merci aux « anciens », partis vers d'autres horizons, Nadège, Jérôme, Anthony et Raph. Merci à tous pour l'ambiance incomparable des repas à l'Upsi, et votre amitié tout au long de cette aventure.

Pour finir ce petit tour du labo, un grand merci à tous les membres du CBD, pour leur aide et leur sympathie. Je garderais un très bon souvenir des journées CBD !

Je conclurai en remerciant mes amis, ma famille et ma belle-famille, pour avoir suivi mon aventure scientifique avec intérêt et m'avoir soutenu pendant ces quelques années. Emme et Angie, merci pour votre amitié et votre curiosité pour mon travail. Merci à Laeti, mes frères Greg et Yohan, et Maman, pour m'avoir soutenue dans tout ce que j'ai entrepris et ta patience avec mon caractère. Merci à ma famille d'adoption, Maryvonne, Dominique et Camille pour votre soutien. Enfin les derniers remerciements, mais pas des moindres, iront à mon binôme de vie, Romain ; merci de t'être occupé de moi pendant les périodes intenses, d'avoir supporté patiemment ma mauvaise humeur pendant les moments difficiles, m'avoir soutenue jusqu'au bout et toujours réussir à me remonter le moral, et trouver les bons mots...

Merci à tous !

Publications et communication

Publications

CDC25B controls the basal progenitor ratio through a modification of G2 phase length. Roussat M, Audouard C, Medevielle F, Jungas T, Davy A, Pituello F, Bel-Vialar S. en préparation

Neurogenic decisions require a cell cycle independent function of the CD25B phosphatase. Bonnet F#, Molina A#, Roussat M, Azais M, Bel-Vialar S, Gautrais J, Pituello F, Agius E. Elife. 2018 Jul 3;7.

A long range distal enhancer controls temporal fine-tuning of PAX6 expression in neuronal precursors. Lacomme M, Medevielle F, Bourbon HM, Thierion E, Kleinjan DJ, Roussat M, Pituello F, Bel-Vialar S. Dev Biol. 2018 Apr 15;436(2):94-107.

Congrès

European Development Biology Congress – EDBC Alicante, Spain 23rd to 26th October 2019
Obtention d'une bourse de voyage de la SFBD de 400€

Poster "Cell cycle and cell fate decision: role of the CDC25B G2/M regulator in mammalian neurogenesis"

International Society for Developmental Neuroscience – ISDN 22-25 May 2018 Nara, Japan
Obtention d'une bourse de voyage de l'ISDN d'un montant de 800\$.
Poster "Cell cycle and cell fate decision: role of the CDC25B G2/M regulator in mammalian neurogenesis"

8ème Journée des doctorants de l'école Biologie-Santé-Biotechnologie, 4-5 Avril 2018, Toulouse
Présentation orale "Cell cycle and cell fate decision: role of CDC25B phosphatase during corticogenesis"

2nd Joint Meeting SFBD SBCF - Lyon, France 26th to 29th April 2017

Poster "Function of a cell cycle regulator, the CDC25B phosphatase, in Vertebrate neurogenesis"

Enseignement

Enseignements de travaux dirigés et pratiques en Biologie du Développement, niveau Licence 2, à l'Université Paul Sabatier (UT3)

2016-2017 Vacances en 1^{ère} année de thèse : 12h

2017-2019 Monitorat en 2^{ème} et 3^{ème} année de thèse : 32h/an

Résumé des travaux de thèse

Construire un système nerveux central fonctionnel nécessite une régulation stricte entre la prolifération des cellules souches/progéniteurs neuraux, et leur différenciation en neurones. Une prolifération anormale peut mener à l'apparition de tumeur, alors qu'une différenciation précoce peut épuiser le stock de progéniteurs et conduire à des malformations cérébrales comme la microcéphalie. De plus en plus de données suggèrent que la cinétique du cycle cellulaire des progéniteurs peut influencer le choix de proliférer ou se différencier. Dans le tube neural d'embryon de poulet, notre équipe a montré que l'expression de la phosphatase CDC25B, régulateur positif de la transition G2/M, raccourcit la longueur de la phase G2 et promeut la production neuronale. De plus, une partie de cette fonction neurogénique de CDC25B est indépendante de sa fonction sur le cycle cellulaire. Afin d'améliorer notre compréhension de sa fonction dans le contrôle du destin cellulaire et de déterminer la part de ses fonctions cycle cellulaire dépendante et indépendante, nous avons créé un modèle murin conditionnellement invalidé pour CDC25B. Au cours de ma thèse, j'ai mis à profit ce modèle génétique pour explorer la fonction de CDC25B dans la neurogenèse chez les Mammifères. Mon projet a consisté à **(1) déterminer si la fonction neurogénique de CDC25B dans le modèle oiseau est conservée dans le développement de la moelle épinière mammifère, (2) explorer la fonction de CDC25B dans le développement du cortex cérébral. (1)** J'ai pu montrer que la perte de fonction de CDC25B rallonge la phase G2 sans affecter le taux de prolifération des progéniteurs spinaux, et diminue la production des neurones dorsaux. **CDC25B promeut donc la différenciation neuronale dans la moelle épinière en développement des Mammifères. (2)** Le cortex cérébral est le tissu du système nerveux central le plus récent d'un point de vue évolutif. Sa mise en place est plus complexe et met en jeu une plus grande diversité cellulaire que dans la moelle épinière. Au cours de son développement, les progéniteurs apicaux (aRGs) effectuent des divisions prolifératives puis changent de mode de division pour produire des neurones et des progéniteurs basaux (bIPs et bRGs). Dans ce tissu, j'ai montré que la perte de fonction de CDC25B entraîne un rallongement de la durée de la phase G2 et un raccourcissement de la durée de la phase G1 du cycle des aRGs, sans affecter le taux de prolifération et la durée totale du cycle cellulaire. En parallèle, j'ai identifié une diminution de la production des bIPs et une augmentation des bRGs. A l'inverse, le gain de fonction de CDC25B augmente le nombre de bIPs. CDC25B régule donc le ratio de production des progéniteurs basaux issus des aRGs. Afin de déterminer si les modifications des phases G1/G2 sont nécessaires pour affecter la production des bIPs, j'ai surexprimé une forme mutée de CDC25B, incapable d'interagir avec ses partenaires Cycline B/CDK1 à la transition G2/M. Cette forme modifiée de CDC25B n'est plus capable de promouvoir la production des bIPs. Il reste à déterminer quelle phase, G1 et/ou G2, est en cause dans la régulation de ce processus. **Ces résultats me conduisent à proposer que CDC25B, via la régulation de la cinétique du cycle cellulaire, contrôle le destin des progéniteurs basaux issus des divisions des progéniteurs aRGs. Ce projet de thèse a mis en évidence le rôle jusqu'à maintenant inconnu d'un régulateur de la transition G2/M, la phosphatase CDC25B, dans la régulation de la neurogenèse spinale et corticale chez les Mammifères.**

Table des matières

REMERCIEMENTS	1
PUBLICATIONS ET COMMUNICATION	3
RESUME DES TRAVAUX DE THESE	4
TABLE DES MATIERES	5
TABLE DES FIGURES	8
LISTE DES ABREVIATIONS	11
INTRODUCTION	13
AVANT PROPOS	13
CHAPITRE 1 : LA FORMATION DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL	14
A. L'INDUCTION NEURALE PUIS LA NEURULATION SONT A L'ORIGINE DE LA FORMATION DU TUBE NEURAL	15
B. FORMATION DE LA MOELLE EPINIÈRE	16
B.1 <i>Structure et fonction de la moelle épinière adulte</i>	16
B.2 <i>Mise en place des domaines de progéniteurs et neurones spinaux</i>	17
B.3 <i>Spécification par les facteurs de transcription</i>	19
C. FORMATION DU CORTEX CEREBRAL	20
C.1 <i>Généralités</i>	20
C.2 <i>La formation des couches neuronales dans le cortex</i>	23
C.3 <i>Les progéniteurs corticaux</i>	25
C.3.1 Les progéniteurs apicaux.....	25
C.3.2 Les progéniteurs basaux.....	28
C.3.3 Les progéniteurs subapicaux (SAP).....	29
C.4 <i>Mise en place du cortex : de la spécification des progéniteurs à la production des neurones</i>	29
C.4.1 Régionalisation du cortex.....	30
C.4.1 Transition entre les types de progéniteurs et modes de division.....	32
C.4.2 Spécification transcriptionnelle dans les progéniteurs et neurones corticaux.....	33
C.4.3 Temporalité de la corticogenèse	35
D. MECANISMES DE REGULATION DE LA NEUROGENESE	36
D.1 <i>Structure subcellulaire des progéniteurs</i>	36
D.1.1 Le rôle du fuseau mitotique	36
D.1.2 L'asymétrie des composants subcellulaires	37
D.1.3 Régulation de la production des bRGs	39
D.1.4 Importance du mouvement nucléaire intercinétique	40
D.2 <i>Régulation par les voies de signalisation</i>	42
D.2.1 Rôle de la voie Sonic hedgehog	42
D.2.2 Implication de la voie Notch.....	43
D.2.3 Régulation par les BMPs.....	44
D.2.4 Régulation par la voie Wnt	45
D.2.5 Rôle des FGFs	46
D.1 <i>Rôle de l'environnement des progéniteurs</i>	46
D.1 <i>Régulation post-transcriptionnelle et modifications épigénétiques</i>	47
CHAPITRE 2 : ROLE DU CYCLE CELLULAIRE DANS LA REGULATION DE LA NEUROGENESE	49
A. LE CYCLE CELLULAIRE ET SA REGULATION	49
B. REGULATIONS CROISEES ENTRE LE CYCLE CELLULAIRE ET LES GENES PRONEURaux	51
C. PHASES DU CYCLE ET DESTIN CELLULAIRE	53

C.1	<i>Régulation directe de la neurogenèse par les composants de la machinerie du cycle cellulaire</i>	54
C.1.1	Cyclines.....	54
C.1.2	Inhibiteurs des CDKs.....	55
C.1.3	La protéine du Rétinoblastome Rb.....	57
C.1.4	Géminine.....	57
C.2	<i>Rôle de la cinétique du cycle dans le destin cellulaire</i>	57
C.2.1	Phase M.....	58
C.2.2	Phase G1.....	59
C.2.3	Phase S.....	61
C.2.4	Phase G2.....	61
CHAPITRE 3 : LA PHOSPHATASE CDC25B EST UN REGULATEUR DE LA TRANSITION G2/M ET DE LA NEUROGENESE		64
A.	LA FAMILLE DES PHOSPHATASES CDC25s	64
A.1	<i>Régulation et fonction des CDC25s au cœur de la cellule</i>	64
A.2	<i>CDC25s et cancers</i>	66
A.3	<i>Rôle des phosphatases CDC25s au cours de l'embryogenèse et chez l'adulte</i>	68
A.3.1	Patron d'expression tissulaire des CDC25s.....	68
A.3.2	Les modèles murins mutants pour les CDC25s.....	69
B.	ROLE DE CDC25B DANS LE DEVELOPPEMENT DU SYSTEME NERVEUX.....	70
B.1	<i>La phosphatase CDC25B</i>	71
B.2	<i>La phosphatase CDC25 régule la neurogenèse spinale dans l'embryon de poulet</i>	74
B.3	<i>CDC25B pourrait être un régulateur de la neurogenèse chez les mammifères</i>	76
OBJECTIFS : DETERMINER LE ROLE DE CDC25B DANS LA NEUROGENESE SPINALE ET CORTICALE CHEZ LES MAMMIFERES		79
RESULTATS		80
A.	PARTIE 1 : LA PHOSPHATASE CDC25B EST NECESSAIRE POUR PRODUIRE EFFICACEMENT DES NEURONES DANS LA MOELLE EPINIERE EN DEVELOPPEMENT DE SOURIS	80
A.1	<i>L'expression de Cdc25b corrèle avec la dynamique de la neurogenèse spinale</i>	80
A.2	<i>Choix de la fenêtre temporelle d'analyse</i>	80
A.3	<i>La perte de fonction de Cdc25b augmente la durée de la phase G2 sans affecter le taux de prolifération des progéniteurs spinaux</i>	82
A.4	<i>La perte de fonction de Cdc25b diminue le nombre d'interneurones dorsaux</i>	84
B.	PARTIE 2 : LA PHOSPHATASE CDC25B EST NECESSAIRE POUR PRODUIRE EFFICACEMENT DES PROGENITEURS BASAUX DANS LE CORTEX CEREBRAL (ROUSSAT ET AL. EN PREPARATION).....	89
B.1	<i>Cdc25b est exprimé dans les progéniteurs aRGs Pax6+</i>	89
B.2	<i>La perte de fonction de CDC25B augmente fortement la durée de la phase G2 sans affecter la durée totale du cycle cellulaire des aRGs</i>	90
B.3	<i>Cdc25b régule le ratio de progéniteurs basaux</i>	93
B.4	<i>La perte de fonction de Cdc25b semble modifier l'angle de division des progéniteurs corticaux</i> ...	98
B.5	<i>Les changements des paramètres du cycle causent le déséquilibre des progéniteurs corticaux dans les embryons mutants pour Cdc25b.</i>	100
C.	RESULTATS SUPPLEMENTAIRES.....	102
C.1	<i>Analyse de la lignée Emx1-Cre x Cdc25b^{fl/-}</i>	102
C.2	<i>Mise au point d'un outil pharmacologique pour moduler la longueur de la phase G1</i>	105
DISCUSSION		108
A.	DANS LA MOELLE EPINIERE DE SOURIS, CDC25B REGULE LA PRODUCTION DES NEURONES DORSAUX.....	108
B.	DANS LE CORTEX MURIN EN DEVELOPPEMENT, CDC25B REGULE LE RATIO DE PROGENITEURS BASAUX PAR UNE MODIFICATION DE LA LONGUEUR DE LA PHASE G2.....	110

B.1	<i>Dans les mutants $Cdc25b^{nesKO}$, le nombre de bIPs est diminué alors que les bRGs sont augmentés</i>	110
B.2	<i>Le déroulement du cycle cellulaire est modifié dans les mutants $Cdc25b$</i>	112
B.3	<i>Hypothèse concernant le mécanisme d'action de $Cdc25b$ durant la neurogenèse</i>	113
B.3.1	<i>Par les voie de signalisation</i>	113
B.3.2	<i>Par la régulation du centrosome</i>	115
B.3.3	<i>Par d'autres substrats</i>	116
C.	ELEMENTS POUVANT ATTENUER LE PHENOTYPE DANS LES EMBRYONS $CDC25B^{nesKO}$	116
C.1	<i>Variabilité du fond génétique</i>	116
C.2	<i>Compensation génétique</i>	117
C.3	<i>Efficacité de la lignée Nestin-Cre et comparaison avec la lignée Emx1-Cre</i>	118
D.	IMPORTANCE DE L'INTERACTION DE CDC25B/CDK1 DANS LA REGULATION DE LA NEUROGENESE	120
E.	ASPECTS EVOLUTIFS	121
	CONCLUSION	122
	MATERIEL ET METHODES	123
	LIGNEES GENETIQUES MURINES	123
	<i>Lignées perte de fonction conditionnelle de $CDC25B$</i>	123
	<i>Lignée Tis21-GFP</i>	124
	<i>Lignée Rosa-Tomato</i>	124
	DETERMINATION DU GENOTYPE DES EMBRYONS	124
	IMMUNOFLUORESCENCE	124
	HYBRIDATION IN SITU	125
	MESURE DES PARAMETRES DU CYCLE CELLULAIRE	126
	ANALYSES PAR CYTOMETRIE DE FLUX	127
	CONSTRUCTIONS ADN ET ELECTROPORATION IN UTERO	127
	IMAGERIE ET ANALYSES STATISTIQUES	128
	MESURE DE L'ORIENTATION DES DIVISIONS	128
	TRAITEMENT AU PALBOCICLIB PAR GAVAGE	129
	ANNEXES	130
	REFERENCES	231

Table des figures

Figure 1: Le système nerveux central est constitué du cerveau et de la moelle épinière.....	14
Figure 2: Schématisation de la neurulation.	15
Figure 3: Représentation schématique d'une coupe transversale de moelle épinière au stade E18 chez la souris.	16
Figure 4: Schéma d'une coupe transversale de tube neural.....	17
Figure 5: Combinatoire d'expression des facteurs de transcription dans les progéniteurs et les neurones spinaux.	18
Figure 6 : Comparaison de la taille du cerveau entre différentes espèces de mammifères ...	22
Figure 7: Le cortex cérébral est subdivisé en lobes corticaux.....	22
Figure 8: Coupes frontales de cerveau adulte humain et murin.	22
Figure 10 : Les neurones glutamatergiques corticaux projettent des axones dans différentes parties du cerveau.....	23
Figure 9 : Représentation des différents types de neurones retrouvés dans le cortex cérébral adulte.....	23
Figure 11: Représentation schématique de la génération des neurones de projection au cours de la corticogenèse chez la souris.....	24
Figure 12: Diversité des progéniteurs corticaux. Schématisation de la structure cellulaire d'un aRG, bRG et bIP.	26
Figure 13: Schématisation des différentes morphologies existantes chez les progéniteurs corticaux.	27
Figure 14 : Schématisation des mouvements nucléaires réalisés par les aRGs et les bRGs au cours du cycle cellulaire.	29
Figure 16: Résumé des mécanismes génétiques impliqués dans la régionalisation des aires du cortex, et phénotypes mutants.....	30
Figure 15: Localisation des signaux morphogènes dans le télencéphale en développement.	30
Figure 17: Mécanisme spatial de la spécification neuronale dans le télencéphale.....	31
Figure 18: Les neurones des couches corticales sont spécifiés par une combinatoire de facteurs de transcription au cours de l'embryogenèse et chez l'adulte.....	34
Figure 19: Rôle de l'organisation subcellulaire dans le destin des cellules filles.....	38
Figure 20: Hypothèse du rôle du fuseau mitotique dans le destin des cellules filles corticales	40
Figure 21: Déroulement du mouvement nucléaire intercinétique et sa régulation moléculaire	41
Figure 22 : Schématisation de la voie Hedgehog.	42
Figure 23 : Schématisation de la voie Notch.....	43
Figure 24 : Schématisation de la voie BMP.....	44
Figure 25 : Schématisation de la voie Wnt.....	45
Figure 26 : Schématisation de la voie FGF.	46
Figure 27: Illustration schématique des sources de signaux externes qui influencent les cellules du cortex.....	47

Figure 28 : Représentation schématique du cycle cellulaire et des complexes Cycline-CDK et RB/E2F qui contrôlent les transitions.....	49
Figure 29 : Les Cyclines sont différenciellement exprimées au cours du cycle cellulaire.	50
Figure 30 : Etapes d'activation d'un complexe Cycline-CDK.	51
Figure 31: Transition temporelle de l'expression des facteurs de transcription dans les neuroblastes chez la drosophile.....	54
Figure 32 : Résumé graphique des effets du rallongement de la phase M par la perte de fonction de Magoh.	59
Figure 33: (a) Arbre phylogénétique des orthologues des phosphatases CDC25s. (b) Structure protéique des CDC25s et variants d'épissage.	65
Figure 34 : Surexpression des protéines CDC25s dans les cancers chez l'Humain.....	67
Figure 35:Schéma de la protéine CDC25B.....	71
Figure 36 : Régulation de la phosphatase CDC25B au niveau de la protéine, et dans les différents compartiments de la cellule.	72
Figure 37: Comportement du centriole, du centrosome et du cil primaire pendant le cycle cellulaire	73
Figure 38 : L'expression de CDC25B corrèle avec les domaines neurogéniques pendant le développement de la moelle épinière de poulet.....	75
Figure 39 : Résumé graphique des conséquences de la perte de fonction de Mcph1 sur le mode de division des progéniteurs corticaux.	78
Figure 40: Progression spatio-temporelle du patron d'expression de Cdc25b dans le tube neural de souris.....	80
Figure 41: Résumé graphique illustrant le choix des stades embryonnaires d'analyse..	81
Figure 42: La perte de fonction conditionnelle de Cdc25b augmente la durée de la phase G2 dans le tube neural.....	82
Figure 43: La perte de fonction de Cdc25b n'affecte pas le taux de prolifération..	84
Figure 44: La perte de fonction conditionnelle de Cdc25b réduit le nombre d'interneurones dorsaux Pax2 ⁺ et Tlx3 ⁺	85
Figure 45: La perte de fonction conditionnelle de CDC25B n'induit pas d'apoptose dans le tube neural..	86
Figure 46: La proportion de progéniteurs Tis21 ⁺ n'est pas modifiée dans les embryons Cdc25b ^{nesKO}	87
Figure 47: La perte de fonction conditionnelle de Cdc25b modifie la densité des progéniteurs dorsaux.	88
Figure 48: Cdc25b est spécifiquement exprimé dans les cellules Pax6 ⁺ aRGs.....	89
Figure 49: Mesure de la durée de la phase G2 au cours de la corticogenèse dans les aRGs d'embryons CTL et Cdc25b ^{nesKO}	91
Figure 50: La perte de fonction de Cdc25b n'affecte pas le taux de prolifération ni la durée totale du cycle cellulaire des aRGs.....	92
Figure 51 : Cdc25b régule le ratio de progéniteurs basaux.	94

Figure 52 : La diminution du nombre de bIPs dans les embryons <i>Cdc25b^{nesKO}</i> n'est pas due à une augmentation de l'apoptose ou une diminution de leur prolifération.	95
Figure 53 : Le nombre de neurones produits à E16,5 n'est pas significativement modifié dans les embryons <i>Cdc25b^{nesKO}</i>	96
Figure 54 : La taille du cortex n'est pas affecté dans les individus <i>Cdc25b^{nesKO}</i> au stade post-natal P0.....	97
Figure 55 : La proportion de divisions neurogéniques n'est pas modifiée dans les cortex mutants <i>Cdc25b^{nesKO}</i>	98
Figure 56 : La perte de fonction de <i>Cdc25b</i> semble modifier l'orientation du fuseau mitotique lors des divisions apicales.....	99
Figure 57 : <i>Cdc25b</i> contrôle le ratio de progéniteurs basaux à travers son interaction avec CDK1.	100
Figure 58 : La longueur de la phase G2 est augmentée dans les embryons <i>Cdc25b^{emx1KO}</i>	102
Figure 59 : La corticogenèse est modifiée dans les embryons <i>Cdc25b^{emx1KO}</i>	103
Figure 60 : Le nombre de neurone <i>Tbr1+</i> est augmenté à E16,5 dans les embryons <i>Cdc25b^{emx1KO}</i>	104
Figure 61 : L'administration de Palbociclib par gavage ne semble pas induire un rallongement de la phase G1.....	106
Figure 62 : Arbre phylogénétique simplifié de la Classe des oiseaux Aves.....	110
Figure 63 : La voie Notch est activée dans la zone ventriculaire de la rétine selon un gradient apico-basal.....	114
Figure 64 : Hybridation in situ de chaque phosphatase <i>Cdc25</i> dans le tube neural murin (coupes transversales au niveau brachial à E9,5) et dans le cortex cérébral (coupes frontales à E14,5).....	117
Figure 65 : Progression temporelle du phénotype observé en croissant les souris <i>Cdc25b^{fl/fl}</i> avec la lignée <i>Nestin-Cre</i> ou la lignée <i>Emx1-Cre</i>	119
Figure 66: Estimation de la longueur de la phase G2 par la méthode du paradigme du pourcentage de mitose marquée.....	126

Liste des abréviations

3' UTR	3' Untranslated Transcribed Region
ADN	Acide Désoxyribonucléique
aIP	apical Intermediate Progenitor / progéniteurs intermédiaires apicaux
Ajs	Jonctions adhérentes
APC/C	Anaphase Promoting Complex or Cyclosome
aRG	apical Radial Glia / progéniteur de la glie radiaire
ARN	Acide RiboNucléique
ARNi	ARN interférent
ARNm	ARN messenger
Ascl1	Achaete-scute homolog 1
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	ATM- and RAD3-related
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
bIP	basal Intermediate Progenitor / progéniteur basal intermédiaire
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BP	Progéniteurs Basaux
BrdU	Bromo-desoxy-uridine
bRGs	basal Radial Glia / cellule de la glie radiaire basale
CDC25	Cell division cycle 25
CDCA2	Cell division cycle-associated protein 2
CDKs	cyclin dependant kinases
CHK1	Chek1
Cip/Kip	CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein
CKIs	Cyclin-dependant Kinase Inhibitor
CP	Plaque Corticale
CR	Cajal-Retzius
Ctip2	Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-interacting protein 2
Cux2	Cut-like homeobox 2
D/V	Dorso/Ventral
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
dIL	dorsal Intermediate
EdU	5-Ethynyl-2'-deoxyuridine
Emx1/2	Empty spiracles homologue 1/2
ESC	Embryonic Stem Cell
FGF	Fibroblast growth factor
Foxg1	Forkhead box G1
FSC/SSC	Forward SCatter/Side SCatter
GABA	γ -aminobutyric acid
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
Gli	GLI family zinc finger
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase 3 β
HDAC3	Histone deacetylase 3
Hes	Hairy-Enhancer of Spilt
Hh / Shh	Hedgehog / Sonic Hedgehog
INK4	INhibitors of CDK4

INM	Mouvement Nucléaire Interinétique
IZ	Zone Intermédiaire
Lbx1	Ladybird homeobox 1
LEF/TCF	T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor
LGN	G-protein-signaling modulator 2
Lhx2	LIM homeobox 2
lncARN	ARN long non codant
LRP5/6	Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6
Math1	mouse ATonal Homolog 1
MCPH1	Microcephalin-1
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MEFs	Mouse embryonic fibroblast
MN	MotoNeurone
MST	Mitotic soma translocation
MZ	Zone Marginale
NEC	NeuroEpithelial Cell / Cellules neuroépithéliales
Neurog2	Neurogenin 2
NLS	Signal de localisation nucléaire
Olig2	Oligodendrocyte transcription factor 2
oRG	outer Radial Glia
p53	tumor protein 53
Par3/6	Partitioning defective protein 3/6
Pax	Paired box 6
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGK	PhosphoGlycérate Kinase
P-H3	Phosphorylated Histone 3
PKA	Protein Kinase A
PLK1	Polo-Like Kinase 1
PLM	Pourcentage des mitoses marquées
pMN	Progéniteurs des motoneurones
Ptch1	Patched1
RB	Protéine du rétinoblastome
SAP	SubApical Progenitor / Progéniteurs subapicaux
Satb2	Special AT-rich sequence binding protein 2
SMAD1/5	Mothers Against Decapentaplegic Homolog 1/5
Smo	Smoothened
SNC	Système Nerveux Central
Sox5	Sex determining region Y-box 5
SP	Sous-Plaqué
SVZ	Zone Sous-Ventriculaire
Tbr1/2	T-box brain factor 1/2
TGF β	Transforming Growth Factor β
Tis21 (Btg2)	BTG anti-proliferation factor 2
Tlx3	T-cell leukemia homeobox protein 3
VZ	Zone Ventriculaire
Wnt	Wingless INTegration site

Introduction

Avant propos

La biologie du développement a pour but de décrypter les mécanismes qui permettent à la cellule œuf, ou zygote, de devenir un organisme multicellulaire fonctionnel.

Le zygote va d'abord passer par une étape de divisions cellulaires intenses, puis va s'organiser en trois grands feuillettes cellulaires qui généreront les différents organes lors de la morphogenèse. Ces grandes étapes du développement embryonnaire nécessitent une fine régulation de leur déroulement au cours du temps et dans l'espace.

Comment le système contrôle-t-il l'équilibre entre la prolifération des cellules souches et le moment où elles vont quitter l'état souche pour se différencier en cellules matures et fonctionnelles ? Cette question est d'importance majeure, tant pour comprendre comment est maintenu l'homéostasie tissulaire dans un organisme en croissance, mais aussi dans un contexte pathologique pour comprendre l'origine de certaines maladies comme le cancer.

A travers le cycle cellulaire, les cellules souches vont se diviser pour produire soit de nouvelles cellules souches qui vont rester dans le cycle, soit des cellules matures qui dans la plupart des cas, quittent le cycle et ne se diviseront plus. Comment se fait ce choix à l'issue d'une division est encore une question ouverte. Néanmoins, un nombre croissant d'études montre que le déroulement du cycle cellulaire est un paramètre important pour réguler le devenir des cellules.

Un excellent paradigme pour étudier cette question est le système nerveux central embryonnaire. Cet organe est subdivisé en différentes régions dont la complexité varie en termes de structure tissulaire, de type cellulaire et de développement.

Au cours de ma thèse, j'ai étudié la fonction d'un régulateur du cycle cellulaire, la phosphatase CDC25B, dans deux régions du système nerveux central, la moelle épinière et le cortex cérébral en développement. Dans un premier chapitre sera décrite la formation du système nerveux central et plus particulièrement de la moelle épinière et du cortex ; dans un deuxième chapitre, je parlerais de l'état des connaissances du rôle du cycle cellulaire dans la régulation de la neurogenèse ; enfin dans un dernier chapitre seront exposées la nature et les fonctions déjà connues de la phosphatase CDC25B.

Chapitre 1 : La formation du système nerveux central

Le système nerveux central est l'organe qui coordonne les actions avec l'environnement extérieur et la communication entre les différentes parties du corps. L'encéphale, dans la partie antérieure, est le siège des fonctions cognitives et centralise le fonctionnement des autres organes en réponse aux variations environnementales. La moelle épinière, dans la partie postérieure, a pour fonction de transmettre les messages nerveux entre le cerveau et le reste du corps (**Figure 1**).

Les neurones, ou cellules nerveuses, sont l'unité de base du système nerveux central et assurent la transmission nerveuse via l'échange de signaux bioélectriques entre le corps cellulaire, ou soma, et des prolongations cytoplasmiques appelées axones (émetteurs) et dendrites (récepteurs). On retrouve deux grands types de neurones, les neurones excitateurs glutamatergiques et les neurones inhibiteurs GABA (γ -aminobutyric acid)-ergiques. Les cellules gliales sont le deuxième composant majeur du système nerveux et regroupent les astrocytes, les oligodendrocytes et la microglie. Elles assurent une fonction de support du tissu nerveux via la protection des neurones, l'apport en nutriment et en oxygène et la défense immunitaire. Les neurones et les cellules gliales ont une origine commune puisqu'elles sont issues de cellules souches neurales – ou progéniteurs neuraux – au cours de processus appelés respectivement neurogenèse et gliogenèse (**Figure 1**).

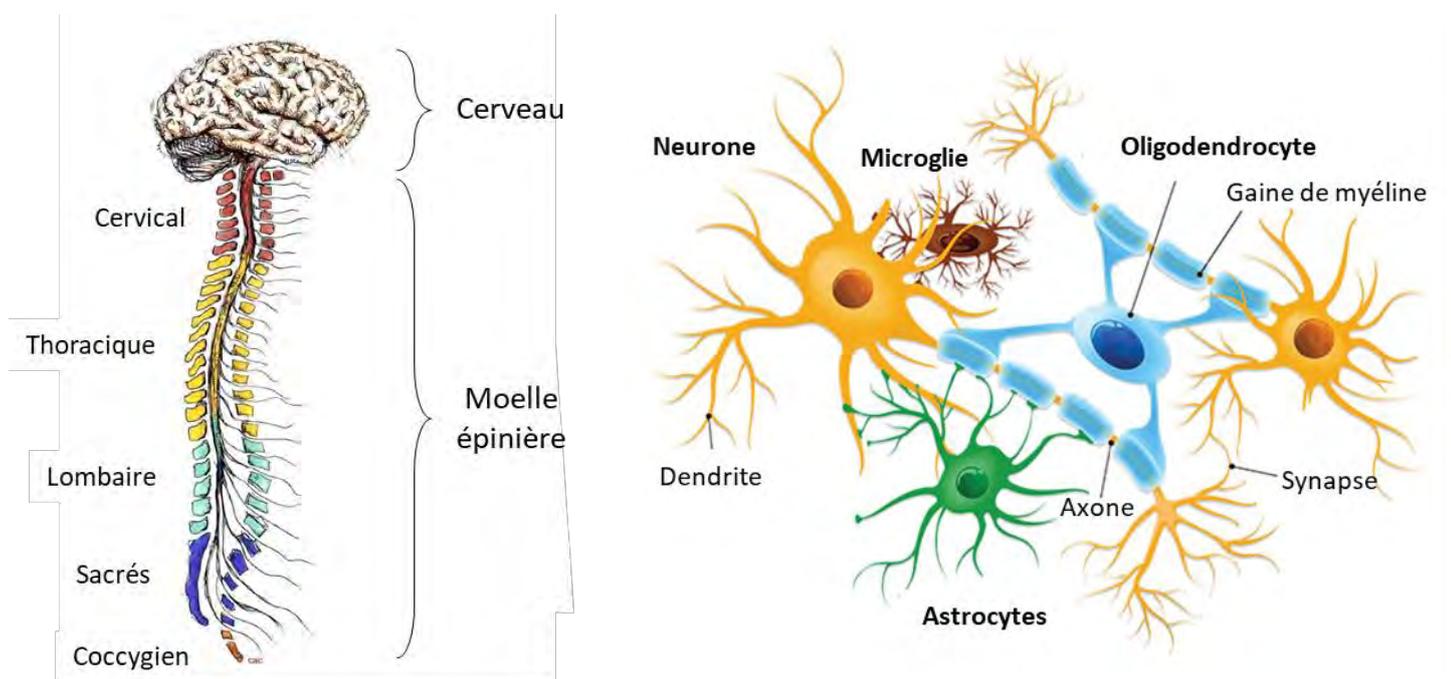


Figure 1: Le système nerveux central est constitué du cerveau et de la moelle épinière. Il contient des cellules nerveuses, ou neurones, et trois catégories de cellules gliales, les astrocytes, les oligodendrocytes et la microglie.

A. L'induction neurale puis la neurulation sont à l'origine de la formation du tube neural

Les Vertébrés sont des organismes triploblastiques, ce qui signifie que l'ensemble des organes sont issus de trois feuillet embryonnaires : l'endoderme en profondeur, le mésoderme en intermédiaire et l'ectoderme en surface. Le système nerveux provient d'une partie de l'ectoderme qui se différencie *par défaut* en neurectoderme sous l'influence de signaux provenant du mésoderme. Le mésoderme axial exprime les gènes *noggin*, *chordin*, *follistatin* et *cerberus* selon un gradient. Ils induisent les régions de type prosencéphale dans la partie la plus antérieure. Un second signal est transmis depuis la lèvre blastoporale (ou ligne primitive chez les oiseaux et mammifères) pour induire les régions plus postérieures via le FGF (fibroblast growth factor) et l'acide rétinoïque. Ces signaux inducteurs neuraux agissent en inhibant BMP4 (bone morphogenetic protein 4), protéine inductrice de l'épiderme et inhibitrice de la différenciation neurale (Foucrier and Le Moigne).

Le neurectoderme, ou plaque neurale, va ensuite subir des transformations morphogénétiques. Les bords latéraux de la plaque neurale s'épaississent pour former les bourrelets neuraux, qui vont se soulever, entraînant une courbure de la plaque neurale puis la formation d'une gouttière neurale. Les bourrelets neuraux finissent par fusionner pour alors donner naissance au tube neural, structure à l'origine du système nerveux central (**Figure 2**). Le tube neural se ferme progressivement de la partie antérieure vers la partie postérieure de l'embryon. Ainsi à un âge donné de l'embryon, les différentes régions le long de l'axe antéro-postérieur ne sont pas au même stade développemental (Foucrier and Le Moigne).

En région antérieure et de par l'induction du mésoderme axial, le tube neural va former trois vésicules – le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale – qui donneront respectivement chez l'adulte le cerveau, le tronc cérébral et le cervelet. La région plus postérieure du tube neural deviendra la moelle épinière, elle-même régionalisée en tronçons cervicaux, brachiaux, thoraciques et lombaires (Foucrier and Le Moigne).

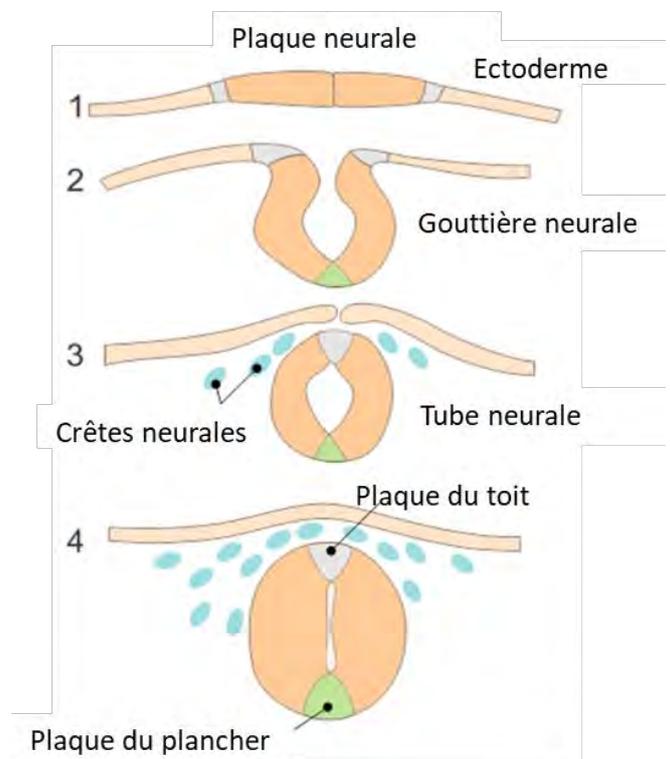


Figure 2: Schématisation de la neurulation. (Butler and Bronner, 2015)

B. Formation de la moelle épinière

Dans cette partie, je vais développer la fonction de la moelle épinière adulte et décrire sa formation chez les Vertébrés, en mettant l'accent chez les Mammifères. Le terme tube neural fait ici référence à sa partie postérieure, c'est-à-dire à la moelle épinière embryonnaire.

B.1 Structure et fonction de la moelle épinière adulte

La moelle épinière se compose d'une corne ventrale, contenant les neurones moteurs, et d'une corne dorsale, contenant les interneurons sensoriels (**Figure 3**).

Les neurones moteurs cholinergiques sont essentiels pour le mouvement des membres et du tronc. Ils sont regroupés en différentes classes, leur fonction étant définie par leur position dans la corne ventrale. Ils envoient des projections axonales en dehors de la corne ventrale pour innerver la musculature du tronc et des membres (Butler and Bronner, 2015).

Les interneurons dorsaux sont impliqués dans le relai des informations sensorielles. Ils forment trois populations dans la corne dorsale. Les neurones de la proprioception sont l'ensemble des récepteurs, voies et centres nerveux impliqués dans la somesthésie, qui est la perception du soi. Les neurones nocicepteurs traitent les informations associées au toucher, à la douleur et à la chaleur. Enfin les neurones mécanorécepteurs modulent les sorties des motoneurons et contrôlent les réflexes (Müller et al., 2002). Il y a deux vagues de genèse des neurones dorsaux. La vague précoce produit les neurones relais et sensoriels qui vont migrer dans les régions profondes de la moelle épinière. La vague tardive produit les neurones d'association qui migrent dans les régions superficielles (Mizuguchi et al., 2006a).

La moelle épinière communique directement avec le ganglion spinal, un renflement qui contient les corps cellulaires des interneurons sensoriels (produits par les cellules des crêtes neurales, ils appartiennent au système nerveux périphérique). Ces interneurons peuvent être excitateurs ou inhibiteurs et réalisent des connexions afférentes qui se projettent sur les différentes couches de neurones de la moelle épinière. Ils relaient ainsi les informations sensorielles au système nerveux central (Ding et al., 2004).

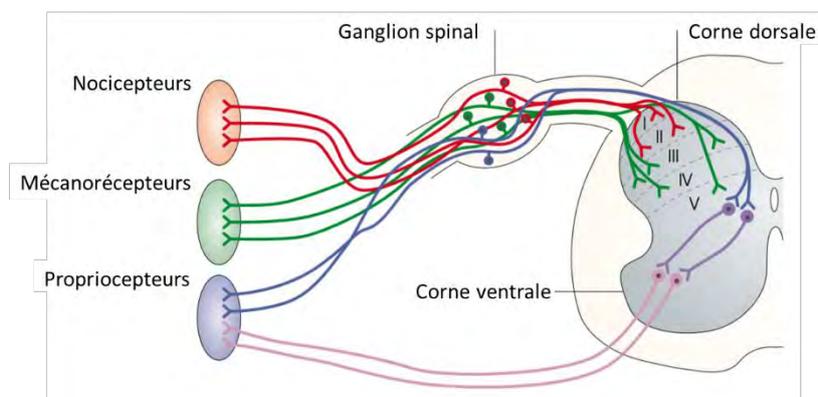


Figure 3: Représentation schématique d'une coupe transversale de moelle épinière au stade E18 chez la souris. (Caspary and Anderson, 2003a)

B.2 Mise en place des domaines de progéniteurs et neurones spinaux

Le tube neural est un tissu épithélial pseudostratifié. La zone ventriculaire, qui borde la lumière du tube, contient des progéniteurs neuraux qui structurent le tissu par leur morphologie de glie radiaire. Les progéniteurs suivent tous le même parcours générique au cours de la neurogenèse. Ils prolifèrent dans la zone ventriculaire. Lorsqu'ils s'engagent vers un destin neuronal, ils répriment le destin de glie radiaire, arrêtent de proliférer et passent par une étape intermédiaire de précurseurs neuraux. Puis ils se différencient en neurones en migrant vers la zone du manteau. **(Figure 4)**. Ces différentes étapes sont contrôlées par les gènes proneuraux, facteurs de transcription contenant un domaine bHLH (basic Helix Loop Helix) nécessaires et suffisants pour induire la différenciation neuronale. Chez les Vertébrés, plusieurs sous-familles de proneuraux ont été mises en évidence : les achaete-scute (*Mash1/Ascl1*), les atonal (*Atoh1/7, Math 1/5*) et les Neurogénines (*Ngn1/2/3*) (Bertrand et al., 2002).

En parallèle, selon leur position le long des axes antéro-postérieur et dorso-ventral, les progéniteurs acquièrent une identité spécifique, à l'origine d'identité et de fonctions neuronales spécialisées. L'acquisition des différentes identités neuronales le long de l'axe antéro-postérieur est contrôlée par les gènes homéotiques HOX qui sont régulés par les voies de l'acide rétinoïque, du FGF et de la voie WNT (Philippidou and Dasen, 2013). Dans l'axe dorso-ventral, la zone ventriculaire est subdivisée en onze domaines de progéniteurs **(Figure 5)**. Chacun de ces groupes de progéniteurs exprime des combinaisons de facteurs de transcription spécifiques en fonction de leur position le long de l'axe dorso-ventral.

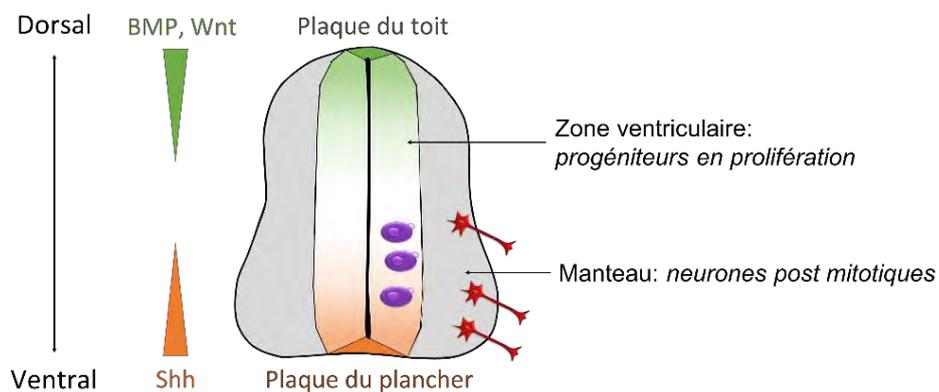


Figure 4: Schéma d'une coupe transversale de tube neural. Les cellules mauves sont des progéniteurs, les rouges des neurones.

Dans la partie ventrale, l'expression régionalisée de ces facteurs de transcription est dépendante du morphogène Shh (Sonic Hedgehog), produit par la plaque du plancher et la notochorde. La signalisation Shh/Gli régule spatialement l'expression de facteurs de transcription de type homéodomaine (HD) et à domaine bHLH, responsables de la mise en place des cinq domaines de progéniteurs p0-p3 et pMN, d'où émergent les cinq types de neurones ventraux : les motoneurones MNs et les interneurones ventraux V3 à V0. Les

neurones ventraux sont les premiers neurones spinaux qui se différencient au cours de la neurogenèse spinale (chez la souris ils sont produits entre E9 et E11) (Ribes and Briscoe, 2009).

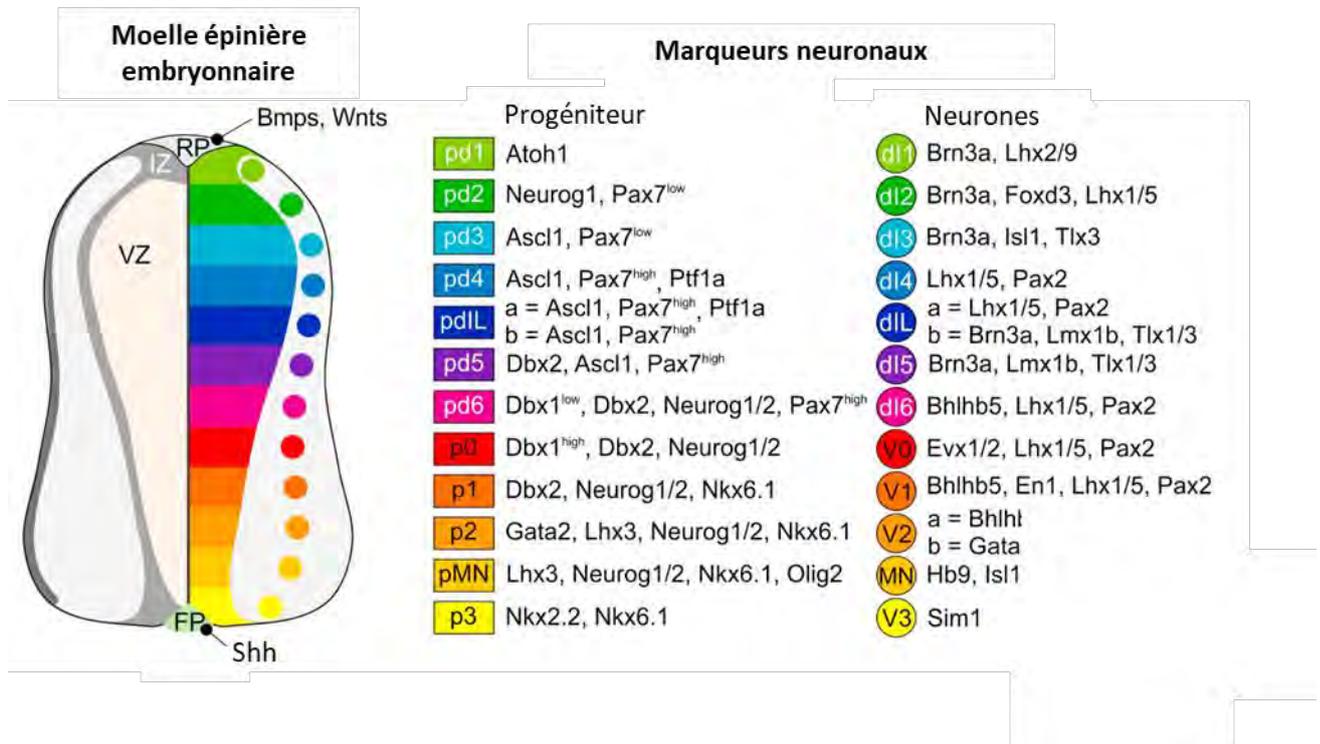


Figure 5: Combinatoire d'expression des facteurs de transcription dans les progéniteurs et les neurones spinaux. RP : plaque du toit, FP : plaque du plancher, VZ : zone ventriculaire, IZ : zone intermédiaire. (Butler and Bronner, 2015)

Dans la partie dorsale, les domaines de progéniteurs acquièrent leur identité sous l'influence de signaux produits par la plaque du toit. On retrouve les membres de la famille des TGF β (Transforming Growth Factor β) tel que les BMP (bmp4, bmp5, bmp7), gdf7 (Growth Differentiation Factor), ou de la voie Wnt (wnt1, wnt3a) (Helms and Johnson, 2003a)(Caspary and Anderson, 2003b). Ces signaux spécifient les progéniteurs dorsaux dp1 à dp6 qui vont produire huit types d'interneurones sensoriels, mais seules les trois populations les plus dorsales dl1 à dl3 (Classe A) sont sous l'influence des morphogènes. Les populations plus ventrales, dl4 à dl6 et dIL^{A/B} (Classe B), se mettent en place indépendamment de ces signaux. En effet, l'ablation de la plaque du toit par expression sélective de la toxine diphtérique résulte en une perte des neurones dl1-3 et de leurs progéniteurs dorsaux (Helms and Johnson, 2003b; Müller et al., 2002). Il se pourrait que ces domaines soient mis en place par des signaux venant d'autres sources comme le mésoderme paraxial, ou via d'un mécanisme cellulaire autonome en l'absence de signaux venant de la plaque du toit et du plancher (Zhuang and Sockanathan, 2006). Les interneurones dorsaux sont produits durant deux vagues de neurogenèse. Chez la souris, les dl1 à dl6 sont produits entre E10-E12,5 et les dIL^A et dIL^B entre E11-E13 (Helms and Johnson, 2003b).

B.3 Spécification par les facteurs de transcription

La spécification des populations neuronales se fait par la combinatoire des facteurs de transcription à domaine bHLH (tels que *Olig2*, *Math1*, *Ngn1*, *Ascl1*) et à homéodomaine (comme *Pax6/7*, *Lbx1*, *Tlx3*, *Drg11*) (Helms and Johnson, 2003a). L'émergence d'un type cellulaire particulier est due à la répression de destin cellulaire alternatif. Par exemple dans la région ventrale, les progéniteurs des motoneurones expriment plusieurs facteurs qui agissent comme répresseur : *Pax6* et *Nkx6* préviennent l'expression de gènes capables de réprimer *Olig2*, qui agit lui-même comme répresseur de régulateur négatif des protéines *Mnx* (*Mnr2*, *Hb9*) et LIM (*Isl1/2*, *Lim3*), spécifiques des motoneurones. En parallèle, l'acide rétinoïque joue un rôle d'activateur transcriptionnel en activant *Pax6* puis *Olig2* et enfin *Mnr2*, *Hb9* et *Isl1* (Wilson and Maden, 2005).

Dans les progéniteurs ventraux, les facteurs de transcription peuvent être subdivisés en deux catégories basées sur leur mode de régulation par *Shh* : les gènes de classe I sont réprimés par *Shh* (*Pax6*, *Pax7*, *Irx3* et *Dbx1/2*) alors que les gènes de classes II sont activés par *Shh* (*Nkx2.2*, *Nkx6.1*, *Nkx2.9*, *Olig2*) (Briscoe and Ericson, 2001). Les domaines d'expression de ces facteurs de transcription sont ensuite affinés par le biais de régulations croisées. En effet, les facteurs de classe I et de classe II se répriment mutuellement. Par exemple, si *Pax6* (gène de classe I) est exprimé ectopiquement dans des régions ventrales du tube neural de poulet (*Gallus gallus*), *Nkx2.2* (gène de classe II) est réprimé. A l'inverse si *Nkx2.2* est exprimé dorsalement, *Pax6* est réprimé (Briscoe et al., 2000; Ericson et al., 1997). Différentes combinaisons de facteurs de transcription définissent ainsi les cinq domaines de progéniteurs [p0 (*Dbx1*, *Dbx2*, *Irx3* et *Pax6*), p1 (*Dbx2*, *Irx3* et *Pax6*), p2 (*Nkx6.1*, *Irx3* et *Pax6*), pMN (*Nkx6.1*, *Pax6* et *Olig2*), et p3 (*Nkx6.1* et *Nkx2.2*)] qui produiront les motoneurones MNs et les interneurones ventraux V3 à V0.

Les progéniteurs dorsaux sont caractérisés par l'expression de *Pax3* et *Pax7*. L'ablation de la plaque du toit réduit la taille du domaine de progéniteurs *Pax7*, au dépend du domaine plus ventral *Pax6* qui s'étend, et entraîne la perte des neurones issus des domaines *Math1*⁺ et *Ngn*⁺ (Helms and Johnson, 2003b). Comme expliqué plus haut, selon leur dépendance aux signaux morphogènes de la plaque du toit, les neurones dorsaux appartiennent à la Classe A-dépendant (dI1-3), ou à la Classe B-indépendant (dI4-6). Le facteur de transcription *Lbx1* est exprimé spécifiquement dans les neurones de la classe B dans lesquels il inhibe le destin classe A, puisque la perte de fonction de *Lbx1* entraîne une perte de l'identité des neurones de la Classe B, qui à la place adoptent les caractéristiques moléculaires et cellulaires des neurones de la classe A (Müller et al., 2002). De plus, les interneurones dorsaux sont catégorisés en deux groupes, les interneurones excitateurs glutamatergiques et les inhibiteurs GABAergiques, selon l'expression respective de *Tlx3* et *Pax2*. Ainsi, les neurones inhibiteurs dI4, dI6 et dIL^A expriment *Pax2*, alors que les neurones excitateurs dI3, dI5 et dIL^B expriment *Tlx3*. Aucun neurone ne co-exprime ces deux facteurs de transcription. Les neurones dIL^A et dIL^B sont issus du même domaine de progéniteur dpIL, et peuvent être issus d'un même progéniteur par division symétrique terminale (1 progéniteur donne 2 neurones) ou asymétrique proliférative

(1 progéniteur donne 1 neurone et 1 progéniteur). De façon intéressante, les neurones dIL^A sont toujours obtenus par division asymétrique (1 dIL^B + 1 dIL^A ou 1 progéniteur + 1 dIL^A) (Wildner et al., 2006a). Le domaine dplL est caractérisé par l'expression « poivre et sel » d'Ascl1. Au cours de la deuxième vague de neurogenèse, Ascl1 va activer transitoirement Ptf1a dans les progéniteurs qui réprimeront l'expression de facteurs spécifiques du destin glutamatergiques, et deviendront par défaut GABAergiques dIL^A (Glasgow et al., 2005). En parallèle, Ascl1 active l'expression de Delta, ce qui active la signalisation Notch dans les progéniteurs voisins et promeut le destin glutamatergique dans ces neurones (dIL^B). La perte de fonction de Ascl1 induit l'arrêt de production de neurone dIL^A, les cellules restant bloquées au stade progéniteur et entrent en apoptose. Ascl1 n'est cependant pas suffisant pour induire le destin dIL^A. (Wildner et al., 2006b). La dualité du rôle de Ascl1 permet ainsi de produire, au cours de la neurogenèse tardive, des neurones excitateurs et inhibiteurs à partir d'une même population de progéniteurs. (Mizuguchi et al., 2006b).

En plus de l'expression génique spatio-dépendante des domaines de progéniteurs et de neurones, il existe une composante temporelle. En effet, les neurones expriment une combinatoire de facteurs de transcription qui dépend du moment auquel ils sont nés. Les neurones vont être produits par vagues et former des strates. Quelle que soit leur position dorso-ventrale, les neurones nés à E9,5 expriment OneCut2, ceux nés à E11,5 expriment Pou2f2 et Zfh2-4, et les neurones nés entre E12,5 et E13,5 expriment Nfib et Neurod2 (Delile et al., 2019). De la même façon, les progéniteurs expriment une combinatoire de facteurs de transcription (différents des neurones) qui évolue au cours des stades embryonnaires. Il en résulte qu'au sein d'un domaine de neurones (par exemple les V3), il existe plusieurs sous-type neuronaux définis par l'expression de gènes spatio-dépendants (selon la position des neurones dans l'axe D/V) et temporo-dépendants (selon le stade de production) (Delile et al., 2019; Paridaen and Huttner, 2014a).

Pour conclure, la génération des neurones de la moelle épinière est finement régulée par l'action conjointe des voies de signalisation et de programmes transcriptionnels au cours du temps et dans l'espace.

C. Formation du cortex cérébral

C.1 Généralités

Le cortex cérébral désigne la couche cellulaire périphérique du télencéphale dorsal, la vésicule la plus antérieure de l'encéphale.

La structure du cortex a fortement évolué depuis son apparition dans les premières espèces craniées. L'archicortex est phylogénétiquement le plus ancien. Il constitue la partie majeure de l'encéphale des poissons et a pour fonction le traitement des informations olfactives et la gestion du cycle veille-sommeil. Ce tissu existe encore chez les mammifères dans les bulbes olfactifs. Le paléocortex est plus récent, il est composé de trois couches neuronales et est présent dans l'encéphale des reptiles et des oiseaux. Le néocortex, la partie la plus évoluée du cortex, avec l'apparition de six couches neuronales, est caractéristique des mammifères

puisqu'il est apparu chez leur ancêtre il y a 220 millions d'années. Depuis, il a subi une expansion indépendante dans différents lignages de mammifères, ce qui reflète une sélection positive de l'augmentation du nombre et de la complexité neuronale (**Figure 6**) (Van Essen et al., 2018). Le néocortex (qui sera dans la suite de ce texte nommé cortex par simplicité), atteint son expansion maximale chez l'humain, chez lequel il représente 80% de la masse du cerveau. Il est le siège de l'intelligence, l'apprentissage et serait à l'origine de la pensée. Chez certaines espèces, notamment les primates, le cortex est gyrencéphalique, c'est-à-dire qu'il forme des gyri (crêtes) et des sulci (fissures). En plus de minimiser le volume du cerveau, le repliement cortical est d'une importance capitale pour l'optimisation du réseau neuronal et pour son organisation fonctionnelle (Paridaen and Huttner, 2014a).

Le cortex est subdivisé en régions appelées lobes, eux-mêmes contenant des aires cérébrales ayant chacune une fonction cognitive spécifique. Le lobe frontal contient les aires impliquées dans la motricité, le comportement social, la composante motrice du langage, la planification et l'organisation intellectuelle. Le lobe pariétal contrôle les influx sensitifs, la sensibilité, la compréhension du langage, la fonction visio-spatiale, la gestion du geste et la reconnaissance visuelle. Le lobe temporal contient l'aire auditive ainsi que le cortex hippocampique et entorhinal, siège de la mémoire. Enfin, le lobe occipital contient l'aire visuelle (**Figure 7**).

Le cortex est un fin manteau de matière grise qui entoure la substance blanche. La matière grise comprend un réseau de neurones de projection et d'interneurones, représentant respectivement 70-80% et 20-30% des neurones corticaux, supporté par les cellules gliales et les vaisseaux sanguins. La substance blanche contient les axones myélinisés provenant ou allant vers la couche superficielle, la matière grise (**Figure 8**).

La majorité des neurones de projection ont une structure pyramidale et utilisent le glutamate comme neurotransmetteur exciteur. Les interneurones utilisent principalement le GABA et sont donc inhibiteurs (**Figure 9**). Ces deux types de neurones ont une origine bien distincte. Les interneurones ont une origine ventrale, ils sont produits par les progéniteurs situés dans les éminences ganglionnaires. Ils font ensuite une migration tangentielle vers le télencéphale dorsal pour s'intercaler entre les neurones glutamatergiques. Ils produisent des axones courts et projettent localement, contrairement aux neurones de projection, qui font des axones très longs qui se projettent à distance dans les différentes zones du cerveau.

Les neurones de projection ont une origine dorsale, ils sont produits par les progéniteurs corticaux. **Au cours de ma thèse j'ai étudié spécifiquement le rôle de CDC25B dans la régulation de la corticogenèse, c'est-à-dire la prolifération des progéniteurs corticaux et la formation des neurones de projection. La prochaine section vise à expliquer comment sont produits ces neurones.**

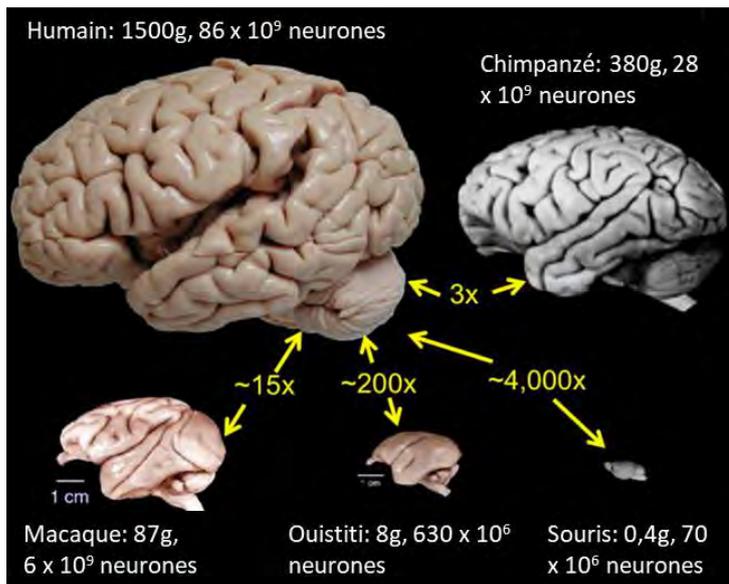


Figure 6 : Comparaison de la taille du cerveau entre différentes espèces de mammifères. (Van Essen et al, 2018)

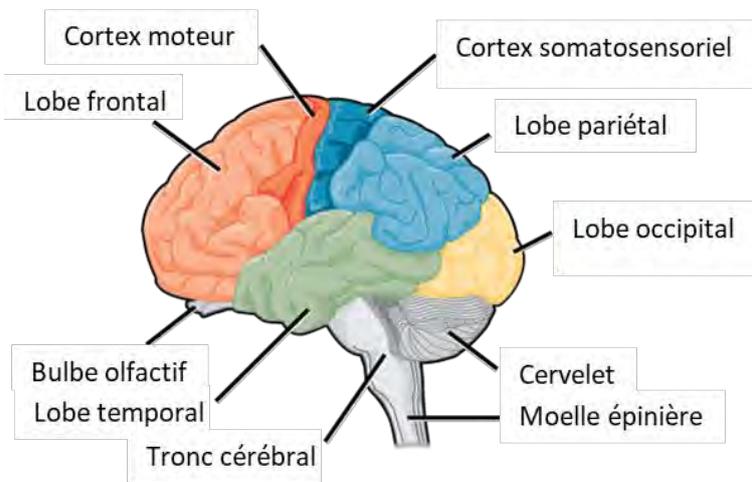


Figure 7: Le cortex cérébral est subdivisé en lobes corticaux.

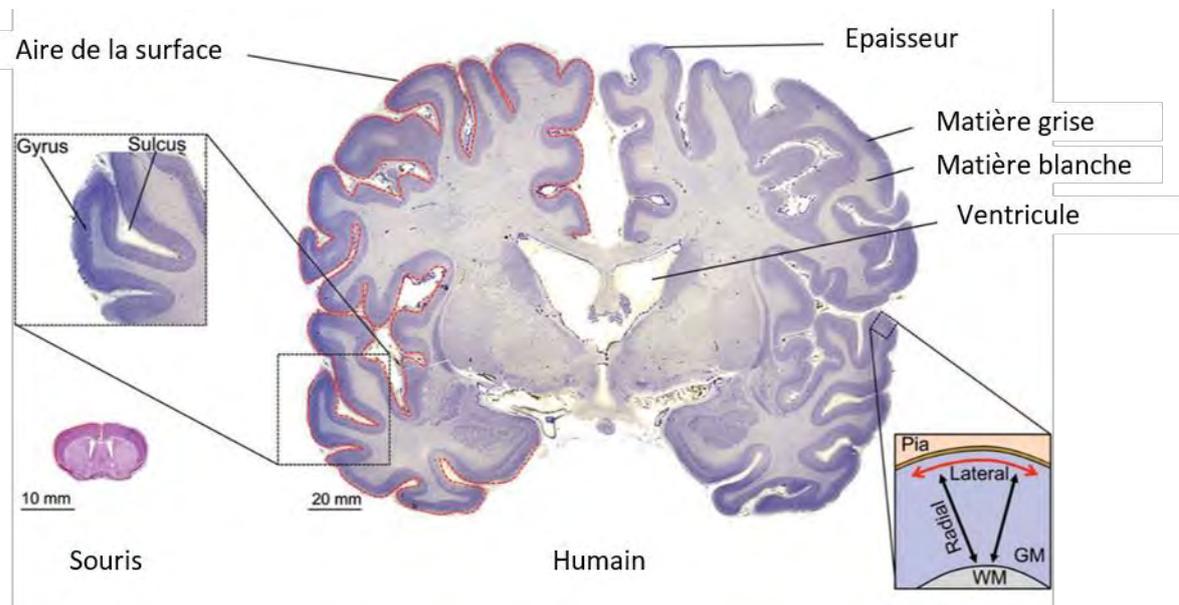


Figure 8: Coupes frontales de cerveau adulte humain et murin. (Florio and Huttner, 2014)

C.2 La formation des couches neuronales dans le cortex

Chez la plupart des mammifères comme l'humain ou la souris, les neurones corticaux sont organisés en six couches, qui sont cytoarchitecturalement et fonctionnellement distinctes. Dans chaque couche, les neurones tendent à partager la même identité cellulaire et le même motif de connectivité : les couches profondes (V-VI) contiennent des neurones qui se connectent surtout aux structures subcorticales, alors que les neurones des couches superficielles (II à IV) établissent des connexions cortico-cortico contra-latérales (entre hémisphères via le corps calleux) ou ipsi-latérales (intra hémisphères) (Kwan et al., 2012) (**Figure 9, 10**).

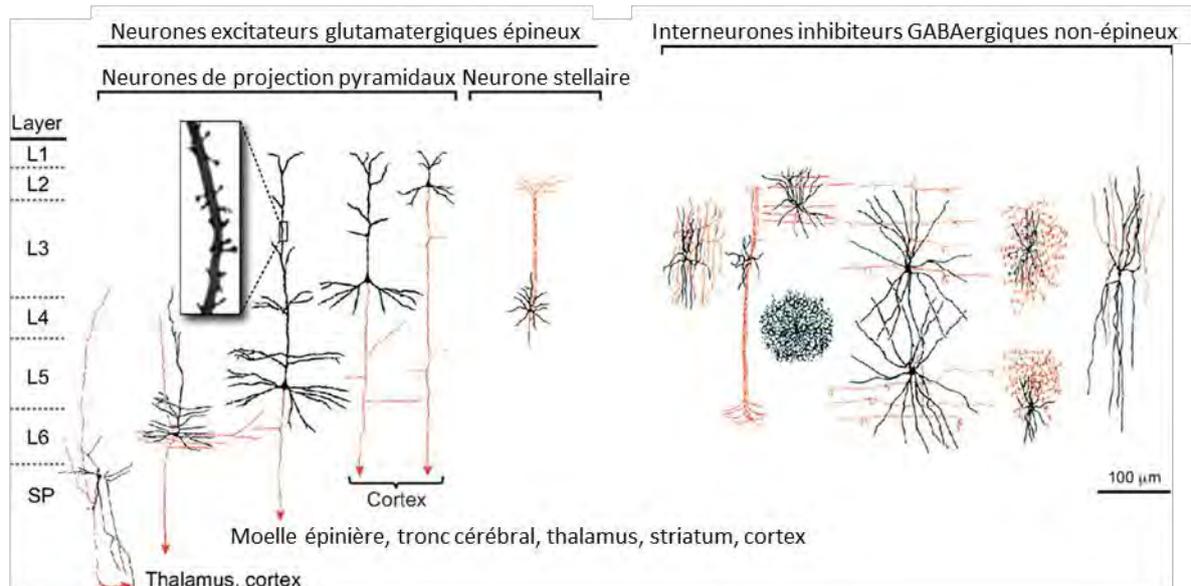


Figure 10 : Représentation des différents types de neurones retrouvés dans le cortex cérébral adulte. (Kwan et al, 2012)

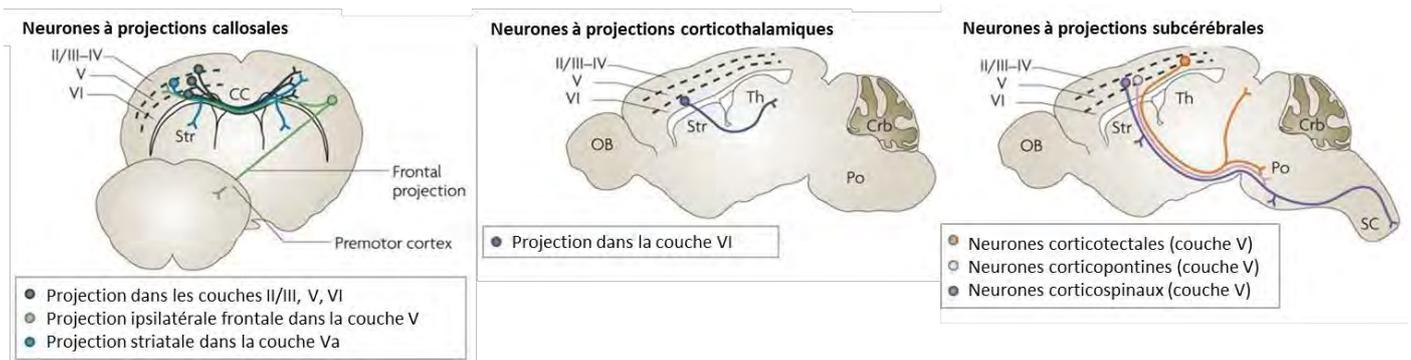


Figure 9 : Les neurones glutamatergiques corticaux projettent des axones dans différentes parties du cerveau. (Molyneaux et al, 2007)

Les premiers neurones nés vers E10,5 forment la pré-plaque (PP), une bande de cellules positionnée dans la partie superficielle du cortex. Les premiers neurones de projection, nés à partir de E11,5, vont former la première couche (II) en s'intercalant dans la pré-plaque, ce qui la sépare en une sous-plaque (SP) et en une zone marginale (MZ), qui se développera comme la couche (I) du cortex postnatal. Les neurones de la SP et MZ sont les premiers à devenir mat-

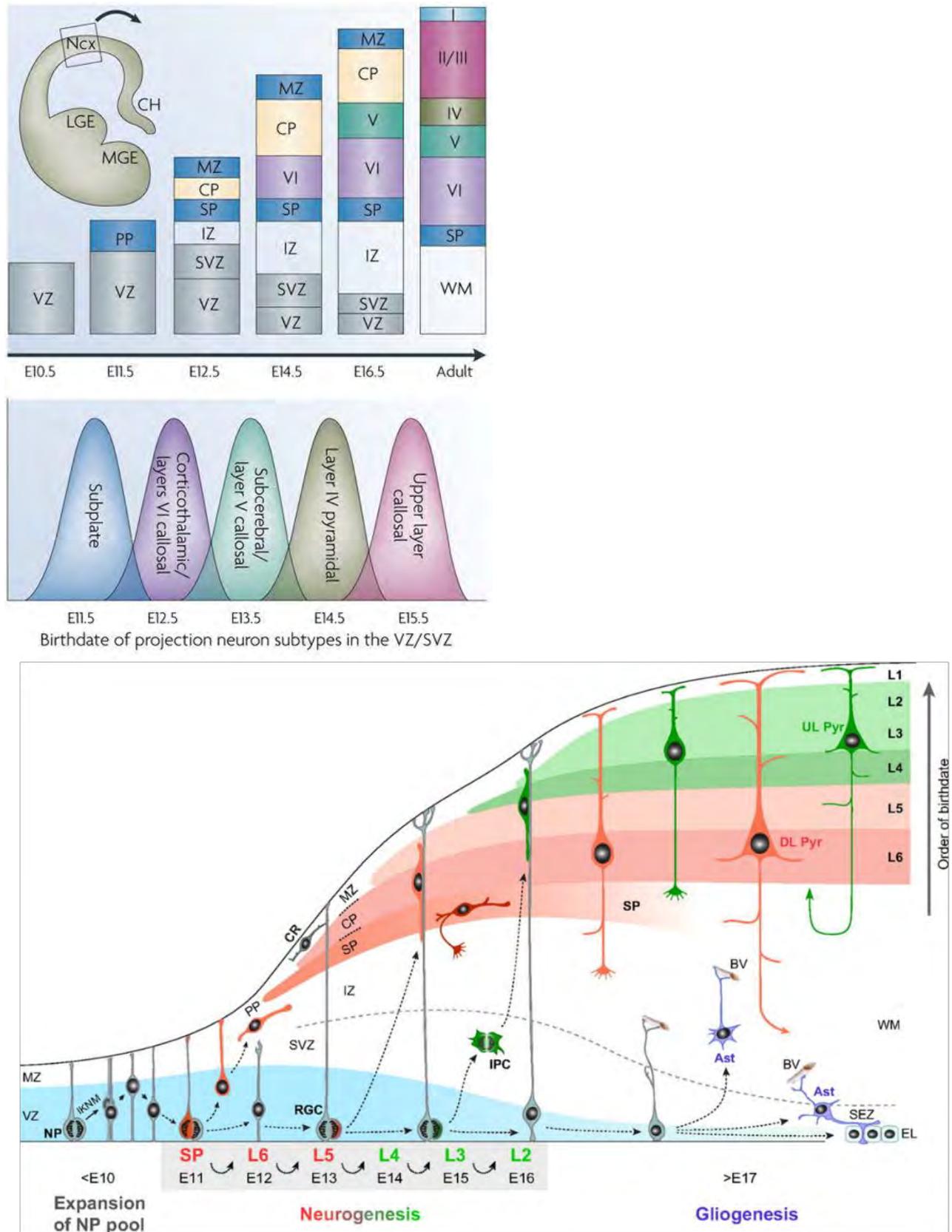


Figure 11: Représentation schématique de la génération des neurones de projection au cours de la corticogénèse chez la souris. (Molyneaux et al, 2007 ; Kwan et al, 2012)

-ures, former des synapses et ont un rôle crucial dans la migration et la synaptogenèse des neurones des couches II à VI. Les couches VI à II sont ensuite formées de manière inversée : les neurones nouvellement générés passent à travers les couches déjà existantes pour atteindre la partie la plus superficielle du cortex. Les neurones de la couche VI sont donc les premiers produits, alors que les neurones de la couche II sont les plus jeunes. Ces neurones se distinguent morphologiquement et moléculairement selon la couche dans laquelle ils sont situés. C'est pourquoi leur date de naissance est intimement associée à leur identité et donc, à la connexion axonale qu'ils établissent et éventuellement à leur fonction physiologique (Kwan et al., 2012) (**Figure 11**).

Tous les neurones corticaux glutamatergiques sont issus des progéniteurs corticaux. Au cours de l'évolution du cortex des mammifères, la variété de types de progéniteurs s'est fortement complexifiée. Afin de se rapprocher du contenu de la partie Résultats, la prochaine section décrira les progéniteurs corticaux présents chez la souris, notre modèle d'étude.

C.3 Les progéniteurs corticaux

Le développement du cortex cérébral murin implique de nombreux types de cellules progénitrices : les cellules neuroépithéliales (NECs), les cellules gliales radiales apicales (aRGs), les progéniteurs basaux intermédiaires (bIPs), les progéniteurs intermédiaires apicaux (aIPs), les progéniteurs subapicaux (SAPs), et les cellules gliales radiales basales (bRGs) plus récemment identifiées. Dans les sections suivantes seront décrits chacun de ces sous-types, avec leurs similitudes et leurs différences.

On peut classer les progéniteurs corticaux en trois grandes catégories : les progéniteurs apicaux, les progéniteurs basaux, les progéniteurs subapicaux (**Figure 12**). Cette classification résulte de la différence de polarité due aux constituants de la membrane. En effet, les progéniteurs apicaux possèdent une membrane plasmique apicale avec un cil primaire qui communique avec le lumen, ainsi qu'une extension basale qui communique avec la surface. Les progéniteurs basaux ne possèdent pas d'extension apicale, mais une membrane plasmique basolatérale et pour certains une extension basale. Ces caractéristiques conditionnent la manière dont les progéniteurs vont intercepter les signaux extérieurs (Taverna et al., 2014).

C.3.1 Les progéniteurs apicaux

i Les cellules neuroépithéliales (NECs)

Au début de la corticogenèse, le tissu est composé d'une monocouche de cellules souches neurales appelées cellules neuroépithéliales (NECs). Ces cellules, engagées dans le destin neural, prolifèrent activement par divisions symétriques. Elles s'étendent sur toute la largeur du tissu car leur cytoplasme forme des prolongations qui contactent le côté apical (le ventricule) et le côté basal de l'épithélium (la surface piaie). Cette organisation leur confère une forte polarité apico-basale. Le noyau des NECs bouge le long de l'axe apico-basal de concert avec les phases du cycle cellulaire : c'est le mouvement nucléaire intercinétique (INM) (**Figure 14**). Ce mécanisme requiert des protéines motrices associées aux microtubules.

Localisation de la mitose	Polarité	Capacité de prolifération (nombre de cycle de division)	Type cellulaire	Abréviation
Basale	Bipolaire	Multiple	Basal radial glia both processes	bRG
	Monopolaire		Basal radial glia basal process	
	Nonpolaire		Basal radial glia apical process	
Progéniteurs basaux	Nonpolaire	Multiple	Transient basal radial glia	
		Unique	Transit amplifying progenitor	bIP
Progéniteurs basaux	Nonpolaire	Multiple	Basal intermediate progenitor	
		Unique		
Progéniteurs subapicaux	Bipolaire ou monopolaire	Multiple	Subapical progenitor	SAP
Progéniteurs apicaux	Bipolaire	Unique	Apical intermediate progenitor	aIP
		Multiple	Apical radial glia	aRG
Apicale			Neuroepithelial cell	NEC

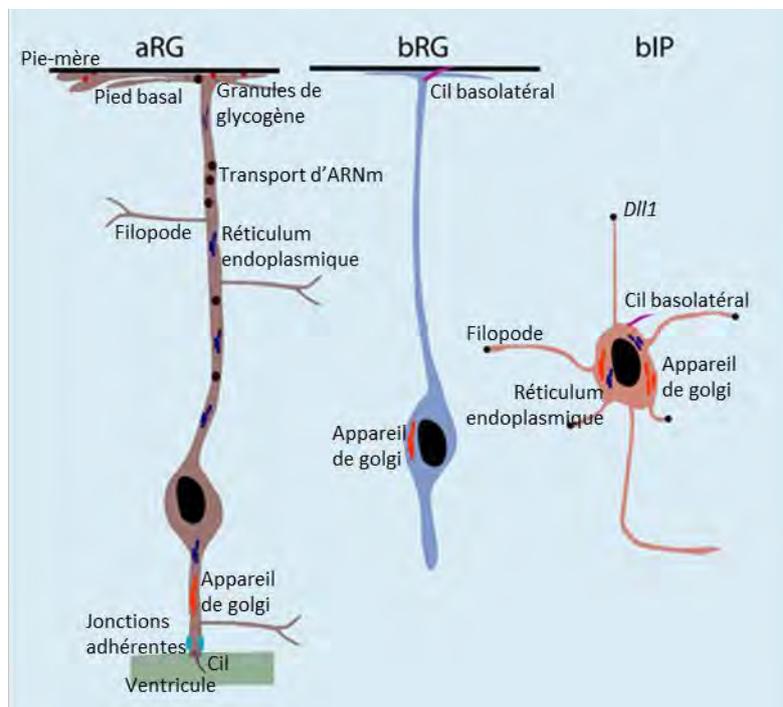


Figure 12: Diversité des progéniteurs corticaux. Schématisation de la structure cellulaire d'un aRG, bRG et bIP. (Taverna et al., 2014 ; Govindan and Jabaudon, 2017)

La mitose a toujours lieu au niveau de la surface apicale, puis les noyaux des cellules filles migrent pendant la phase G1 vers le côté basal et répliquent leur ADN lors de la phase S. Enfin, les noyaux migrent à nouveau vers le ventricule durant la phase G2. Comme les NECs progressent de manière asynchrone dans le cycle cellulaire, on retrouve les noyaux des NECs à différentes positions le long de l'axe apico-basal dans la VZ. Les NECs vont donner naissance, directement ou indirectement, à l'ensemble des neurones excitateurs et des cellules gliales du cortex cérébral.

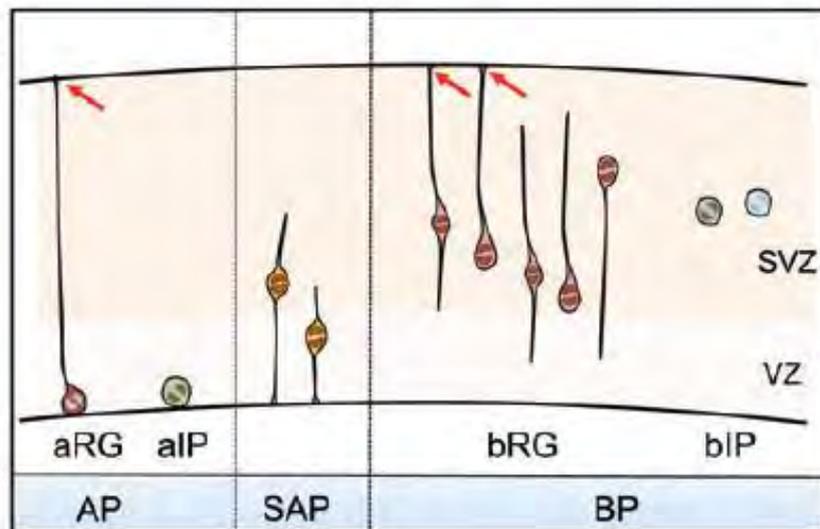


Figure 13: Schématisation des différentes morphologies existantes chez les progéniteurs corticaux. (Florio et al, 2014)

Les NECs possèdent différents composants cellulaires telles que les jonctions serrées, une caractéristique des tissus épithéliaux. En apical, des jonctions adhérentes (AJs), constituées de cadhérines et de caténines qui connectent les réseaux d'actine intracellulaire, forment des ceintures qui lient les NECs voisines entre elles. Le centrosome des NECs est ancré à la membrane plasmique apicale et contribue à la nucléation du cil primaire, une organelle sensorielle qui détecte les signaux présents dans le fluide cérébrospinal (Taverna et al., 2014).

ii Les progéniteurs apicaux aRG (apical radial glia)

Les NECs se transforment en progéniteurs apicaux au moment où ils perdent leur jonctions serrées (mais maintiennent et renforcent les jonctions adhérentes) et commencent à exprimer des marqueurs astrogliaux tels que GLAST (GLutamate ASpartate Transporter) et BLBP (Brain Lipid-Binding Protein) (Taverna et al., 2014). Chez la souris, cette transition commence vers E9.

Les aRGs commencent par réaliser des divisions symétriques prolifératives mais de manière concomitante avec la corticogenèse, basculent rapidement vers un mode de divisions asymétriques, produisant ainsi un aRG et une cellule différenciée. Cette cellule peut être un neurone, ou un autre type de progéniteur tel qu'un progéniteur basal (Paridaen and Huttner, 2014a). Cette transition entraîne une croissance du cortex de façon latérale et médiale. Le neuroépithélium se transforme alors en un tissu hybride pseudostratifié, dans lequel les corps

cellulaires des progéniteurs et des neurones sont spatialement séparés. Le soma des aRGs reste dans la partie apicale du tissu : c'est la zone ventriculaire. Le soma des progéniteurs basaux réside et forme une seconde couche germinale basale à la VZ, c'est la zone sous-ventriculaire (SVZ). Les neurones quittent ces couches germinales et s'accumulent sous la surface piaie, dans la plaque corticale (CP). Au fur et à mesure que le tissu s'épaissit radialement, l'extension basale des aRGs s'allonge et devient une fine fibre radiale, appelée extension basale, qui sert d'échafaudage pour les neurones en migration (Florio and Huttner, 2014).

Comme les NECs, les aRGs ont une forte polarité apico-basale et réalisent l'INM et expriment également des facteurs de transcription spécifiques de progéniteurs comme Nestin ou GFAP. Ils sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription Pax6 (Paridaen and Huttner, 2014a).

iii Apical intermediate progenitor aIP (ou short neural precursor SNP)

Cellules filles des aRGs, les progéniteurs aIPs maintiennent une extension apicale, sont intégrés au ceintures d'AJs, expriment Pax6, se divisent au ventricule et réalisent l'INM. Cependant les aIPs n'ont pas d'extension basale (**Figure 13**), n'expriment pas de marqueurs astrogliaux et font quasi exclusivement des divisions neurogéniques terminales (Paridaen and Huttner, 2014a). Ces progéniteurs sont connus pour majoritairement participer à la formation des neurones de la couche IV (Stancik et al., 2010). Etant peu nombreux dans le cortex, les aIPs sont généralement inclus parmi les aRGs dans les analyses.

C.3.2 Les progéniteurs basaux

Les progéniteurs basaux (BPs) sont majoritairement issus de la division des aRGs, mais ils peuvent aussi être produits par les BPs eux-mêmes par auto-renouvellement.

i Les progéniteurs basaux bIP (basal intermediate progenitor)

Ce sont des progéniteurs non épithéliaux, issus des aRGs. Après leur naissance au ventricule, ils migrent vers la SVZ via la contractilité de l'actomyosine et perdent leur polarité apico-basale (Taverna et al., 2014). Ils éteignent les marqueurs astrogliaux et Pax6, et commencent à exprimer Tbr2 (T-box brain protein 2). Les bIPs font des mouvements radiaux et tangentiels dans la SVZ mais sans coordination avec le cycle cellulaire. Ils ont la capacité de produire deux neurones à la fois par divisions symétriques neurogéniques, d'où leur qualification de progéniteurs intermédiaires de la corticogenèse (Florio and Huttner, 2014). Les bIPs peuvent également faire un cycle menant à une division symétrique proliférative, produisant ainsi deux bIPs. Ils sont spécifiques du télencéphale et sont associés à la complexification des tissus nerveux. (Paridaen and Huttner, 2014a).

ii Les progéniteurs basaux bRG (basal radial glia)

Les bRGs sont issus des aRGs ou de l'autorenouvellement des bRGs. On les retrouve dans la SVZ ou plus basalement dans la zone intermédiaire (IZ) qui jouxte la plaque corticale. Ces progéniteurs expriment Pax6 comme les aRGs, ainsi que les marqueurs de cellules souches

neurales Nestin et GFAP, mais ne possèdent pas d'extension apicale. Ils présentent cependant une extension basale, bien qu'il existe des exceptions puisque cinq morphologies différentes ont été décrites (Govindan and Jabaudon, 2017) (**Figure 13**). Par exemple, ils peuvent avoir une fine extension apicale mais qui ne contactera jamais le ventricule.

Malgré la présence d'une projection basale, les bRGs ne font pas l'INM mais un mouvement nucléaire appelé la *translocation somale mitotique* (MST) durant lequel le noyau bouge rapidement vers le côté basal juste avant la division (**Figure 14**). La MST n'implique pas les microtubules ou le centrosome mais requiert la myosin II non musculaire, l'effecteur de Rho, ROCK (voie RhoA – ROCK – NMII). C'est un mécanisme distinct de l'INM et de la migration neuronale (Ostrem et al., 2017).

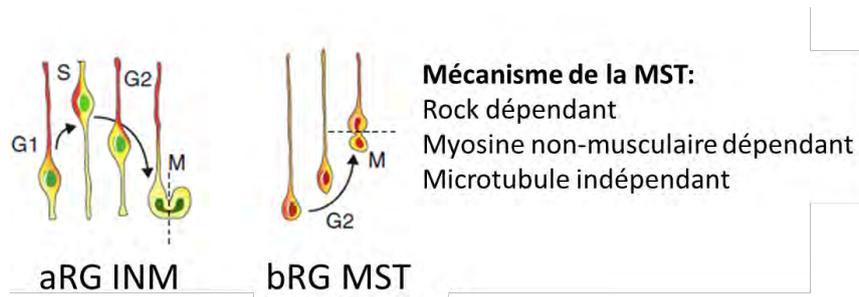


Figure 14 : Schématisation des mouvements nucléaires réalisés par les aRGs et les bRGs au cours du cycle cellulaire.

Ces progéniteurs peuvent donner naissance à deux neurones par division asymétrique ou symétrique terminale. Ils ont un potentiel prolifératif beaucoup plus important que les bIPs, car ils peuvent réaliser plusieurs cycles de divisions asymétriques (donnant un neurone et un bRG). Ils permettent ainsi une forte amplification neuronale. L'hypothèse actuelle est qu'ils aient permis l'expansion corticale chez les mammifères au cours de l'évolution (Florio and Huttner, 2014).

C.3.3 Les progéniteurs subapicaux (SAP)

Ces progéniteurs appartiennent à une troisième catégorie de par leur morphologie hybride. En effet, ils possèdent une extension apicale mais font leur mitose en basal (dans la partie basale de la VZ ou dans la SVZ). Chez la souris, les SAP n'ont été identifiés que dans la région ventrale du télencéphale ; on les retrouve dans le cortex uniquement chez les espèces gyrencéphaliques (Florio and Huttner, 2014; Paridaen and Huttner, 2014a).

C.4 Mise en place du cortex : de la spécification des progéniteurs à la production des neurones

Plusieurs paramètres déterminent la production neuronale dans une espèce donnée : le nombre absolu de progéniteurs, l'abondance des différents types de progéniteurs et leur mode de division, la longueur de leur cycle cellulaire, et enfin la durée de la période neurogénique. L'analyse de ces paramètres a apporté beaucoup d'informations concernant l'évolution du cortex. Ces analyses sont aussi très pertinentes pour comprendre les désordres

neurodéveloppementaux caractérisés par une diminution du nombre de neurones. Elles révèlent la complexité du système et de la régulation nécessaire à sa bonne mise en place (Florio and Huttner, 2014). Cette partie a pour objectif de balayer les différents paramètres connus pour réguler la corticogenèse.

C.4.1 Régionalisation du cortex

Le cortex est organisé en quatre aires, qui sont fonctionnellement distinguables les unes des autres de par leur cytoarchitecture, leurs projections neuronales et leur motif d'expression génique. Cette régionalisation est la conséquence de la diffusion de molécules de signalisation, sécrétées par des centres régionalisés selon l'axe antéro-postérieur et latéro-médial, qui vont générer un gradient d'expression de facteur de transcription dans les progéniteurs corticaux (O'Leary et al., 2007) (Figure 15, 16).

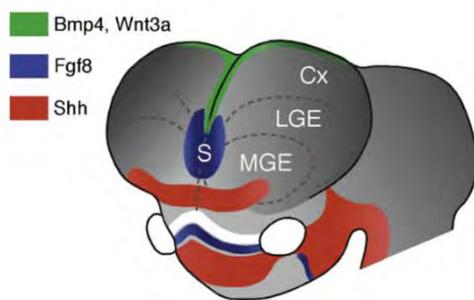


Figure 16: Localisation des signaux morphogènes dans le télencéphale en développement. S : septum, Cx : cortex, LGE : éminence ganglionnaire latérale, MGE : éminence ganglionnaire médiale. (Hoch et al., 2009)

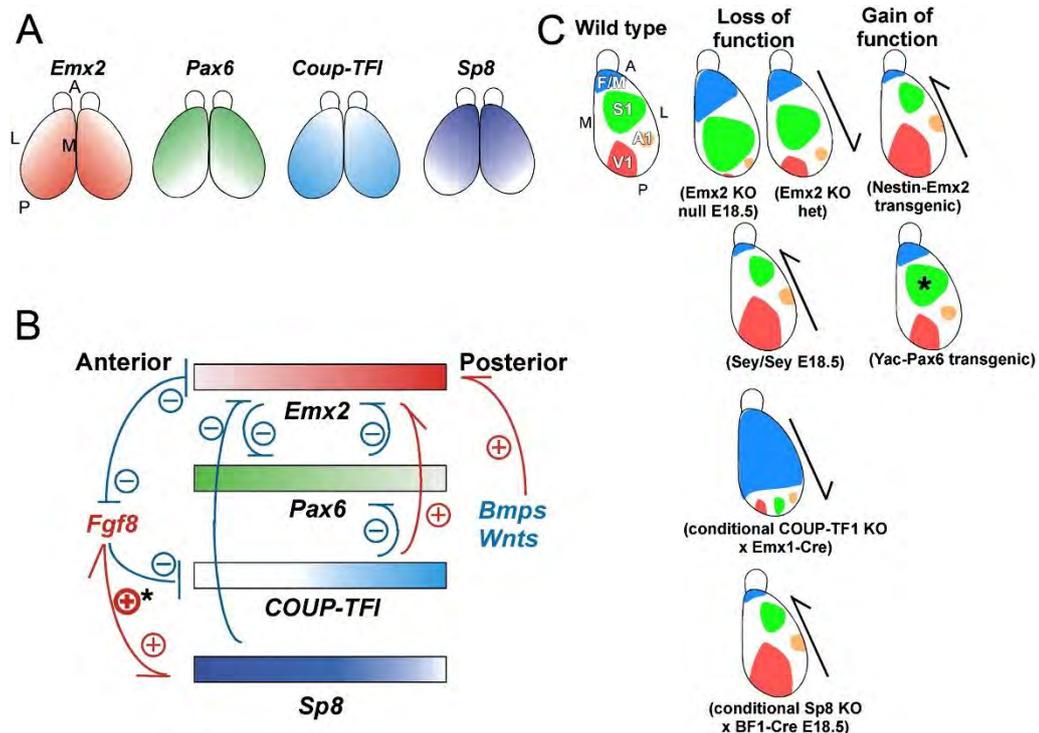


Figure 15: Résumé des mécanismes génétiques impliqués dans la régionalisation des aires du cortex, et phénotypes mutants. V1 : aire primaire visuelle, S1 : aire somatosensorielle, A1 : aire auditive, M1 : aire motrice.

Les centres majeurs de régionalisation sont en antérieur le septum qui exprime Fgf8, en dorsal l'hème corticale et le plexus choroïde qui exprime BMP et Wnt et la région ventrale du

télocéphale qui secrète Shh (O’Leary et al., 2007) (**Figure 15**). Quatre facteurs de transcription COUP-TFI, Emx2, Pax6, and Sp8 ont une expression graduelle dans l’axe antéro-postérieur du cortex embryonnaire. Ils exercent une régulation transcriptionnelle mutuelle, qui confère une identité aux progéniteurs corticaux et plus tard aux neurones qui en émergent, ce qui délimite les aires corticales (**Figure 16**). Fgf8 établit les gradients de Emx2 et COUP-TFI dans les progéniteurs, en réprimant leur expression en antérieure (Molyneaux et al., 2007; O’Leary et al., 2007). Shh induit l’expression de Gsh1/2 en ventral et de Nkx2.1 dans la partie plus médiale du télocéphale. Wnt est impliqué dans l’orientation dorso-ventral du télocéphale en induisant l’expression de Emx1, Emx2, Pax6 et Ngn2 dans le télocéphale dorsal, et réprimant celle de Gsh2, Ascl1 et Dlx2 en ventral (Molyneaux et al., 2007; O’Leary et al., 2007). Ces facteurs de transcription régulent des cascades de transcription ventrale et dorsale mutuellement répressives, qui stabilisent les domaines de progéniteurs responsables de la production des neurones corticaux (en dorsal) et des éminences ganglionnaires (en ventral) (Martynoga et al., 2012) (**Figure 17**).

La taille des aires corticales qui émergent de la régionalisation doit être strictement contrôlée. Des variations dans la surface des aires peuvent avoir des conséquences dramatiques sur le comportement. Des manipulations génétiques pendant le développement embryonnaire, qui résultent en une diminution ou augmentation modeste de la taille des aires somatosensorielles ou motrices, conduit à des déficiences significatives de la motricité ou de la sensibilité (Leingärtner et al., 2007).

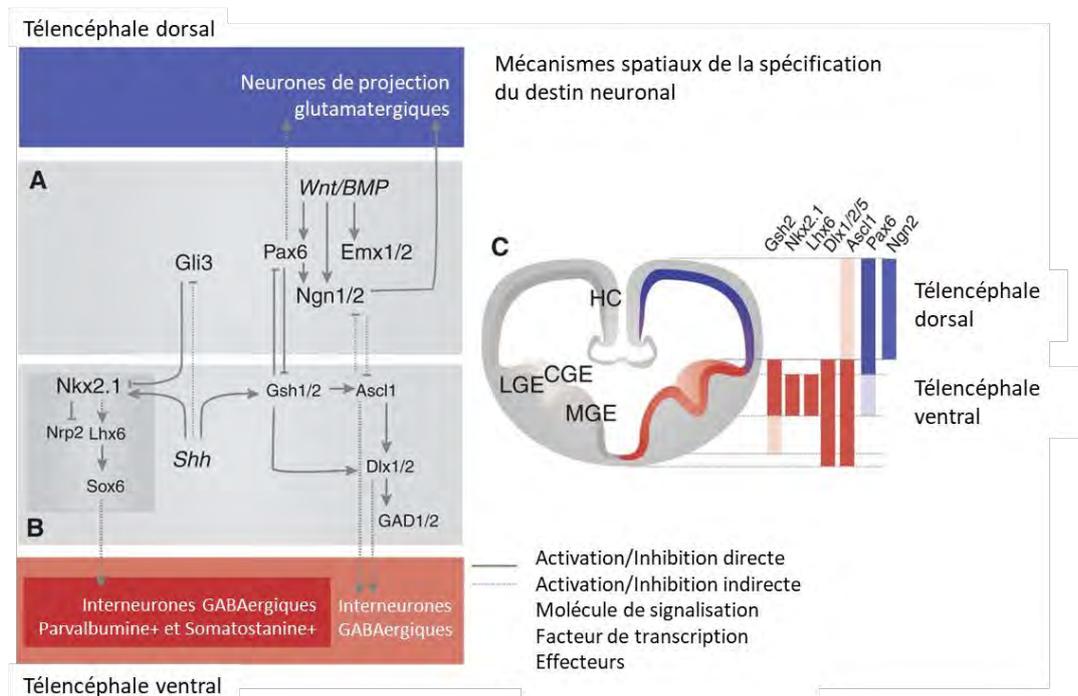


Figure 17: Mécanisme spatial de la spécification neuronale dans le télocéphale. LGE : éminence ganglionnaire latérale, MGE : éminence ganglionnaire médiale, CGE : éminence ganglionnaire caudale. (Martynoga et al., 2017)

C.4.1 Transition entre les types de progéniteurs et modes de division

Comme décrit plus haut, les progéniteurs peuvent réaliser différents modes de division selon leur type. Le choix d'un progéniteur de faire une division proliférative au détriment d'une division neurogénique va être décisif dans le déroulement de la corticogenèse. Des modèles prédisent que des changements mineurs dans la proportion de progéniteurs présentant un mode de division ou l'autre à un stade précoce, entraînent des modifications substantielles du nombre de progéniteurs et de la taille finale du cortex (Caviness et al., 1995; Rakic, 1995; Sahara and O'Leary, 2009). C'est pourquoi le mode de division est un paramètre finement contrôlé.

Le premier mode de division observé dans la corticogenèse est la division symétrique proliférative des NECs. Au moment de la transition NEC -> aRG, leur mode de division évolue et les mécanismes impliqués dans cette transition sont encore mal connus. Cependant, l'expression des facteurs de transcription bHLH *Hes*, effecteurs de la voie Notch, est nécessaire puisque la perte de fonction de *Hes1* et *Hes5* entraîne une différenciation prématurée des NECs en neurones et une perte des aRGs (Hatakeyama et al., 2004). L'expression transitoire de *Fgf10* est aussi essentielle, puisque la perte de fonction de *Fgf10* retarde la transition des NECs en aRGs alors que sa surexpression entraîne l'effet opposé (Sahara and O'Leary, 2009). De plus, des molécules d'adhésion cellulaire comme la fibronectine, les intégrines et cadhérines sont surexprimées au moment de la transition NEC -> aRG, ce qui suggère que les interactions cellule-cellule jouent un rôle critique dans ce processus (Zhu et al., 2016).

Les aRGs commencent également par faire des divisions symétriques prolifératives, et vont rapidement basculer vers des divisions asymétriques et produire des neurones. Mais dans le cortex, contrairement à la moelle épinière, certaines de ces divisions asymétriques donnent également naissance à des progéniteurs basaux, entraînant ainsi la transition aRG -> bIP/N. Il a été rapporté que la voie Notch inhibe la génération des bIPs par les aRGs (Florio and Huttner, 2014; Ohata et al., 2011).

Chez la souris, les bIPs font majoritairement des divisions symétriques neurogéniques terminales, puisque dans cette espèce 80% des BPs sont des bIP neurogéniques, 10% sont des bRGs, et 10% sont des bIPs prolifératifs (qui génère deux bIPs à la fois). Chez les primates, les bIPs font un ou plusieurs cycles de divisions symétriques prolifératives avant de produire des neurones, toujours par divisions neurogéniques symétriques. De plus dans cette espèce, 50-75% des BPs sont des bRGs (qui s'auto-renouvèlent activement et produisent des bRGs ou des bIPs), les autres sont pour la plupart des bIPs prolifératifs. La production des bRGs chez la souris est donc un évènement assez rare contrairement au primate. Chez les rongeurs, le lignage le plus courant est aRG -> bIP neurogénique -> neurone. Chez les espèces gyrencéphaliques, le lignage est moins linéaire : aRG -> bRG -> auto-amplification/bIP -> neurone. Ainsi chez les primates, la plupart des neurones sont issus bRGs (Florio and Huttner, 2014).

C.4.2 Spécification transcriptionnelle dans les progéniteurs et neurones corticaux

i Programme transcriptionnel dans les progéniteurs

Comme dans la moelle épinière, les progéniteurs corticaux sont caractérisés par une combinatoire de facteurs de transcription qui régulent leur prolifération et leur différenciation. Les gènes Sox2, Pax6 et Oct4 régulent la prolifération des aRGs. Leur invalidation entraîne la diminution de l'expression de marqueurs de cellule souche comme Nestin et GFAP ainsi qu'une réduction de la prolifération.

Le facteur de transcription Pax6, gène pivot pour le développement du CNS, est exprimé dans le cortex selon un gradient rostro-latéral et caudo-médial. Il suit également un gradient temporel car son expression diminue avec le temps. Il est spécifiquement exprimé dans les aRGs et dans les bRGs, mais pas dans les bIPs ni dans les neurones. Pax6 régule positivement la prolifération, mais promeut aussi la différenciation neuronale via l'induction de gènes proneuraux à bHLH comme Ngn2. Ainsi, les aRGs qui produisent des bIPs expriment transitoirement Ngn2 selon une séquence d'expression : Pax6 > Ngn2 > Tbr2 (Englund et al., 2005; Manuel et al., 2015; Telley et al., 2016). La dualité de ces fonctions semble être médiée par l'épissage alternatif de Pax6 et de son interaction avec d'autres facteurs de transcription comme Sox2 ou Hes1. Ainsi, les aRGs prolifératifs expriment l'exon 5a de Pax6, contrairement aux aRGs différenciatifs (Manuel et al., 2015). Pax6 a été décrit comme stabilisant le centrosome et l'ancrage de la cellule en apical, ainsi sa perte de fonction entraîne des divisions ectopiques basales des aRGs, suite à la perte des caractéristiques épithéliales des aRGs. Des expériences de perte et de gain de fonction montrent aussi que Pax6 promeut la production des bIPs. L'expression de Tbr2 est directement régulée par Pax6. La surexpression de Tbr2 dans les aRGs augmente leurs divisions différenciatives en bIPs et réduit l'auto-renouvellement des aRGs, montrant qu'il est suffisant pour spécifier les bIPs (Govindan and Jabaudon, 2017; Manuel et al., 2015). Les progéniteurs qui vont réaliser des divisions différenciatives, c'est-à-dire qui vont produire des neurones ou des bIPs, expriment le gène Tis21 (Haubensak et al., 2004). Les bIPs étant quasi-uniquement neurogéniques, ils expriment Tis21, mais aussi Ngn2, Tbr2, *Svet1*, et *Insm1*. Les bRGs sont des progéniteurs basaux, mais ils ont un fort potentiel prolifératif et expriment donc des marqueurs de prolifération comme Sox2, Pax6 et *Fabp7*, en plus de marqueur neuronal *Nrcam*, *Ctnnd2* et *Sez6l*.

ii Facteurs de transcription dans les neurones

Le cortex contient une incroyable diversité de sous-types neuronaux, chacun étant défini par une position, une forme, des propriétés électrophysiologiques. Ces caractéristiques émergent d'un programme transcriptionnel spécifique, acquit par un jeu de répressions et d'activations qui mènent à la régionalisation de l'expression génique dans chaque couche neuronale. (Govindan and Jabaudon, 2017) (**Figure 18**).

Un réseau de facteurs de transcription, enrichis dans des couches spécifiques, incluant *Fezf2*, *Ctip2*, *Tbr1* et *Satb2* a été identifié au cours des dernières années. Ces facteurs régulent leur expression mutuelle, ce qui permet l'acquisition séquentielle de l'identité des neurones des

couches profondes puis superficielles (Oberst et al., 2019a). La perte de fonction de ces facteurs de transcription affecte la formation de couches spécifiques, et d'autres processus de la corticogenèse comme la formation des axones (Kwan et al., 2012). Le gène Sox5 est exprimé dans la sous-plaque (SP), la couche VI et partiellement dans la couche V. Il régule la migration, la différenciation et la projection des axones des neurones des couches profondes. Il réprime Fezf2 et Ctip2 qui sont spécifiquement exprimés dans la couche V. Le gène Tbr1 est exprimé dans la SP, la couche VI et la zone marginale et régule la position des couches neuronales, la différenciation et le ciblage des axones. Pour cela, il réprime l'expression de Fezf2 et Ctip2 dans la couche VI. Le gène Satb2 est exprimé dans les couches II à V. C'est un régulateur positif de Cux2, cadherin 10 et Rorb et il réprime Ctip2 dans la couche V. Satb2 régule le ciblage des axones et l'arborisation dendritique des neurones des couches superficielles. (Kwan et al., 2012).

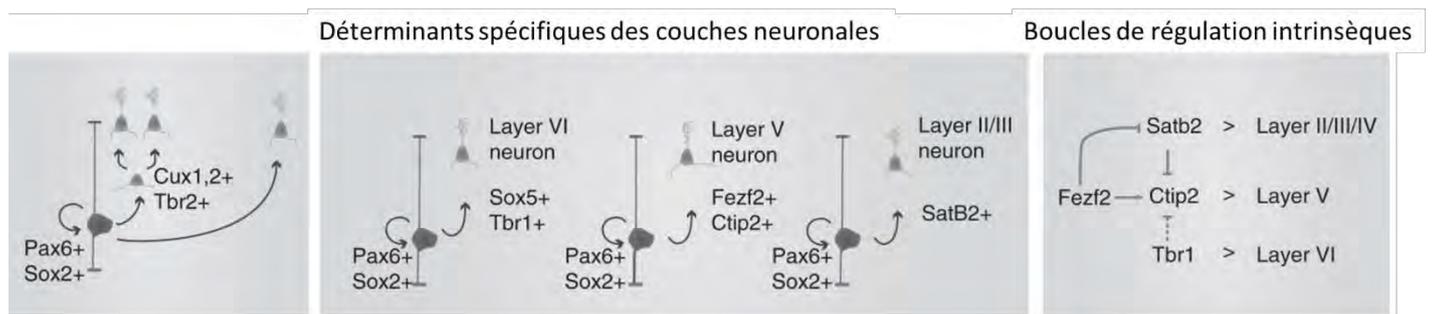
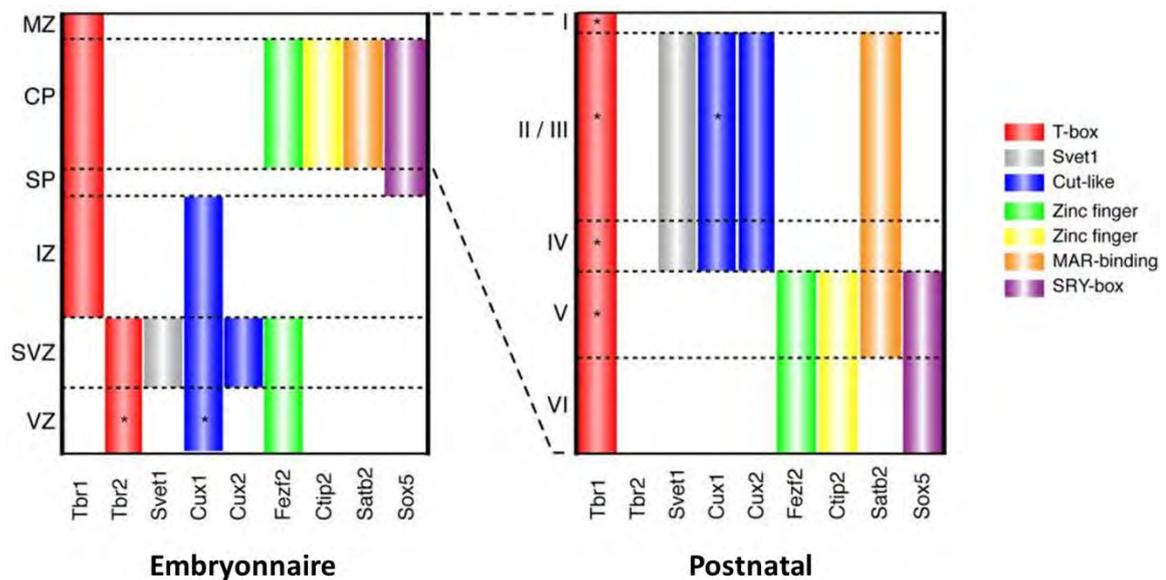


Figure 18: Les neurones des couches corticales sont spécifiés par une combinatoire de facteurs de transcription au cours de l'embryogenèse et chez l'adulte. (Leone et al., 2008; Martynoga et al., 2012)

Toutefois, ces facteurs de transcription ne sont pas régulés dans le temps. De plus, bien que certains des gènes neuronaux soit également exprimés dans les progéniteurs, on ne peut pas leur inférer une fonction d'engagement : le gène peut avoir deux rôles bien distincts. Par exemple, Lhx2 est exprimé dans les progéniteurs dorsaux et dans les neurones des couches superficielles. Or sa perte de fonction entraîne la disparition de tous les neurones. Lhx2 a donc

une fonction dans la spécification des progéniteurs corticaux et plus tard dans le développement, il acquiert une fonction spécifique aux neurones des couches superficielles (Monuki et al., 2001). De plus, si les neurones produits en fin de corticogenèse expriment d'abord une combinatoire de marqueurs, leur identité est redéfini plus tard dans le développement par l'expression de facteurs spécifiques aux neurones des couches superficielles. Ce processus, appelé amorçage transcriptionnel, suggère que l'identité finale des neurones est progressivement acquise au cours du développement (Oberst et al., 2019a).

C.4.3 Temporalité de la corticogenèse

La génération de la diversité neuronale dans le cortex résulte d'un patterning spatial et temporel. Le profil transcriptionnel des progéniteurs va évoluer au cours du temps, générant les différents types de neurones selon une séquence temporelle (Oberst et al., 2019a). Les aRGs commencent à produire les neurones des couches profondes, puis produisent les neurones de couches superficielles. Des expériences de lignage ont montré que des neurones produits à E14,5 par les progéniteurs apicaux sont retrouvés à P7 spécifiquement dans la couche IV. De plus, les neurones produits à E14 et E14,5 marqués avec deux marqueurs différents sont retrouvés dans la couche IV mais dans des neurones distincts (Telley et al., 2016). Une étude récente montre également que les aRGs deviennent plus hyperpolarisés alors qu'ils génèrent les couches successives de neurones. Les propriétés bioélectriques de la membrane des progéniteurs régulent ainsi leur capacité temporelle à produire la diversité neuronale (Vitali et al., 2018). Les jeunes bIPs produisent des neurones des couches profondes et superficielles, puis sont restreint à produire des neurones des couches superficielles (Kowalczyk et al., 2009; Mihalas and Hevner, 2018; Mihalas et al., 2016; Vasistha et al., 2015).

Le mécanisme moléculaire impliqué dans cette régulation temporelle commence à être bien décrit chez les Vertébrés (Okamoto et al., 2016; Telley et al., 2019). Le groupe de D.Jaubaudon a montré que les jeunes aRGs (aux stades E12-13) expriment un programme transcriptionnel caractérisé par des facteurs intrinsèques, comme des protéines nucléaires, des gènes du cycle cellulaire et des gènes régulant l'expression génique et la structure de la chromatine. Les aRGs plus tardifs (aux stades E14-15), expriment un programme transcriptionnel porté sur la perception de l'environnement cellulaire, comme des gènes du transport ionique, de l'interaction cellule-cellule et cellule-matrice ou encore des gènes du métabolisme des lipides. Ce programme transcriptionnel « âge-dépendant » est transmis des aRGs à leurs cellules filles, ce qui contribue à l'émergence de la diversité neuronale. La progression de ce motif temporel est orchestré par des groupes de gènes, et notamment PRC2 (Polycom Repressive Complex 2) qui régule l'accès à la chromatine. Sa perte de fonction entraîne une accélération de la corticogenèse qui réduit la période neurogénique et qui résulte en un cortex moins épais (Telley et al., 2019).

Afin de déterminer la plasticité dans cette temporalité des progéniteurs, des expériences de transplantation hétérochronique ont été réalisées. Des aRGs transplantés du stade E15 vers E12 (AP_{15→12}) sont de nouveau capables de produire des neurones des couches profondes (Oberst et al., 2019b). Cette plasticité est due à une reprogrammation transcriptionnelle, avec

une répression des programmes tardifs et une réexpression du programme précoce, notamment des gènes *Tcf7l1* (gène de la voie Wnt qui réprime la différenciation neuronale et promeut l'autorenouveau) et *PCR2* (régulateur de la chromatine et cible de la voie Wnt). Cette reprogrammation serait due à l'action de la voie Wnt, dont l'activité est plus élevée en début de corticogénèse. Les aRGs tardifs peuvent donc, en réponse à l'environnement, retourner dans un état moléculaire et neurogénique précoce. Toutefois, des bIPs transplantés du stade E15 vers E12 ne sont pas capables de cette plasticité. Ce résultat concorde avec une étude précédente dans laquelle les auteurs ont sélectionné des progéniteurs tardifs par incorporation de thymidine radio-marquée (majoritairement des bIPs à ce stade) et n'observent pas de production de neurones des couches profondes après transplantation dans un cortex jeune (Frantz and McConnell, 1996).

A l'inverse, des $AP_{12 \rightarrow 15}$ ne présentent pas cette plasticité transcriptionnelle (Oberst et al., 2019b). Les auteurs proposent que ces jeunes progéniteurs, qui n'expriment pas encore le programme transcriptionnel porté sur la perception de l'environnement cellulaire (Telley et al., 2019), ne sont pas capables de sentir le niveau de Wnt et donc de s'adapter à un environnement différent.

Le cortex cérébral est un tissu complexe, constitué d'une grande diversité de neurones issus eux-mêmes d'une variété de progéniteurs. Dans la partie suivante, je vais détailler comment le destin de ces progéniteurs est régulé pendant la neurogenèse.

D. Mécanismes de régulation de la neurogenèse

Dans cette partie, je vais présenter les principaux paramètres connus pour réguler la neurogenèse. Je discuterai d'abord de la structure subcellulaire des progéniteurs, puis des voies de signalisation qui les influencent ; j'expliquerai ensuite comment l'environnement des progéniteurs module leur devenir puis je terminerai en présentant rapidement le rôle de la régulation post-transcriptionnelle et des modifications épigénétiques.

D.1 Structure subcellulaire des progéniteurs

D.1.1 Le rôle du fuseau mitotique

Le fuseau mitotique est une structure subcellulaire composée de microtubules qui se polymérise à partir du centrosome, et qui permet la migration des chromatides dans les deux cellules filles lors de la mitose. L'orientation du plan de clivage est définie par l'axe du fuseau mitotique par rapport à la surface du ventricule (Lancaster and Knoblich, 2012). Le fuseau mitotique est ancré au cortex cellulaire par les microtubules astraux via la dynéine et le complexe LGN/Gai/NuMa. Plusieurs études suggèrent que dans le cortex, une orientation planaire du fuseau favoriserait les divisions symétriques par l'héritage symétrique des déterminants cellulaires et du pied apical entre les cellules filles, alors qu'une division oblique entraînerait une division asymétrique (**Figure 19 A-C**) (Paridaen and Huttner, 2014a). En effet, la répartition symétrique du complexe LGN à la membrane latérale des NECs/aRGs est essentielle pour maintenir les divisions symétriques. De plus, la protéine Lis1 médie la capture des microtubules astraux par le cortex cellulaire via l'interaction avec la dynéine et Ndel1. Une

perturbation du complexe Lis1/Ndel1 qui rend l'orientation du plan de clivage aléatoire, affecte sévèrement l'expansion des NECs/aRGs. La mutation de gènes codant des protéines centrosomales, comme ASPM (Abnormal Spindle-like Microcephaly-associated), dérégule l'orientation du fuseau mitotique et cause des malformations congénitales telles que la microcéphalie (un cerveau dont le périmètre est inférieur à la moyenne) chez l'Humain (Florio and Huttner, 2014). Dans le tube neural, la situation est un peu différente puisque la perte de fonction des protéines du complexe LGN randomise l'orientation du fuseau mitotique mais n'affecte pas le choix du destin des cellules filles. Les progéniteurs se détachent prématurément, migrent vers le manteau mais continuent de proliférer. Cependant la dérégulation de la protéine adaptatrice INSC dans le tube neural de poulet, qui bascule le fuseau vers une orientation oblique au dépend de planaire, cause une neurogenèse accélérée (Morin et al., 2007). Le rôle strict de l'orientation du fuseau dans le destin cellulaire n'est donc pas parfaitement clarifié.

Le rôle de l'asymétrie de la taille des deux pôles du fuseau a également été discuté : 80% des cellules filles qui deviennent des neurones héritent du fuseau le plus large. Il a été montré que la cellule héritant du plus gros fuseau hérite d'une plus grande quantité de l'endosome SARA (Smad Anchor for Receptor Activation), impliqué dans le transport de la partie internalisée de Notch et Delta, maintient l'état souche (Coumailleau et al., 2009). La partie suivante traite plus en détail des conséquences de la répartition asymétrique des composants cellulaires.

D.1.2 L'asymétrie des composants subcellulaires

L'héritage asymétrique de composants cellulaires, tel que le centriole, est un facteur clé pour réguler le destin cellulaire (**Figure 19 D-F**). En interphase, le centrosome contient un centriole mère et fille. Le centriole mère est le plus âgé et a pour fonction la nucléation du cil primaire, une organelle sensorielle qui détecte les signaux présents dans le fluide cérébrospinal. Le cil est crucial pour la prolifération, mais aussi la spécification neuronale et la régulation du cycle cellulaire. Les centrioles les plus âgés sont souvent hérités par la cellule fille qui maintient des caractères de cellule souche. Il a été proposé que le centriole mère retient la membrane ciliaire, et que la cellule fille qui la garde reforme alors plus vite le cil primaire, et est donc plus vite en contact avec des signaux prolifératifs (Paridaen and Huttner, 2014a). Les protéines de polarité et les déterminants cellulaires peuvent aussi être hérités de manière asymétrique. Ces protéines, comme Par3, Par6, et aPKC (atypical Protein Kinase C) sont associées dans la région apicale de l'aRG et sont importantes pour sa prolifération. Dans la moelle épinière de poisson zèbre (*Danio rerio*) comme chez le poulet, lors d'une division asymétrique neurogénique, la cellule fille qui se retrouve le plus proche du lumen hérite dans 92% des cas de Par3 et devient un neurone. L'autre cellule fille reste aRG, reforme un pied apical et re-synthétise Par3. Les GTPases RhoA, cdc42 et Rac1 ont un rôle également important dans la maintenance des jonctions adhérentes et des mitoses apicales en régulant l'actine. De même, le ligand de Notch, Delta-like1, le régulateur de l'internalisation de Delta, Mindbomb, et l'antagoniste de Notch, Numb, sont différentiellement ségrégués entre les cellules filles, ce qui

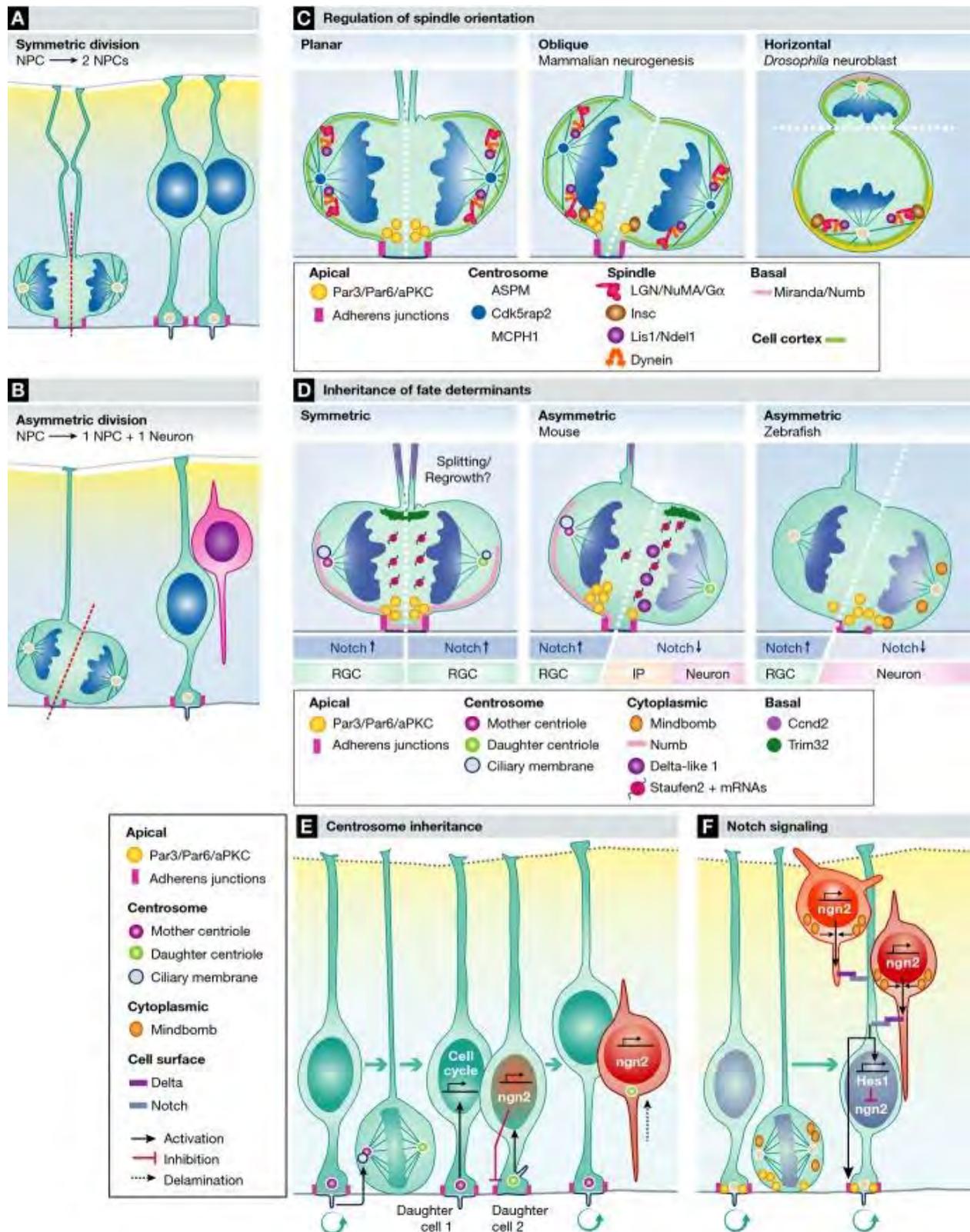


Figure 19: Rôle de l'organisation subcellulaire dans le destin des cellules filles. (Paridaen et al, 2014)

différencie, alors que l'autre cellule reste en prolifération (Paridaen and Huttner, 2014).

La conservation du pied basal et/ou apical après la division semble également être importante pour maintenir les progéniteurs en prolifération, via la signalisation intégrine venant de la surface piaie. De plus, l'ARNm du régulateur du cycle cellulaire Cycline D2 s'accumule en basal, où il est localement traduit (Paridaen and Huttner, 2014). La protéine GPR56 (G protein-coupled receptor 56) induit également un signal prolifératif au niveau du pied basal (Taverna et al., 2014). Ainsi, il a été proposé que le maintien de la capacité proliférative des bRGs est due au pied basal qu'ils héritent des aRGs (Ostrem et al., 2017). En division asymétrique, la cellule qui reste dans le cycle hérite de l'extension basale et conserve ses propriétés prolifératives. Toutefois lors d'une division symétrique proliférative, il peut être soit divisé en deux lors de la mitose, soit hérité par une des cellules filles et l'autre doit alors re-étendre une extension basale. D'après (Konno et al., 2008), lors d'une division asymétrique, une cellule fille qui garde le pied apical et basal reste en prolifération, alors qu'une cellule qui garde le pied apical mais perd le basal délamine et se différencie. Il a également été montré que lors d'une division où une des cellules filles hérite seulement de l'extension apicale, et l'autre de l'extension basale, les deux se différencient en progéniteurs basaux et/ou en neurones. De plus, la cellule gardant le pied basal devient souvent un bRG (Shitamukai et al., 2011).

Les cellules filles neurogéniques doivent détacher leur pied apical afin de migrer basalement. Elles expriment des gènes proneuraux qui répriment des cadhérines afin que la cellule délamine de la surface ventriculaire, à la façon d'une transition épithélio-mésenchymateuse. Un mécanisme alternatif, observé par (Das and Storey, 2014) dans le tube neural, est l'abscission du pied apical régulée par les gènes pronauraux en aval de cadhérine entre autre. Dans ce processus, une constriction du pied apical dépendante de l'acto-myosine est précédée d'une dissociation du centrosome du cil primaire. De cette façon, la cellule perd sa polarité apicale et les protéines du cil, ce qui mène à une sortie du cycle cellulaire et la différenciation.

D.1.3 Régulation de la production des bRGs

Les bRGs peuvent avoir plusieurs origines. Ils peuvent provenir de la délamination des aRGs (Gertz et al., 2014), mais il a également été décrit qu'ils sont produits à partir de divisions obliques ou horizontales des aRGs, c'est-à-dire un plan de clivage parallèle au ventricule (**Figure 20**) (LaMonica et al., 2013). Ces corrélations ont d'abord été faites chez le furet et l'humain, durant une fenêtre de temps restreinte (Delaunay et al., 2017). La randomisation de l'orientation du fuseau par une surexpression de Shh augmente la production des bRGs (Wang et al., 2016a). Chez les Vertébrés, les divisions non verticales sont rares et elles apparaissent à des stades tardifs de la corticogenèse murine ou alors chez des espèces gyrencéphaliques, connues pour avoir plus de bRGs. Il a été proposé qu'une division verticale donne 1 aRG et soit 1 neurone ou un 1 bIP ; alors qu'une division non verticale donne 1 aRG et 1 bRG (LaMonica et al., 2013).

Plusieurs travaux ont également montré le rôle de gènes spécifiques dans la production des bRGs. Deux études ont montré que l'expression spécifique dans les bRGs et aRGs humain des gènes PDGFR β et ARHGAP11B ; leur surexpression dans le cortex embryonnaire murin induit une augmentation des progéniteurs en mitose hors de la VZ et entraîne l'apparition de gyri (Florio et al., 2015; Pollen et al., 2014). La protéine nucléaire Trnp1, qui maintient la prolifération des aRGs via le remodelage de la chromatine, est exprimée moins fortement dans les aires d'expansion corticale du cerveau fœtal humain. Sa perte de fonction chez la souris augmente la production des bRGs/SAPs, entraîne une gyrification du cortex et l'apparition d'une SVZ basale ; en parallèle, on observe une augmentation des divisions obliques et horizontales ainsi qu'une accélération du cycle cellulaire dans tous les progéniteurs (Stahl et al., 2013).

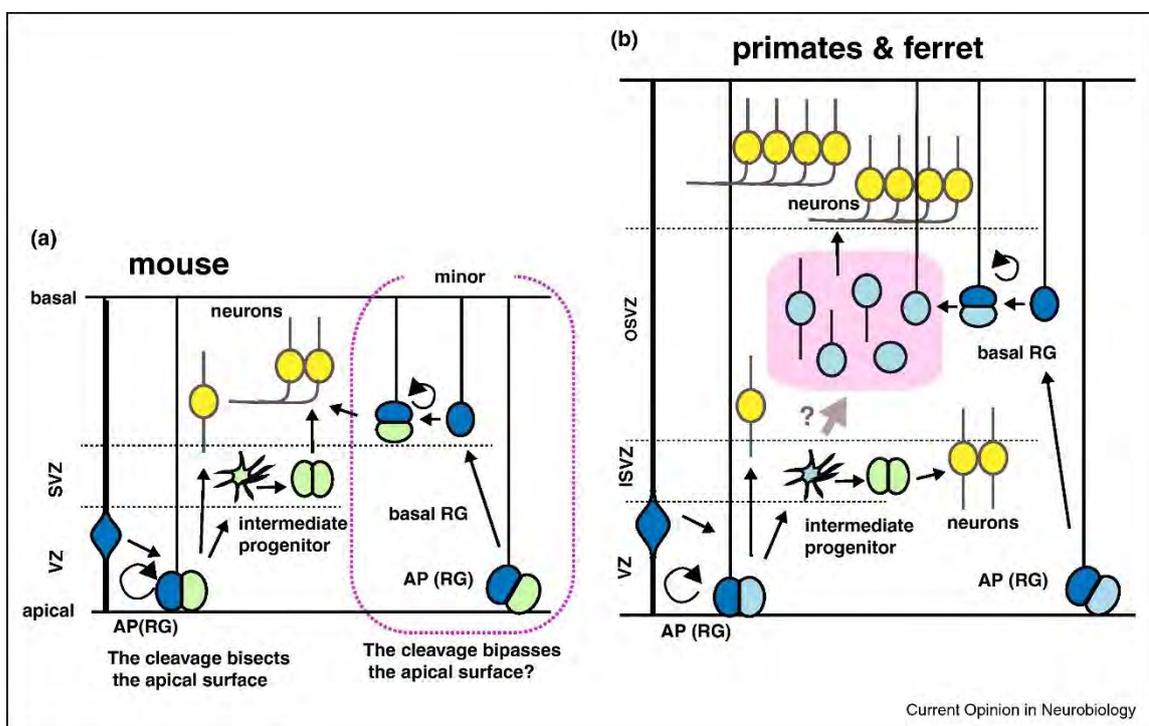


Figure 20: Hypothèse du rôle du fuseau mitotique dans le destin des cellules filles corticales. (Delauney et al., 2017)

D.1.4 Importance du mouvement nucléaire intercinétique

Comme expliqué précédemment (cf Chapitre 1 – Partie C.3.1.i) le noyau des progéniteurs spinaux, des NECs et des aRGs, se déplace le long de l'axe apico-basal au cours du mouvement nucléaire intercinétique (INM). Ce phénomène peut s'expliquer par la présence d'indices de polarité : le cil primaire est en apical, et il est lié au centrosome qui est nécessaire pour former le fuseau mitotique - moteur de la division. Etant donné que le noyau requiert plus d'espace que les extensions cellulaires et que le cycle des progéniteurs est asynchrone, l'INM permettrait de maximiser la densité cellulaire dans la zone ventriculaire (Kosodo et al., 2011).

La machinerie moléculaire impliquée dans l'INM est composée, selon l'espèce et le tissu en question, de protéines associées aux microtubules et à l'actine. Le noyau est comme un cargo qui se déplace le long des microtubules vers le pôle négatif. Dans le cortex en développement et le tube neural, le mouvement en G2 (basal vers apical) impliquent l'actomyosine, les microtubules et leurs protéines associées, et plus spécifiquement la protéine motrice dynéine (Spear and Erickson, 2012). En fin de G2, le centrosome est libéré de la surface apicale et se déplace vers le noyau. La mitose est initiée à distance de la surface apicale, puis la contraction d'actine arrondit la cellule et pousse le noyau vers la surface apicale. Le recrutement de la dynéine est essentiel pour la migration en phase G2 : en G2 précoce, la dynéine est recruté via la voie RanBP2-BicD2, alors qu'en G2 tardive, elle est recrutée par la voie Nup133-CENP-F. Ce processus est couplé à la progression du cycle cellulaire via CDK1, qui phosphoryle RanBP2 et active BicD2 (**Figure 21**) (Baffet et al., 2015). La migration vers le pôle apical du noyau est requise pour la progression en G2 et pour l'entrée en mitose (Hu et al., 2013). Les mécanismes impliqués lors de la migration en phase G1 sont plus controversés. Certaines études proposent que ce mouvement est passif et stochastique, dû à un « effet de foule » par la force exercée des noyaux en G2 sur les noyaux en G1 (Kosodo et al., 2011). D'autres études suggèrent qu'il implique un couplage entre la protéine motrice kinésine 2 et les microtubules ou le cytosquelette d'actomyosine (Molina and Pituello, 2017).

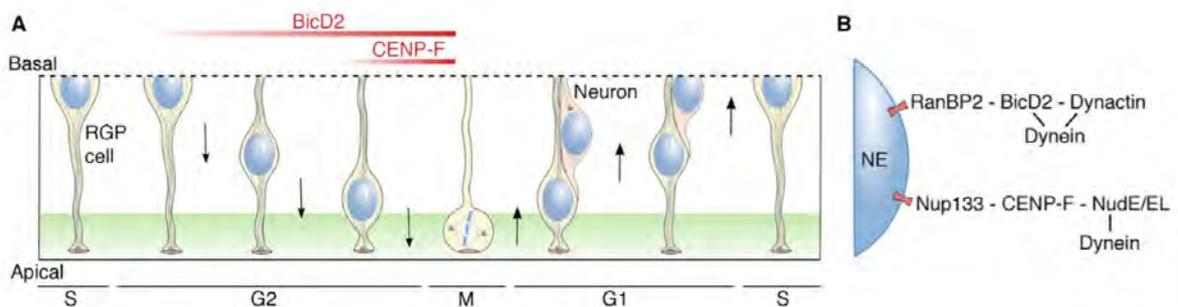


Figure 21: Déroulement du mouvement nucléaire intercinétique et sa régulation moléculaire. (Baffet et al, 2015)

La fonction de l'INM dans la régulation de la corticogenèse est depuis longtemps discutée. Il a été proposé que sa fonction soit de maximiser le nombre de mitoses des aRGs à la surface du ventricule. Le lumen étant une source de nombreux signaux extracellulaires, la mitose en apical permettrait de contrôler le destin des cellules filles par l'activité de voies de signalisation (Taverna et al., 2014) (cf Chapitre 1 – Partie D.2). Une autre fonction serait d'exposer de manière différentielle le noyau des aRGs, via sa localisation, à des signaux présents en gradient le long de l'axe apico-basal tel que Notch (Paridaen and Huttner, 2014). Cette fonction est appelée *hypothèse de résidence nucléaire* (Taverna et al., 2014). Dans le tube neural de poulet, le ligand cDelta-1 est exprimé transitoirement par les neurones nouveaux-nés, localisés en basal. Ces cellules sont en route vers le manteau et sont mélangées avec des progéniteurs en phase S et G2 (Myat et al., 1996). Dans la rétine de poisson zèbre, le ligand Delta est exprimé selon un gradient décroissant baso-apical, et une perturbation de l'INM mène à une altération de la durée et du taux d'exposition des noyaux à la signalisation

Notch, ce qui résulte en un défaut de différenciation (Del Bene et al., 2008). De plus, l'expression de Notch est élevée dans les progéniteurs en phase G2, M et G1 précoce. Toutefois, des mesures en temps réel de l'activité de la signalisation Notch dans le tube neural de poulet montrent que le début de l'activité de Notch peut être un événement aléatoire, arrivant à n'importe quelle phase du cycle (Vilas-Boas et al., 2011).

Etant donné le lien entre la progression du cycle cellulaire et de l'INM, plusieurs études ont essayé d'établir la relation causale entre les deux. Bloquer les cellules en phase G2/M bloque les mouvements nucléaires de toutes les cellules du neuroépithélium chez le poisson zèbre (Leung et al., 2011). La synchronie est permise par la protéine des microtubules Tpx2, qui se déplace entre le noyau et le cytoplasme selon la phase du cycle (Kosodo et al., 2011). L'inverse n'est pas vrai puisque le blocage des mouvements nucléaires, n'empêche pas la progression des cellules dans le cycle cellulaire (Schenk et al., 2009).

D.2 Régulation par les voies de signalisation

Les progéniteurs spinaux et corticaux sont sous l'influence de différentes voies de signalisation, dont les sources sont diverses. Les aRGs et les progéniteurs spinaux – via leur extension apicale et leur cil primaire en contact avec le ventricule – sont directement en contact avec les signaux provenant du fluide cérébrospinal.

D.2.1 Rôle de la voie Sonic hedgehog

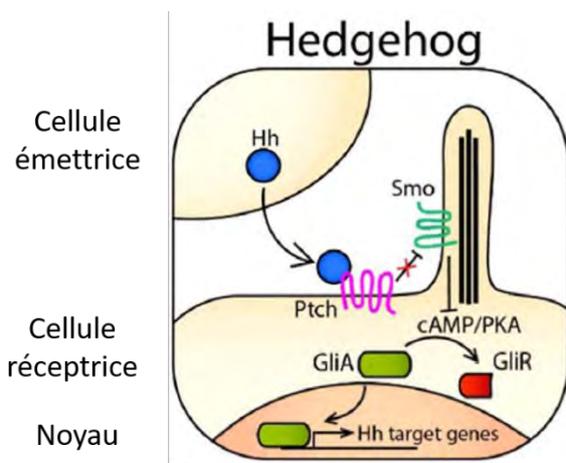


Figure 22 : Schématisation de la voie Hedgehog. (Cardozo et al., 2017)

Le ligand Shh est l'une des trois protéines (avec Dhh et Ihh) impliquées chez les mammifères dans la voie Hedgehog. Le ligand Shh est sécrété au niveau du tube neural par la notochorde, et dans le télencéphale par la région ventrale (ainsi que le choroid plexus, les cellules de Cajal-Retzius et les interneurones). Le ligand diffuse ensuite dans le fluide cérébrospinal et se lie sur son récepteur Patched1 (Ptch1) au niveau du cil primaire des progéniteurs spinaux et des aRGs. Ptch1 est alors délocalisé du cil primaire ce qui lève l'inhibition de la protéine Smo. Smo active alors les facteurs de transcription Gli2/3 et la

transcription des gènes cibles de la voie. En absence de Shh, les facteurs Gli2/3 sont sous forme de répresseur transcriptionnel (**Figure 22**) (Cardozo et al., 2017).

Plusieurs études ont montré que dans différentes régions du SNC (moelle épinière et cortex embryonnaire mais aussi dans les progéniteurs neuraux adultes), Shh promeut la prolifération et la survie des progéniteurs (Komada et al., 2008a; Lai et al., 2003; Shikata et al., 2011).

Shh est également essentiel pour la spécification des cellules des régions ventrales de la moelle épinière comme la plaque du plancher et les neurones moteurs. Des embryons Ptch-

/- montre une différenciation extensive à E8-9,5 dans la plaque du plancher, les motoneurones et les interneurones V3 (cf Chapitre 1 - B.2). Shh régule le mode de division des progéniteurs des motoneurones dans le tube neural de poulet. L'expression d'une forme constitutivement active du récepteur à Hh (SmoR2) augmente les divisions symétriques prolifératives au dépend des divisions neurogéniques (Saade et al., 2013). Une étude récente montre que l'activation de la voie Shh est corrélée à un recrutement symétrique de PKA (Protein Kinase A, un effecteur de la voie Shh) au centrosome, qui est hérité de manière égale par les cellules filles lors d'une division symétrique proliférative (Saade et al., 2017).

Des dérégulations dans la voie Shh sont responsables de lourdes malformations du télencéphale, telles que la microcéphalie ou l'holoprosencéphalie, une absence de séparation des deux hémisphères cérébraux. La suractivation de la voie Shh dans les aRGs induit une augmentation de la production des bRGs et une diminution de la production des bIPs, en corrélation avec une augmentation des divisions obliques des aRGs. Ces progéniteurs basaux prolifèrent plus, ce qui engendre une expansion neuronale dans les mutants. A l'inverse, l'inhibition de la voie Shh dans les aRGs affecte leur prolifération, leur survie et leur capacité à produire des progéniteurs basaux et ainsi des neurones (Komada et al., 2008a; Wang et al., 2016a; Yabut et al., 2015). D'autres part, l'effecteur Gli3 qui agit majoritairement comme répresseur de la voie Shh, à un rôle dans le positionnement des neurones dans le cortex. Sa perte de fonction à E13,5 induit la production de neurones qui se retrouvent dispersés dans toutes les couches corticales, alors qu'à ce stade les neurones produits se positionnent normalement dans les couches superficielles (Wang et al., 2011).

D.2.2 Implication de la voie Notch

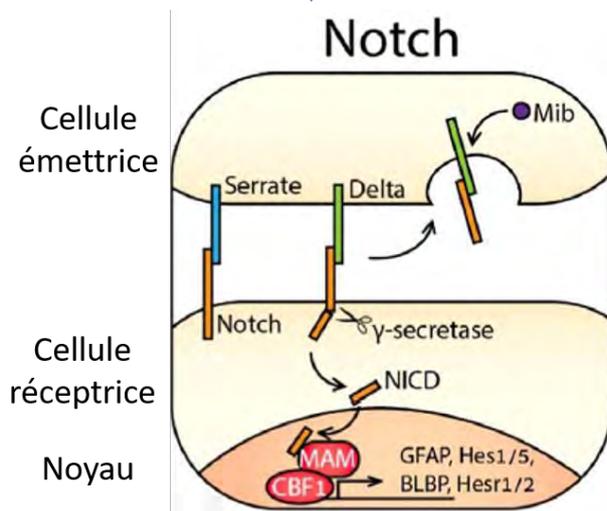


Figure 23 : Schématisation de la voie Notch. (Cardozo et al., 2017)

La signalisation Notch joue un rôle important dans la neurogenèse par un processus appelé « neurogenèse accélérée latéralement » : un progéniteur exprime le ligand Delta ou Jagged, qui se lie au récepteur Notch dans la cellule voisine, ce qui mène au clivage protéolytique du domaine intracellulaire de Notch (NICD) qui entre dans le noyau et active des gènes cibles tels que les répresseurs transcriptionnels Hes (Hairy-Enhancer of Spilt) (**Figure 23**). Hes prévient l'expression de facteurs proneuraux de type bHLH comme Ngn2, conservant ainsi la cellule

dans un état indifférencié. A l'inverse, dans le progéniteur exprimant Delta, vont être transcrits des gènes proneuraux comme NeuroD menant à la différenciation neuronale (Collier et al., 1996).

Dans le cortex, l'expression de Hes1 oscille dans les aRGs sur des périodes de 2-3h via une boucle d'auto-inhibition. Ceci induit des oscillations dans l'expression de Ngn2 et Delta, rendant le progéniteur plus ou moins permissif aux signaux entrant qui régulent la prolifération ou la différenciation (Shimojo et al., 2008). Il a été proposé que l'expression asymétrique de Notch puisse conduire à une division asymétrique, la cellule fille ayant la plus forte expression de Notch restant en prolifération. Plus récemment, Il a été observé que l'expression de Hes1 oscille en anti-phase avec l'expression des protéines Ngn2 et Ascl1 dans les progéniteurs neuraux. Une fois différenciés, les neurones maintiennent l'expression des proneuraux et répriment Hes1. L'utilisation d'un modèle d'optogénétique permettant de moduler la fréquence et l'amplitude de l'expression d'Ascl1, montre que des oscillations avec une période critique de 3h augmentent la prolifération. Une augmentation de l'amplitude des oscillations augmente le nombre de cellules proliférantes sans augmenter la différenciation (Imayoshi et al., 2013).

Le ligand de Notch, Dll1 (Delta Like 1), est principalement produit par les aRGs durant la phase proliférative, mais plus tard dans le développement les neurones et les bIPs expriment également les ligands de Notch, et peuvent donc induire un rétrocontrôle sur les aRGs (Paridaen and Huttner, 2014). En effet, les bIPs étendent des filopodes qui peuvent projeter sur de longues distances pour contacter d'autres progéniteurs dans la VZ ou la SVZ (Nelson et al., 2013).

L'activation prématurée de Notch induit l'expression de marqueurs des aRGs et inhibe la production des bIPs à partir des aRGs. La perte de fonction de Notch entraîne une neurogenèse prématurée et une perte de la polarité apico-basale des aRGs (Martynoga et al., 2012).

D.2.3 Régulation par les BMPs

La liaison du facteur de croissance BMP sur son récepteur membranaire induit la phosphorylation des effecteurs SMAD1/5, qui s'associent à SMAD4 et activent la transcription de gènes cibles (**Figure 24**).

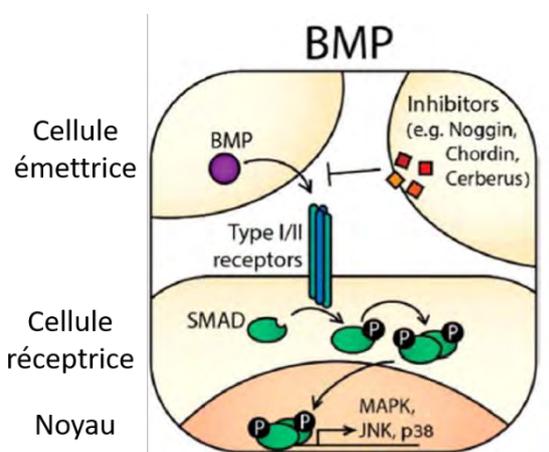


Figure 24 : Schématisation de la voie BMP. (Cardozo et al., 2017)

Dans la moelle épinière en développement, l'évolution des modes de divisions des progéniteurs (symétrique proliférative > asymétrique > symétrique neurogénique) corrèle avec le niveau d'activité des effecteurs de la voie BMP, les SMAD1/5. L'inhibition des SMAD1/5 cause une différenciation neuronale prématurée due à une réduction des divisions symétriques prolifératives en faveur des divisions neurogéniques. A l'inverse le gain de fonction des SMAD1/5 augmente la prolifération (Le Dréau et al., 2014). Cette

fonction est conservée dans le télencéphale puisque la perte de fonction par ARNi de SMAD1/5 dans le cerveau de poulet en développement augmente les divisions neurogéniques, ce qui résulte en une déplétion des progéniteurs Pax6⁺ et une augmentation des cellules Tbr2⁺ et Tbr1⁺. L'expression d'une forme constitutivement active de SMAD5 produit l'effet opposé. Ce rôle des SMAD1/5 dans l'équilibre prolifération-différenciation est conservé dans le cortex murin. Dans des embryons Smad1/5^{fl/wt}; Nestin-Cre, le nombre de neurones Tbr1⁺ est augmenté à partir de E11,5 sans que le nombre d'aRGs et de bIPs ne soit affecté. A partir de E13,5, le nombre de bIPs est diminué, entraînant une diminution de la production des neurones Satb2⁺. L'activité de BMP et des SMAD1/5 dans la corticogenèse est donc essentielle pour prévenir une différenciation trop précoce qui épuiserait le stock de progéniteurs (Najas et al., 2019).

D.2.4 Régulation par la voie Wnt

En absence du ligand Wnt, la β caténine est phosphorylée par le complexe GSK3 β /Axine/APC, ce qui adresse sa dégradation au protéasome. Lorsque le ligand Wnt se lie aux récepteurs Frizzled/LRP5/6, l'activité kinase de GSK3 est inhibée. La β caténine cytoplasmique est stabilisée et se déplace alors vers le noyau où elle s'associe avec les facteurs de transcription LEF/TCF pour promouvoir l'expression de gènes cibles (**Figure 25**).

La voie Wnt/ β caténine est importante pour la régionalisation, la prolifération et la différenciation dans le cerveau en développement. Ces rôles multiples et opposés dépendent

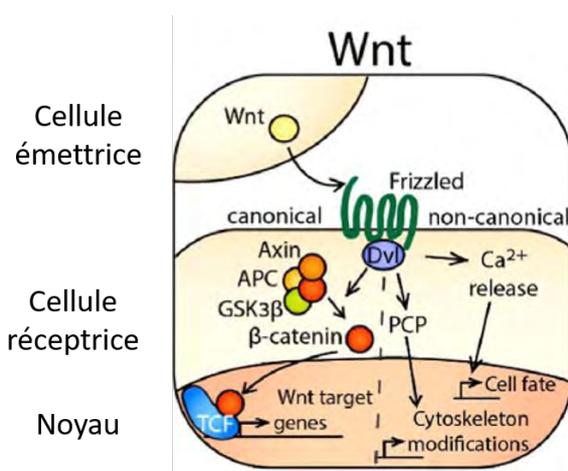


Figure 25 : Schématisation de la voie Wnt.
(Cardozo et al., 2017)

du contexte. Tôt dans la corticogenèse, la voie Wnt induit l'expression de Pax6 et promeut la prolifération des aRGs tout en retardant la production des bIPs (Woodhead et al., 2006; Wrobel et al., 2007). Plus tard, elle promeut la production des bIPs et leur prolifération (Kuwahara et al., 2010) et la différenciation des neurones via la surexpression de N-myc et Ngn1, respectivement (Munji et al., 2011). A un stade plus tardif de la corticogenèse, la répression de la voie Wnt mène à une déplétion des aRGs, bIPs et neurones corticaux et augmente la production des cellules gliales. En plus de son implication

dans la voie Wnt, la β caténine régule les jonctions adhérentes et ainsi la polarité apico-basale des aRGs. Dans des souris déficientes pour la voie Wnt - sans que la fonction non-canonique de β caténine soit affectée – les auteurs observent une déplétion des aRGs suite à une différenciation précoce en bIPs, ce qui résulte en une diminution globale de la corticogenèse et une gliogenèse prématurée (Draganova et al., 2015).

D.2.5 Rôle des FGFs

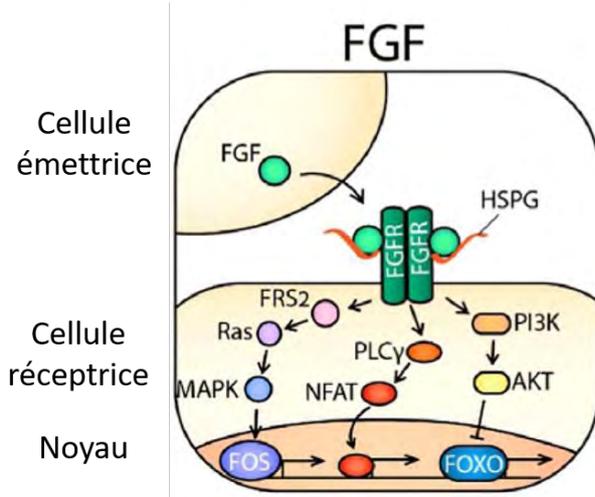


Figure 26 : Schématisation de la voie FGF.
(Cardozo et al., 2017)

Les ligands de la famille des facteurs de croissance Fgf regroupent plusieurs membres qui possèdent différentes fonctions au cours de la corticogenèse. Ils se lient sur des récepteurs Fgfr, qui possèdent une activité tyrosine kinase dans leur domaine intracellulaire et entraînent l'activation de voies telles que la voie des kinases Ras/ERK1/2/MAP (**Figure 26**).

Les facteurs Fgfs sont importants pour la régionalisation antéro-postérieure du cerveau et pour l'expansion des aRGs en favorisant leurs divisions symétriques via l'activation de Hes1 (Paridaen and Huttner,

2014). Fgf10 maintient le destin aRG au détriment du destin bIP et régule négativement la transition NEC > aRG. (Kang et al., 2009; Sahara and O'Leary, 2009). Fgf2 maintient les aRGs en prolifération en favorisant la progression dans le cycle cellulaire, via la répression de p27^{Kip1} et la surexpression de CyclinD2 (Govindan and Jabaudon, 2017). La suppression des Fgfr dans le télencéphale dorsal induit une neurogenèse précoce ce qui réduit la surface corticale (Agirman et al., 2017; Kang et al., 2009). Enfin, l'augmentation de la signalisation Fgf augmente la production des bIPs sans affecter celle des bRGs (Rash et al., 2013).

D.1 Rôle de l'environnement des progéniteurs

Les progéniteurs sont entourés d'un microenvironnement, composant de la matrice extracellulaire et de différents types cellulaires, qui régulent le comportement des progéniteurs par l'échange de signaux (**Figure 27**).

Les progéniteurs sont entourés d'une matrice extracellulaire (MEC) qui contient des molécules comme laminin et sydecin-1 régulant les adhésions apicales via les récepteurs intégrines. Des études suggèrent que la MEC crée une niche pour les cellules souches neurales qui permet des stimulations quasi-autocrines. En effet, la production de constituants de la MEC est moins forte dans la SVZ, zone de progéniteurs les plus différenciés, que dans la VZ (Florio and Huttner, 2014). De plus dans la VZ, les progéniteurs qui expriment le gène pro-différenciatif Tis21 (ou Btg2) et qui sont engagés dans une division différenciative, répriment la production endogène de constituant de la MEC (Arai et al., 2011).

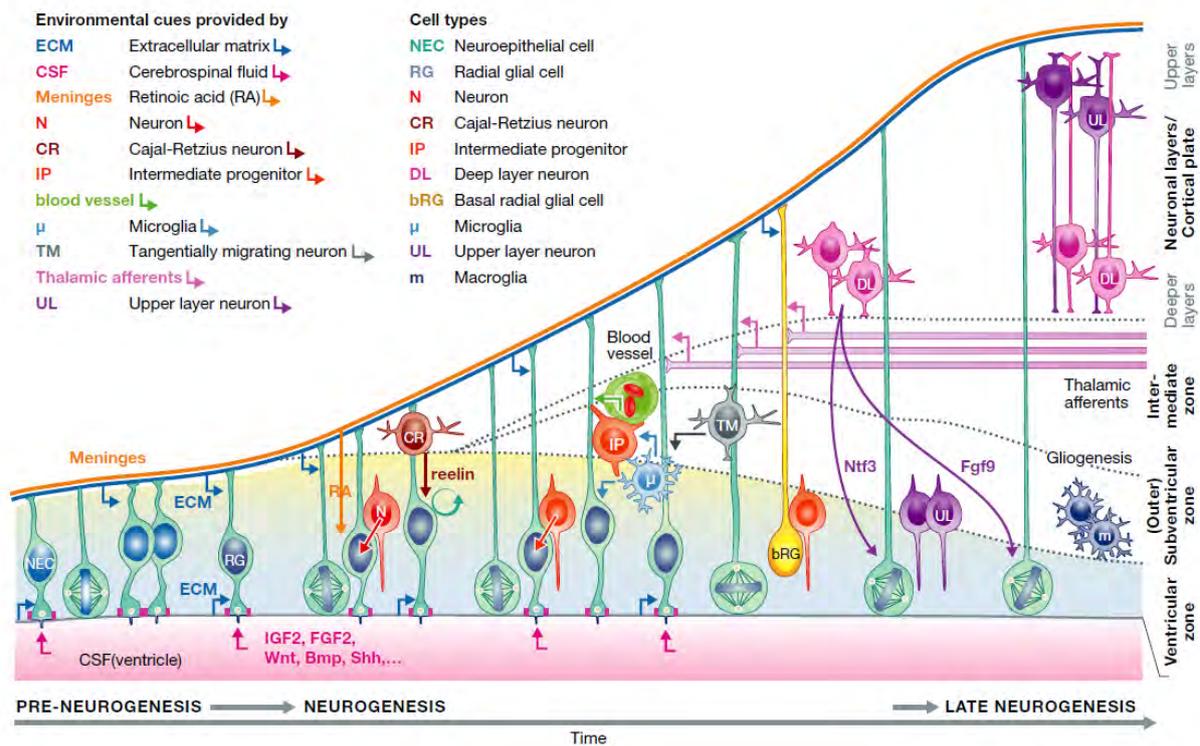


Figure 27: Illustration schématique des sources de signaux externes qui influencent les cellules du cortex. (Paridaen et al., 2014)

D'autres types cellulaires présents dans le cortex régulent la corticogenèse. Les neurones de Cajal-Retzius (CR) sont les premiers neurones nés dans le cortex, à partir des progéniteurs de l'hème corticale. Ces cellules jouent un rôle dans la régionalisation du cortex par la sécrétion de facteurs de signalisation. Elles sécrètent des glycoprotéines reelin et expriment la molécule d'adhésion cellulaire nectine, qui médie la migration neuronale. Les neurones CR régulent la prolifération des aRGs via la reelin qui amplifie la signalisation Notch dans les jeunes aRGs. Les neurones des couches superficielles sécrètent des signaux comme neurotrophin3 et Fgf9 qui régulent le destin cellulaire des progéniteurs et la transition vers la production des astrocytes. Les neurones d'origine non corticale, tels que les neurones produits dans le télencéphale ventral et qui migrent ensuite tangentiellement dans le cortex, vont également communiquer avec les progéniteurs corticaux (Paridaen and Huttner, 2014; Sessa et al., 2010; Silva et al., 2018). La microglie régule aussi le maintien de la population d'aRGs. Dans la zone ventriculaire, les vaisseaux sanguins englobent les bIPs et régulent leur prolifération. Les méninges sécrètent de l'acide rétinoïque et des chemokines qui diminuent la prolifération des aRGs, augmentent la production des bIPs et augmentent la différenciation des neurones. De plus, l'acide rétinoïque est essentiel pour la transition des divisions symétriques vers asymétriques au début de la corticogenèse (Govindan and Jabaudon, 2017).

D.1 Régulation post-transcriptionnelle et modifications épigénétiques

L'épissage alternatif des pré-ARNm résulte en la génération de différentes protéines à partir d'un transcrit primaire. Ce processus joue un rôle dans la différenciation cellulaire et a

récemment été impliqué dans la neurogenèse. Ainsi l'épissage alternatif du facteur de transcription REST mène à une dé-répression de gènes neuronaux spécifiques de l'étape de différenciation neuronale. La protéine de liaison à l'ARN Ptbp2 induit un épissage de protéines impliquées dans les adhésions des aRGs et sa délétion induit une neurogenèse prématurée (Paridaen and Huttner, 2014).

L'expression génique dans les aRGs peut également être régulée par les microARNs, des séquences non codantes très conservées de quelques nucléotides qui se fixent aux régions 3' UTR des ARNm et répriment leur expression via leur dégradation ou en bloquant leur traduction. Dans le cerveau en développement, il a été montré que plusieurs groupes de microARNs régulent soit la prolifération des aRGs, soit la différenciation neuronale. Par exemple, le microARN miR-92 supprime la transition aRG vers bIP en réprimant Tbr2 (Bian et al., 2013; Nowakowski et al., 2013).

Le rôle des longs ARNs non codants (lncARN) a été établi plus récemment. Les lncARNs codent pour des ARNs de plus de 200 nucléotides et modulent l'expression génique en modifiant la chromatine et en régulant l'épissage alternatif. Dans les aRGs engagés dans des divisions neurogéniques, plusieurs lncARNs comme Miat sont exprimés et régulent l'équilibre prolifération-différenciation (Aprea et al., 2013).

Des modifications épigénétiques comme la méthylation de l'ADN ou des modifications des histones sont également impliquées dans le contrôle temporel et spatial de l'expression génique pendant la neurogenèse. Les progéniteurs précoces présentent un taux d'expression élevé des régulateurs. Leur chromatine est dans un état plus ouvert (moins condensé) que les progéniteurs plus âgés. Par exemple, la méthylation du gène GFAP prévient d'une transition neuro-gliale trop précoce et la voie de signalisation Notch induit sa dé-méthylation. A des stades plus tardifs de la neurogenèse, les gènes proneuraux comme Ngn1 sont réprimés via l'action de protéine du complexe Polycomb à activité histone-méthyltransférase.

Des facteurs de transcription comme Pax6 sont aussi régulés par des complexes qui remodelent la chromatine comme BAF155 and BAF170. Tôt dans la neurogenèse, ces complexes modifient l'euchromatine, ce qui résulte en un recrutement de complexes répresseurs des gènes cibles de Pax6, comme Tbr2 et Cux2. Plus tard dans la corticogenèse, d'autres complexes lèvent cette inhibition pour promouvoir la production des bIPs et des neurones des couches superficielles (Tuoc et al., 2013).

Chapitre 2 : Rôle du cycle cellulaire dans la régulation de la neurogenèse

A. Le cycle cellulaire et sa régulation

Le cycle cellulaire eucaryote est composé de quatre phases. Durant la première phase intervalle (gap) ou phase G1, la cellule décide soit de rester dans le cycle pour se diviser, soit de sortir du cycle pour entrer en phase G0, phase durant laquelle la cellule reste quiescente ou se différencie en cellule mature et fonctionnelle. Si la décision est de continuer de cyclier, la cellule entre en phase de synthèse ou phase S, durant laquelle elle réplique son contenu en ADN. Une seconde phase intervalle (phase G2), qui prépare la cellule à entrer en division, précède la phase M ou mitose, qui conduira à la naissance de deux cellules filles. La progression du cycle cellulaire est finement contrôlée par des points de restriction et de contrôle qui assurent l'intégrité du matériel génomique et sa bonne répartition pour une division correcte (Molina and Pituello, 2017).

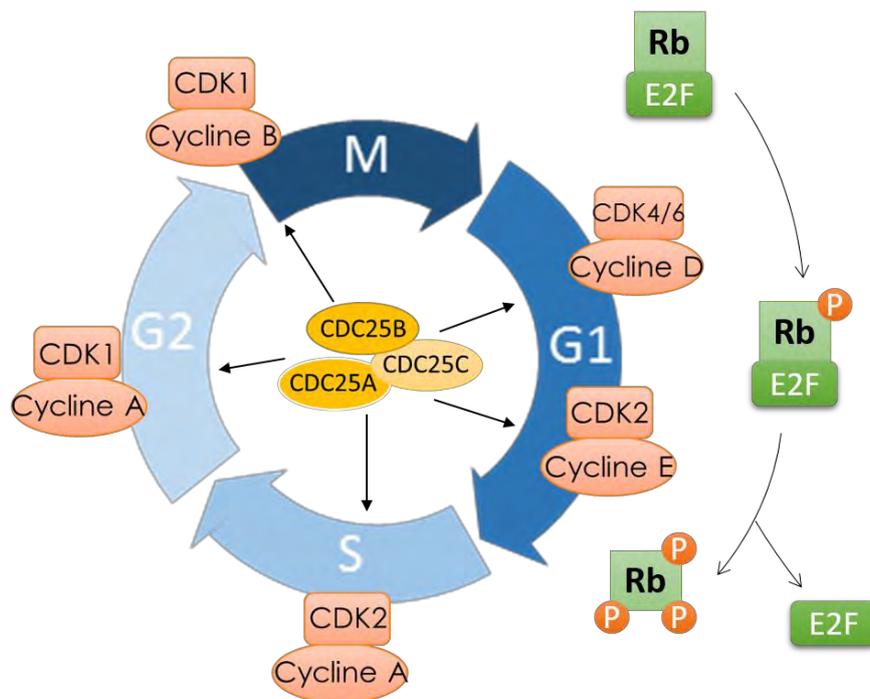


Figure 28 : Représentation schématique du cycle cellulaire et des complexes Cycline-CDK et RB/E2F qui contrôlent les transitions. Adapté de Agius et al., 2015

La progression entre les phases du cycle nécessite l'action concertée de deux structures protéiques, les CDKs (Cyclin Dependant Kinases) et leur partenaire activateur, les Cyclines. Ces deux protéines se lient pour former un complexe hétérodimérique. La liaison des Cyclines induit un changement conformationnel et une activation des CDKs via l'ouverture de leur site catalytique. C'est au niveau ce site catalytique que les CDKs se lient à leurs substrats (molécules impliquées dans la fragmentation de l'enveloppe nucléaire, compaction des chromosomes, réplication de l'ADN, etc.) et les activent par phosphorylation. Les CDKs sont activées à des moments spécifiques du cycle : CDK4 et CDK6 sont activés en G1, CDK2 à la

transition G1/S et pendant la phase S, CDK1 en G2 et en M, promouvant ainsi la progression du cycle cellulaire via la phosphorylation de substrats spécifiques (**Figure 28**) (Molina and Pituello, 2017).

Les Cyclines de type D (Cycline D1, D2, D3) couplent la machinerie du cycle avec des signaux extracellulaires. Quand la cellule est exposée à des signaux mitogènes, les Cyclines D sont surexprimées et se lient à CDK4 et CDK6 promouvant ainsi la progression en G1. Les complexes Cycline D-CDK4/6 initient la phosphorylation des membres de la famille des protéines du rétinoblastome (RB), puis le complexe Cycline E-CDK2 renforce cette phosphorylation en fin de G1. Ceci mène à la libération du facteur de transcription E2F qui active l'expression de gènes requis pour la transition G1/S, dont Cycline E et Cycline A, et la cellule s'engage à entrer en phase S et à progresser de façon irréversible vers la division, c'est le point de restriction G1. En complexe avec Cycline A, CDK2 contrôle la fin de la phase S. La progression en G2 résulte de l'activation du complexe Cycline A-CDK1 et l'entrée en mitose requiert l'activation de Cycline B-CDK1. Contrairement aux CDKs qui sont présentes tout au long du cycle cellulaire, les Cyclines sont des protéines instables (**Figure 29**). Les Cyclines D et E présentent une séquence PEST (un segment riche en proline, acide glutamique, serine et thréonine) et Cycline A et B contiennent une boîte de destruction, toutes deux requises pour la protéolyse des Cyclines. Ainsi les Cyclines D disparaissent rapidement après la fin de la mitose. L'oscillation périodique de Cycline E, A et B coordonne la réplication de l'ADN et la mitose. L'expression de Cycline E commence en fin de G1, pique à la transition G1/S et disparaît en S. La protéine Cycline A s'accumule pendant la S et la G2 et décroît durant la mitose. L'expression de Cycline B est maximum à la transition G2/M et persiste en mitose. La protéolyse de Cycline B par APC-C (anaphase-promoting complex or cyclosome) est requise pour une division complète en deux cellules filles (Molina and Pituello, 2017; Murray, 2004).

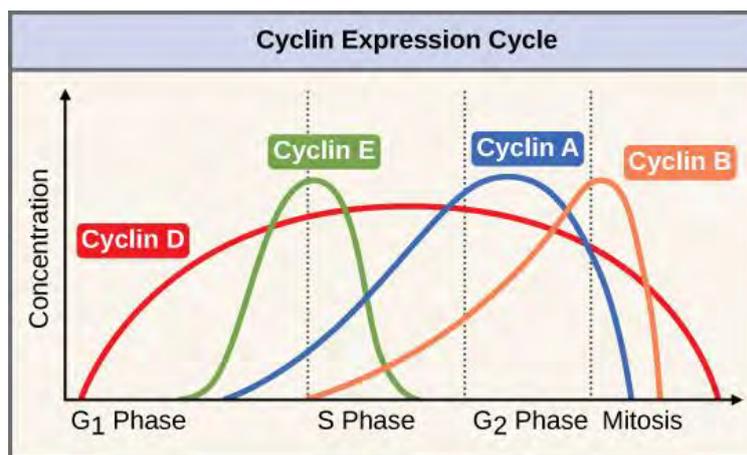


Figure 29 : Les Cyclines sont différenciellement exprimées au cours du cycle cellulaire.

Les CDKs sont également régulées par phosphorylation-déphosphorylation sur des résidus thréonine et tyrosine très conservés. Les phosphorylations inhibitrices sont causées par les kinases Myt1 et Wee1 (**Figure 30**). Les phosphatases CDC25 (Cell Division Cycle 25) jouent un rôle important dans l'activation des complexes Cycline-CDK en retirant ces phosphorésidus

inhibiteurs (Boutros et al., 2007a; Sur and Agrawal, 2016). L'activité des CDKs est aussi régulée négativement par la liaison de kinases inhibitrices (cyclin-dépendant kinase inhibitor, CKIs). Deux familles de CKIs ont été décrites : les familles INK4 (INhibitors of CDK4) et Cip/Kip (CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein). La famille des INK4 comprend quatre membres (a à d) qui inactivent spécifiquement les CDKs de la phase G1 (CDK4/6) par compétition avec les Cyclines D. La famille Cip-Kip inclue p21^{Cip1}, p27^{Kip1} et p57^{Kip2}, qui inactivent CDK2-Cycline E, CDK2-Cycline A et dans une moindre mesure CDK1-Cycline B (Harashima et al., 2013).

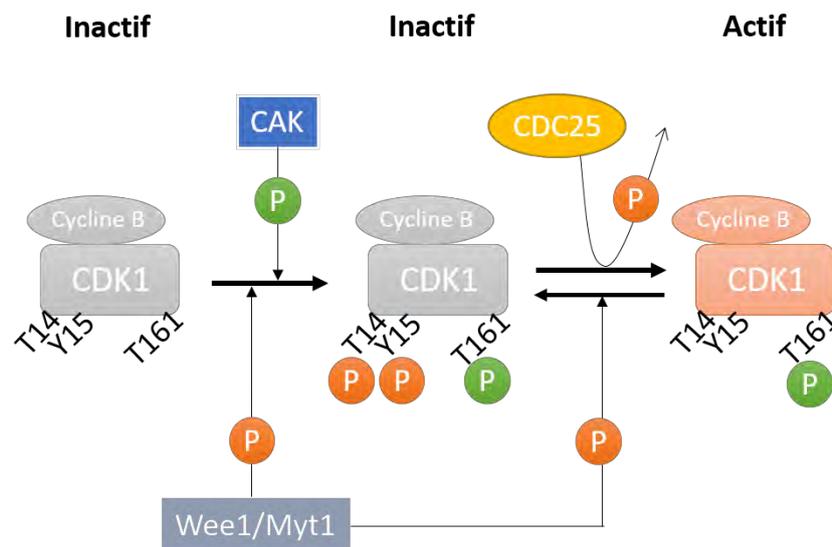


Figure 30 : Etapes d'activation d'un complexe Cycline-CDK. Adapté de Agius et al., 2015.

Tous ces acteurs de la machinerie du cycle cellulaire fonctionnent de manière coordonnée pour promouvoir la progression dans les différentes phases du cycle. Leur fonction et régulation sont bien documentées. Mais la façon dont le cycle cellulaire et ses régulateurs sont intégrés aux mécanismes cellulaires qui contrôlent le destin cellulaire, reste une question en cours d'exploration.

B. Régulations croisées entre le cycle cellulaire et les gènes proneuraux

Le cycle cellulaire et le destin cellulaire sont coordonnés par des programmes transcriptionnels. Les gènes proneuraux, régulateurs clés des différentes étapes de la neurogenèse, coordonnent la sortie du cycle cellulaire et la différenciation. Ainsi, dans le tube neural, une des premières actions de Neurog2 est de réprimer spécifiquement les Cyclines D et E, impliquées dans la transition G1/S. En même temps, Neurog2 réprime les gènes de régionalisation comme Pax6 et active des gènes de différenciation comme Neurod4 (Bel-Vialar et al., 2007; Lacomme et al., 2012a). Pax6 régule de manière indirecte l'expression de gènes impliqués dans la transition G1-S comme CDK4/6, Mcm3, Cdca2, Cdca7 et p27^{Kip1}, pour la plupart en les réprimant (Mi et al., 2013). Lors des étapes précoces de corticogenèse, Pax6 peut aussi activer des gènes du cycle comme CDK4, ce qui révèle encore une fois la dualité fonctionnelle de Pax6 selon le contexte (Sansom et al., 2009).

Dans le télencéphale ventral, *Ascl1* induit l'arrêt du cycle et la différenciation neuronale mais est aussi requis pour la prolifération des progéniteurs via un contrôle direct de gènes qui facilitent la progression dans les différentes phases du cycle (Castro et al., 2011). La transition entre ces deux fonctions opposées d'*Ascl1* n'est pas claire, et pourrait impliquer la voie Notch, ou des modifications post traductionnelles par les composants du cycle cellulaire (Castro et al., 2011). Il induit des gènes inhibiteurs du cycle cellulaire et de différenciation comme *Btg2* ou *Ebf3* mais active également un grand nombre de régulateurs positifs du cycle comme *Ebf1* ou *FoxM1* qui promeuvent respectivement la transition G1/S et G2/M. *FoxM1* est lui-même associé à la régulation transcriptionnelle d'un groupe de gènes requis pour la bonne exécution de la mitose. Son niveau d'expression augmente en fin de phase S et reste haut jusqu'en mitose. Sa perte de fonction est létale et entraîne une polypléidie et de multiples défauts du cycle cellulaire. La répression par morpholino de *FoxM1* dans l'embryon de Xénope entraîne la diminution de l'expression des marqueurs neuronaux NCAM et N-tubuline et augmente celle du marqueur de progéniteurs *Sox2*. Ce phénotype est associé à une altération de la transition G2/M (Ueno et al., 2008). Les gènes proneuraux régulent aussi indirectement les CKIs comme *p27^{Kip1}*, stabilisant ainsi l'arrêt de prolifération (Hardwick et al., 2015; Lacomme et al., 2012a).

En retour, l'activité des proneuraux est modulée par des composants du cycle cellulaire. *Neurog2* est phosphorylé sur des sites Proline-Sérine par les CDKs et par la proline kinase GSK3. Ces phosphorylations limitent la liaison de *Ngn2* à l'ADN et ainsi la transcription de gènes pro-différenciatifs comme *Neurod* ou *MyT1*. Le nombre de sites phosphorylés est intimement lié au niveau et à la durée de l'exposition aux CDKs actifs (Ali et al., 2011) et l'état de phosphorylation conditionne l'activation des gènes cibles : plus *Neurog2* est phosphorylé, moins *Neurod* est exprimé. Ceci permet à *Neurog2* d'agir comme un "rhéostat" pour détecter le niveau et la durée d'activité des CDKs. Le rallongement du cycle cellulaire – associé à une diminution de l'activité des CDKs – peut donc directement mener à l'augmentation de la différenciation neuronale (Hindley et al., 2012).

De la même façon, *Ascl1* semble être régulé par (dé)phosphorylation sur des sites CDK-dépendants et sa déphosphorylation augmente son activité au niveau de la différenciation et de la maturation neuronale (Ali et al., 2014).

Ces régulations croisées entre les composants du cycle cellulaire et les gènes proneuraux permettent donc la coordination entre l'arrêt de prolifération des progéniteurs neuronaux et leur engagement vers l'étape de différenciation neuronale.

La différenciation neuronale et la prolifération sont donc deux processus intrinsèquement liés, mais qui peuvent être découplés. Dans le tube neural, forcer la sortie du cycle cellulaire en réprimant *Cycline D1* n'est pas suffisant pour promouvoir la différenciation neuronale (Lacomme et al., 2012b). A l'inverse, le maintien des progéniteurs dans le cycle cellulaire par la surexpression de *Cycline D1* n'est pas suffisant pour empêcher leur différenciation (Lacomme et al., 2012b; Lobjois et al., 2008). Les cellules transfectées – bien qu'elles

continuent à exprimer des marqueurs de la prolifération – migrent dans la zone du manteau, expriment des facteurs de transcription impliqués dans la spécification neuronale et forment des axones (Lobjois et al., 2008). Cet aspect n'est cependant pas vrai dans le cortex, puisque la surexpression de CyclineD1-CDK4/6 diminue la production des neurones corticaux (Lange et al., 2009a).

C. Phases du cycle et destin cellulaire

Plusieurs études révèlent des corrélations entre la progression dans les différentes phases du cycle cellulaire et le déroulement de la neurogenèse.

Dans les progéniteurs de la rétine de Xénope, les gènes proneuraux sont surexprimés durant le dernier cycle cellulaire qui donnera naissance aux cellules rétinienne. Ceci suggère que le destin cellulaire est déterminé durant ce dernier cycle, et mène à se demander quelle(s) phase(s) de ce cycle sont importantes pour orienter le destin cellulaire (Cremisi et al., 2003; Ohnuma et al., 2002). Cette même étude montre que l'activité de Xath5, un gène proneural, est régulée par p25^{Xic1} et Cycline E, suggérant que le destin des cellules de la rétine est régulé pendant la phase G1. La capacité de cellules souches humaines (hESCs) à se différencier dépend de leur progression dans le cycle. Les hESCs en phase G1 précoce sont limitées à se différencier en cellules de l'endoderme, alors que celles en phase G1 tardive sont limitées au destin neuroectodermique. Les cellules en phase S, G2 ou M répondent peu aux signaux de différenciation (Pauklin and Vallier, 2013). Ces études montrent que l'engagement dans un destin cellulaire peut se passer à différents moments du cycle, ce qui suggère des mécanismes dépendants du contexte (Ohnuma and Harris, 2003).

Le nombre de division pourrait également influencer le destin neuronal en agissant comme une « horloge » qui permettrait à la cellule de restreindre ou modifier son destin au cours du temps. Mais existe-il un aspect temporel dans l'acquisition d'un destin cellulaire ? Cette question a été largement étudiée chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*), dont la mise en place du système nerveux est bien décrite. Dans cet organisme, les cellules souches neurales – appelée neuroblastes – se divisent asymétriquement pour produire une cellule différenciée et un neuroblaste. A chaque division, le neuroblaste exprime un facteur de transcription différent qui sera hérité par la cellule différenciée et lui donnera son identité (**Figure 31**). Il y a ainsi une suite d'expression : Hunchback > Kruppel > Pdm > Castor, nécessaire et suffisante pour générer les différents types neuronaux au cours du temps. Dans un mutant *string* (orthologue de Cdc25), les neuroblastes sont bloqués en G2/M et ne progressent donc plus dans le cycle cellulaire. Ces neuroblastes ne progressent plus non plus à travers cette séquence d'expression de facteurs de transcription, ce qui suggère qu'une horloge moléculaire, dépendante du cycle, est requise pour conduire l'expression séquentielle de ces gènes (**Figure 31**) (Isshiki et al., 2001).

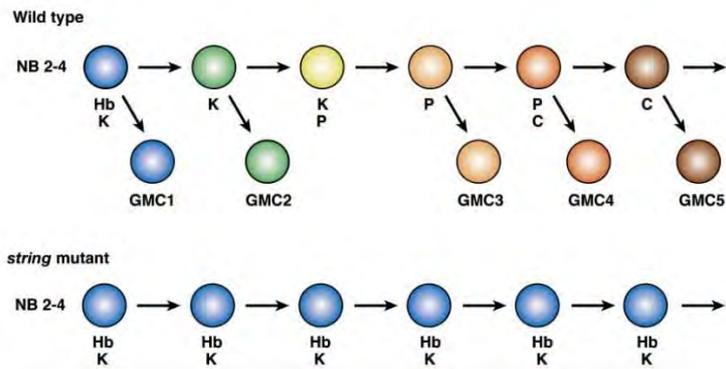


Figure 31: Transition temporelle de l'expression des facteurs de transcription dans les neuroblastes chez la drosophile. (Ohnuma and Harris, 2003)

Des études récentes ont montré que chez les mammifères, il existe également une temporalité dans l'engagement vers un destin cellulaire (Okamoto et al., 2016; Telley et al., 2019). Les aRGs expriment une séquence de gènes spécifiques au cours de la corticogenèse. L'arrêt du cycle cellulaire des aRGs *in vivo* n'affecte pas la séquence d'expression de ces gènes temporels, ni l'acquisition de l'identité neuronale laminaire. En effet, des progéniteurs dont le cycle a été arrêté à un stade précoce, produisent à un stade plus tardif des neurones des couches superficielles comme attendu, et non des neurones des couches profondes. Cette transition cycle-indépendante des gènes temporels est contrôlée de manière cellule-autonome et cellule non-autonome (Okamoto et al., 2016). Si le nombre de division n'affecte pas le destin cellulaire, le déroulement du cycle et ses régulateurs sont toutefois des paramètres essentiels.

Dans les parties suivantes, je décrirai comment les acteurs de la machinerie du cycle peuvent réguler directement la neurogenèse, puis je discuterai de l'aspect temporel de la progression dans les différentes phases du cycle.

C.1 Régulation directe de la neurogenèse par les composants de la machinerie du cycle cellulaire

Les composants de la machinerie du cycle cellulaire ne sont pas distribués uniformément au cours de la neurogenèse. Certains sont exprimés dans des tissus et à des stades développementaux spécifiques, selon un patron qui ne peut pas être expliqué uniquement par des différences de taux de prolifération. Cela suggère que ces régulateurs ont une action plus directe dans la régulation de la neurogenèse et que ce rôle peut ne pas être lié à leur capacité à réguler le cycle cellulaire (Hardwick et al., 2015).

C.1.1 Cyclines

Les Cyclines D présentent un profil d'expression différentiel dans le cortex en développement : Cycline D1 est présente dans la VZ, alors que Cycline D2 est dans la SVZ. De plus, Cycline D2 a la particularité d'être héritée asymétriquement par une des deux cellules filles, qui re-entre alors dans le cycle cellulaire (Osumi et al., 2008; Tsunekawa et al., 2012). Si Cycline D2 peut

compenser l'absence de Cycline D1, elle est nécessaire aux bIPs pour leur prolifération, puisque sa perte de fonction résulte en une microcéphalie (Glickstein et al., 2009).

De façon intéressante, le patron d'expression des Cyclines D est différent dans le tube neural : les deux gènes sont exprimés dans les progéniteurs de motoneurones, mais dans les précurseurs (neurones immatures), Cycline D1 persiste alors que Cycline D2 n'est plus exprimée. Des expériences de gain et perte de fonction dans le tube neural d'embryon de poulet montrent que Cycline D1 a une fonction indépendante du cycle cellulaire dans la différenciation des neurones moteurs, puisque la surexpression d'une forme mutée de Cycline D1, incapable d'interagir avec CDKs, peut toujours promouvoir la neurogenèse. (Bienvenu et al., 2010; Lukaszewicz and Anderson, 2011) ont montré que Cycline D1 peut directement contrôler l'expression génique dans la rétine en développement en se liant au promoteur du gène *Notch1*, où il recrute des modificateurs épigénétiques et entraîne l'activation transcriptionnelle du gène. Dans le tube neural, la perte de fonction de Cycline D1 diminue l'expression de *cHes6*, effecteur transcriptionnel de la voie non canonique de Notch qui promeut la neurogenèse (Lukaszewicz and Anderson, 2011).

Cycline D1 régule également des étapes précoces du développement embryonnaire (Pauklin and Vallier, 2013). Pendant l'étape de gastrulation, la voie Activine/Nodal promeut la différenciation endodermique via l'activité de ses effecteurs transcriptionnels Smad2/3 au noyau. Les Cyclines D1-3 régulent l'activité de cette voie en phosphorylant Smad2/3 en fin de G1, ce qui bloque leur transition dans le noyau et prévient la différenciation endodermique, favorisant par défaut la différenciation en neuroectoderme. Ce groupe a montré plus récemment qu'à l'échelle sub-cellulaire, Cycline D1 est présente au niveau de la chromatine des cellules souches pluripotentes en fin de G1 et au cours de la transition G1/S. De ce fait, elle recrute des corépresseurs transcriptionnels au niveau de gènes endodermiques et des coactivateurs au niveau de gènes neuroectodermiques, régulant ainsi le destin des couches germinales directement au niveau transcriptionnel (Pauklin et al., 2016). Cette fonction transcriptionnelle est indépendante de sa fonction kinase sur CDK4/6. Ces études montrent bien la coordination entre la progression du cycle cellulaire, l'activité des voies de signalisation et la transcription génique pour réguler le destin cellulaire.

C.1.2 Inhibiteurs des CDKs

Les CKIs de la famille Kip/Cip : p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}, régulent l'activité des complexes Cycline-CDK contenant Cycline D, E et A. Ils poussent les cellules à sortir du cycle au cours de la phase G1, en s'associant aux complexes Cycline-CDK, ce qui les empêche de lier l'ATP et bloque ainsi leur activité catalytique. Ce sont les régulateurs du cycle dont les fonctions cycle-indépendantes ont été le mieux décrites.

p27^{Kip1} régule la sortie du cycle cellulaire mais promeut également la différenciation neuronale et la migration, via des mécanismes distincts. La perte de fonction de p27^{Kip1} dans le cortex entraîne une réduction du nombre de neurones immatures qui expriment des marqueurs post-mitotiques (Nguyen et al., 2006), alors que sa surexpression promeut la différenciation

des progéniteurs corticaux en neurones (Nguyen et al., 2006). Cette fonction est spécifique de p27^{Kip1} car la surexpression d'autres CKIs de la famille des Cip/Kip n'induit pas de différenciation. La surexpression d'une forme mutée p27^{ck-} (incapable de se lier aux Cycline CDK et d'induire la sortie du cycle) promeut la différenciation neuronale (Besson et al., 2004). De plus, le remplacement de la séquence sauvage de p27^{Kip1} par la forme p27^{ck-} dans le cerveau murin n'affecte pas la différenciation neuronale (Nguyen et al., 2006). La suppression de la fonction cycle de p27^{Kip1} n'abolit donc pas sa fonction neurogénique, indiquant qu'il régule le cycle et la différenciation neuronale via deux mécanismes moléculaires distincts. La fonction neurogénique passe par une stabilisation du proneural Ngn2 qui est co-exprimé avec p27^{Kip1} dans les progéniteurs de la VZ et de la SVZ. p27^{Kip1} stabilise Ngn2 via un mécanisme qui dépend de l'intégrité de sa partie N-terminale mais ne requiert pas l'interaction avec Cycline-CDK (Nguyen et al., 2006). p27^{Kip1} fait également partie d'un complexe répresseur du promoteur Sox2, montrant qu'il joue aussi un rôle actif pour supprimer l'état progéniteur (Li et al., 2012). Sa fonction dans la migration neuronale est également indépendante de sa liaison aux CDKs. Dans ce contexte, p27^{Kip1} régule la partie C-terminale de RhoA, molécule impliquée dans l'organisation du cytosquelette d'actine qui doit être inhibée pour permettre la migration neuronale. Toutefois, on ne peut pas exclure l'impact de la cinétique du cycle dans ces processus, puisque la surexpression de p27^{Kip1} induit un rallongement de la phase G1 et de la longueur totale du cycle. Cette « fenêtre temporelle » pourrait permettre l'accumulation de déterminants neuronaux favorisant ainsi la différenciation et la migration, en parallèle des fonctions cycle-indépendantes de p27^{Kip1} (Nguyen et al., 2006).

p27^{Xic1}, l'orthologue de p27^{Kip1} chez le Xénope, contrôle aussi la différenciation et le destin cellulaire dans la rétine. Sa surexpression mène à la sortie prématurée du cycle et à la conversion de progéniteurs rétiniens en cellules gliales de Müller. La surexpression de p27^{Xic1} dans la rétine de mammifère induit le même phénotype, mais la surexpression de p27^{Kip1} n'affecte pas directement le destin rétinien, indiquant une différence de mécanisme entre ces deux orthologues.

Cette fonction est portée chez les mammifères par p57^{Kip2}, qui spécifie les neurones amacrines dans la rétine (Dyer and Cepko, 2000). p57^{Kip2} peut également interagir avec le récepteur nucléaire Nurr1 de manière cycle-indépendante pour promouvoir un destin dopaminergique des neurones du diencephale. Il peut aussi réprimer l'activité transcriptionnelle de proneuraux comme Ascl1 ou NeuroD, et pourrait être important pour la différenciation gliale, régulant ainsi la neurogenèse et la gliogenèse selon le contexte (Tury et al., 2012).

Au cours de la corticogenèse, p57^{Kip2} et p27^{Kip1} ont des fonctions complémentaires. p57^{Kip2} est exprimé plus tôt que p27^{Kip1} dans les aRGs et les bIPs. Sa perte de fonction augmente la prolifération et le nombre de progéniteurs à E14,5. La durée totale du cycle des aRGs est plus courte, due à un raccourcissement de la phase G1. Le nombre de neurones des couches V et VI est augmenté ce qui résulte en une macrocéphalie. p27^{Kip1} est exprimé à des stades plus tardifs dans les bIPs et régule leur prolifération, contribuant ainsi à la génération des neurones des couches II-IV. De plus, les motifs protéiques requis pour les fonctions CDK-indépendantes

de p57^{Kip2} et p27^{Kip1} sont différents, ce qui laisse penser que leur mécanisme d'action est distinct (Mairet-Coello et al., 2012).

Contrairement aux autres CDKIs, la fonction neurogénique de p21Cip1 a été moins bien décrite. On sait néanmoins qu'elle est requise pour activer la différenciation des oligodendrocytes (Hardwick et al., 2015).

C.1.3 La protéine du Rétinoblastome Rb

La perte de fonction conditionnelle de Rb dans le cerveau entraîne des mitoses ectopiques, qui se déroulent dans la zone de différenciation. Ces cellules en mitose expriment des marqueurs neuronaux et continuent à produire tous les neurones de projection. De plus, les mutants présentent un défaut de migration radiale des neurones glutamatergiques et de migration tangentielle des interneurons. Ce phénotype est dû à l'altération de l'expression E2F-dépendante de Néogénine, un récepteur aux ligands chimiotrophiques, qui est normalement réprimé par Rb, ce qui mène à un problème de migration et d'adhésion (Hardwick et al., 2015). De plus, la neurogenèse en interagissant avec des facteurs de transcription. Pax6 régule l'activité de Rb en inhibant sa phosphorylation (Mi et al., 2013) ; d'autre part, Rb régule positivement la transcription de Neurod1 dans l'hypophyse, en formant un complexe avec le récepteur nucléaire orphelin RGF1-B (Batsché et al., 2005).

C.1.4 Géminine

Cette protéine nucléaire régule la réplication de l'ADN ; elle s'accumule en phase S et inhibe la ré-initiation de la synthèse d'ADN pour prévenir d'une deuxième duplication à chaque cycle cellulaire. A la fin de la mitose, Géminine est dégradée avec Cycline B par le complexe APC/C, ce qui permet la réplication durant la phase S suivante. Géminine promeut la spécification du lignage neural précoce à partir de cellules souches pluripotentes, mais maintient ces cellules en prolifération avant leur différenciation. Sa fonction cycle est portée par sa partie C-terminale, alors que la surexpression de sa partie N-terminale seule induit la formation de tissu neural chez le Xénope. Géminine a donc une double fonction dans la régulation du cycle cellulaire et de la différenciation neurale (Hardwick et al., 2015).

Bien que ces régulateurs agissent directement sur des processus transcriptionnels ou via une voie de signalisation, ils le font toujours dans un contexte dépendant du cycle cellulaire. Il est donc difficile d'imaginer ces fonctions comme étant complètement découplées du cycle cellulaire. Dans la partie suivante, j'aborderai les données montrant comment la dynamique du cycle est modulée par les processus développementaux.

C.2 Rôle de la cinétique du cycle dans le destin cellulaire

La durée totale du cycle cellulaire augmente progressivement au cours de la neurogenèse. Dans tube neural murin, le taux de prolifération est constant et la durée du cycle cellulaire dure 9h en moyenne, jusqu'à que la différenciation commence, à partir du stade E9. A ce moment-là, le taux de prolifération diminue graduellement et la durée du cycle augmente, principalement via un rallongement de la phase G1 (Kicheva et al., 2014). De même dans le

cortex, le cycle cellulaire est plus long dans les progéniteurs différenciatifs Tis21⁺, et le cycle des aRGs s'allonge de 8h jusqu'à 18h au cours du temps (Calegari et al., 2005).

Le lien entre la modulation de la longueur du cycle cellulaire et différenciation est un phénomène observé dans différents types cellulaires (Lange et al., 2009a). Le rallongement du cycle par la répression de l'activité de CDKs est nécessaire et suffisant pour la différenciation neuronale, autant *in vitro* dans des cellules PC12 (Dobashi et al., 2000) que *in vivo* dans le cortex (Calegari and Huttner, 2003). A l'inverse, le raccourcissement du cycle par la surexpression de Cycline A2/CDK2 dans la blastula de Xénope résulte en un délai de la différenciation des neurones primaires (Richard-Parpaillon et al., 2004). La perte de fonction de Sp2, régulateur du cycle, induit un raccourcissement de la phase G2 et G1 et un rallongement de la mitose sans que la durée totale du cycle ne soit affectée. Dans le cortex des mutants Sp2^{-/-}, le nombre d'aRGs est fortement augmenté, alors que le nombre de bIPs et de neurones est diminué. Dans ce contexte, l'allongement normal de la durée du cycle et des phases gap G1/G2 est empêché, ce qui induit une ré-entrée des cellules dans le cycle et bloque leur différenciation en bIPs ou en neurones (Liang et al., 2013).

Pour mieux comprendre le rôle de chaque phase du cycle, plusieurs études ont visé à modifier spécifiquement leur cinétique et à déterminer les conséquences de ces manipulations sur le déroulement de la neurogenèse. Je détaillerai ces données dans les parties suivantes.

C.2.1 Phase M

La division cellulaire est une étape critique du cycle cellulaire, une perturbation de son déroulement pouvant entraîner des catastrophes mitotiques. On en sait encore peu sur les conséquences de la modification de la cinétique de la mitose sur le destin cellulaire.

Dans le cortex, la durée de la phase M dans les aRGs augmente avec le temps. Les bIPs ont une phase M plus courte que les aRGs, et cela pourrait être dû au fait que leur fuseau mitotique ne fait pas de mouvements oscillatoires en prométaphase, mouvements nécessaires aux aRGs pour orienter leur plan de division par rapport au ventricule (Arai et al., 2011). La prométaphase et la métaphase sont plus longues dans les aRGs prolifératifs Tis21⁻ que dans les aRGs neurogéniques Tis21⁺ (Mora-Bermúdez et al., 2016). L'induction d'un rallongement de la phase M dans les aRGs via l'utilisation d'un mutant Magoh^{+/-} ou de drogues spécifiques, entraîne l'augmentation du nombre de divisions générant des neurones ainsi que des cellules apoptotiques au détriment de la production de progéniteurs aRGs et bIPs. Cet effet est dû à une augmentation des divisions asymétriques neurogéniques au dépend des divisions symétriques prolifératives. Les auteurs observent une corrélation directe entre durée de la mitose et destin cellulaire : plus ils rallongent la mitose des aRGs, plus leur descendance est apoptotique. Ce phénotype apoptotique est lié à un délai d'activation de p53. En effet, la perte de fonction de p53 bloque la génération des cellules filles apoptotiques, mais pas celle des neurones. Une longue phase M promeut donc la neurogenèse de façon p53-indépendante et provoque une apoptose pathologique dépendante de p53 (**Figure 32**) (Pilaz et al., 2016).

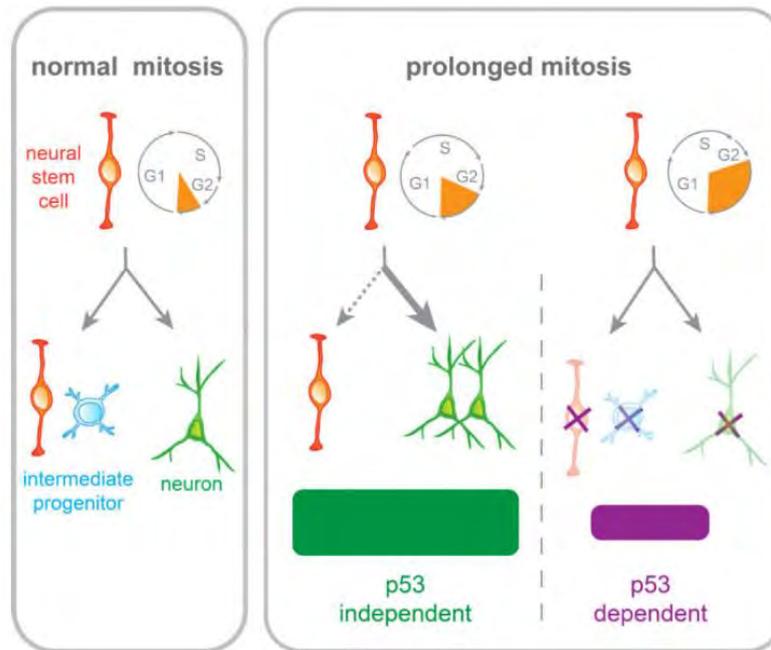


Figure 32 : Résumé graphique des effets du rallongement de la phase M par la perte de fonction de Magoh. (Pilaz et al, 2016)

C.2.2 Phase G1

De nombreuses études montrent des corrélations entre la longueur de la phase G1 et le destin cellulaire. Le rallongement de cette phase est associé à la différenciation dans le cortex (Calegari et al., 2005), et plus particulièrement à la transition aRG > bIP (Arai et al., 2011). À l'inverse, une G1 courte est une caractéristique des cellules souches pluripotentes, de l'autorenouveau et de la prolifération (Pauklin and Vallier, 2013).

Les premières données concernant l'importance de la longueur de la phase G1 ont été apportées via des modulations de facteurs extracellulaires connus pour contrôler la balance prolifération/différenciation des progéniteurs corticaux. Le facteur de croissance FGF2, qui maintient la prolifération des progéniteurs au début de la neurogenèse, raccourcit la phase G1 via l'augmentation de l'expression de Cycline D1 et la répression de p27^{Kip1}. Ces modifications sont associées à une diminution des divisions neurogéniques (Lukaszewicz et al., 2002). À l'inverse, Neurotrophine 3 rallonge la phase G1 et promeut les divisions neurogéniques (Lukaszewicz et al., 2002). De la même façon, le facteur IGF1 promeut les divisions prolifératives en induisant l'expression de Cycline D1, D3 et E et réprime simultanément p27^{Kip1} et p57^{Kip2} (Mairet-Coello et al., 2012). Cependant, ces approches sont indirectes (puisque ces facteurs agissent globalement sur de nombreux autres gènes) et n'excluent pas qu'une partie des phénotypes observés soient dues également à des effets non-G1 dépendants.

Une façon plus directe de moduler la longueur de la phase G1 expérimentalement est d'agir sur les régulateurs de la G1 et de de la transition G1/S (Lim and Kaldis, 2012). La perte de fonction de Cycline D2, exprimé spécifiquement dans les bIPs, rallonge la G1 et diminue la

phase S. Dans ce mutant, la prolifération des progéniteurs et surtout des bIPs est diminuée et le taux de sortie du cycle est augmenté ; toutefois la neurogenèse est diminuée (Glickstein et al., 2009). Dans une lignée murine possédant trois copies du gène *Dyrk1a* (Dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A), le niveau protéique de Cycline D1 nucléaire est réduit, ce qui induit un rallongement des phases G1 et S. Au stade E11,5, le nombre de bIPs est augmenté alors que les neurones *Tbr1+* sont diminués. Le nombre d'aRGs n'étant pas modifié, les auteurs concluent que ce phénotype est dû à un changement du mode de division, les aRGs faisant des divisions aRG>bIP au lieu de aRG>N (Najas et al., 2015). L'analyse de mutants des régulateurs du cycle est cependant compliquée du fait de leur redondance. Par exemple, des cellules souches neurales provenant de souris Knock-Out pour CDK2 et CDK4 peuvent toujours répliquer leur ADN via la compensation de CDK1, CDK6 et Cycline D1. Cette perte de fonction induit cependant un rallongement de la phase G1, et des divisions symétriques neurogéniques précoces qui entraînent une déplétion des bIPs ce qui entraîne une réduction de l'épaisseur de la plaque corticale.

Pour s'affranchir de ces problèmes de redondance, les équipes de W.Huttner et C.Dehay ont utilisé des approches dans lesquelles les modifications de la phase G1 sont réalisées de façon « aigue ». C'est-à-dire, soit par gain de fonction des acteurs de la phase G1, soit en perte de fonction par ARNi, pour ne pas laisser le temps au système de mettre en place des mécanismes de compensation. Ils montrent que la surexpression du complexe Cycline D1-CDK4 dans le cortex à E13,5, qui raccourcit la phase G1 de 30% après 24H, entraîne une diminution de la production neuronale (Lange et al., 2009a). En parallèle, ils observent une augmentation de la production et de la prolifération des bIPs. Il faut noter que si la durée totale du cycle est légèrement diminuée malgré un rallongement de 35% de la phase S et 25% de la phase G2, le taux de prolifération et le plan de clivage ne sont pas affectés par ces manipulations. A l'inverse, la répression de Cycline D1-CDK4 par ARNi rallonge la G1 de 20%, augmente le nombre de neurones différenciés, et diminue le nombre de bIPs alors que le nombre d'aRGs est augmenté après 48H (Lange et al., 2009a). Des résultats similaires sont obtenus par la surexpression et la répression de CyclinD1 et Cycline E seules. Les auteurs montrent que l'augmentation des bIPs lors du raccourcissement de la G1 se fait en trois temps, i) une augmentation de l'auto-renouvellement des aRGs par divisions prolifératives, ii) ces aRGs génèrent plus de bIPs par divisions asymétriques prolifératives, iii) les bIPs augmentent leurs divisions prolifératives (Pilaz et al., 2009). Cet effet est conservé dans la neurogenèse adulte, puisque la surexpression de CyclineD1-CDK4 dans l'hippocampe résulte en une augmentation des divisions prolifératives au dépend des divisions neurogéniques (Artegiani et al., 2011).

L'ensemble de ces données soutiennent l'hypothèse de « l'allongement du cycle cellulaire », qui postule que l'allongement de la G1 est un déterminant critique pour la différenciation au cours de la corticogenèse embryonnaire et de la neurogenèse adulte. L'allongement de la phase G1, à partir d'une certaine longueur seuil, serait nécessaire pour l'accumulation et l'action de facteurs déterminants, comme des facteurs de transcription, des effecteurs de

voies de signalisation (Pauklin and Vallier, 2013) ou des modifications épigénétiques (Singh et al., 2013) qui induisent la différenciation.

Mais à l'inverse le raccourcissement de la G1 est-il suffisant pour promouvoir la prolifération ? La perte de fonction de Brap, régulateur de la cascade Ras/Raf/MEK/ERK et donc de la transition G1/S, induit un raccourcissement de la phase G1, ainsi qu'un rallongement des phases S et G2. Le nombre de progéniteurs n'est pas affecté, toutefois la production neuronale est diminuée au cours du développement et entraîne une microcéphalie. Cette étude suggère qu'une G1 courte n'est pas suffisante pour promouvoir la prolifération, mais plutôt qu'une G1 longue apporte le temps nécessaire à la cellule pour devenir mature et se différencier (Lanctot et al., 2017). D'autres données soutiennent cette hypothèse. Rallonger la phase G1 via l'invalidation de CDK4/6 et Cycline D1, ou via la surexpression de p21, n'induit pas de répression des marqueurs de la pluripotence dans les hESC (Gonzales et al., 2015). Enfin, contrairement au cortex, il n'existe pas dans la moelle épinière de lien clair entre la longueur de la phase G1 et le destin cellulaire (Lacomme et al., 2012a; Lobjois et al., 2004, 2008; Lukaszewicz and Anderson, 2011).

C.2.3 Phase S

La réduction de la durée de la phase S semble être corrélée à un potentiel différenciatif. En effet, la phase S est plus courte dans les progéniteurs Tis21+ (aRGs comme bIPs), c'est-à-dire qui vont réaliser des divisions différenciatives ou neurogéniques. Ce phénomène pourrait refléter une diminution du temps accordé à la réparation de l'ADN lors de la réplication. Les bIPs, au potentiel différenciatif plus important que les aRGs, sont enrichis en inhibiteurs de la phase S alors qu'ils sont pauvres en gènes de réparation de l'ADN. Lors d'une division proliférative, une mauvaise réparation de l'ADN peut mener à la mort cellulaire. Mais à l'issue d'une division différenciative, les cellules filles sortent du cycle et peuvent s'accommoder d'un génome erroné, ce qui peut même être un atout pour augmenter la diversité neuronale (Arai et al., 2011).

Le furet (*Mustela putorius furo*) a un cortex gyrencéphalique, évolutivement plus avancé que celui de la souris, et possède un plus grand nombre de progéniteurs basaux dont le potentiel prolifératif est plus important. Contrairement à ceux de la souris, le cycle cellulaire des progéniteurs du furet est plus long et la durée de la phase G1 varie peu entre les différents types de progéniteurs (Turrero García et al., 2016). En revanche, les auteurs observent que la durée de la phase S raccourcit à mesure que les progéniteurs passent d'un profil transcriptionnel caractéristique de l'auto-renouvellement à un profil caractéristique de la production neuronale. Ainsi, la durée de la S varie de 2h dans les bIPs jusqu'à 16,1h dans les aRGs et 22,6h dans les bRG.

C.2.4 Phase G2

Au cours du cycle cellulaire des progéniteurs corticaux, la phase G2 est celle dont la durée varie le moins entre les progéniteurs prolifératifs / neurogéniques et aRGs / bIPs (Arai et al., 2011). Cette phase est pourtant importante pour la bonne mise en place du fuseau mitotique

dont on connaît le rôle dans le destin cellulaire (Gruber et al., 2011). De plus c'est au cours de la G2 que certains déterminants, comme des facteurs de transcription ou des voies de signalisation telles que WNT, sont exprimés (Davidson et al., 2009). Quelques études ont fait des liens entre destin cellulaire et modification de la cinétique de la phase G2.

Chez la drosophile, au cours du développement de l'organe sensoriel, les progéniteurs primaires (pl) s'arrêtent en phase G2 pendant une durée déterminée. Lorsqu'ils entrent en mitose suite à cet arrêt en G2, ils génèrent un neurone et une cellule non neuronale via une division terminale. L'entrée prématurée des pl en mitose, via la surexpression de CDK1 ou de CDC25^{stg}, résulte en une augmentation de l'auto-renouvellement des pl et une production surnuméraire de cellules non neuronales. Les pl réalisent une division asymétrique donnant naissance à un nouveau pl et une cellule sœur qui peut générer deux cellules non neuronales. Dans ce contexte, l'arrêt en G2 pourrait servir à coupler la division cellulaire avec la réception de signaux différenciatifs neuronaux, limitant la prolifération des progéniteurs et la production de cellules surnuméraires (Aveni et al., 2016).

Le rallongement de la phase G2, en conjonction avec un rallongement de la phase S, retarde la différenciation des cellules souches embryonnaires humaines. La modification de la phase G2 augmente le niveau d'expression de Cycline B1. La perte de fonction de Cycline B1 induit une répression des marqueurs de la pluripotence et à l'inverse sa surexpression retarde la différenciation. Cycline B1 agit en aval du rallongement de la G2 dans sa fonction proliférative et la surexpression de Cycline B1 augmente l'activité de l'antagoniste de TGF β , qui pourrait être le mécanisme moléculaire causant le retard de différenciation (Gonzales et al., 2015).

Quelques données mettent également en lumière des liens entre longueur de G2 et neurogenèse. La perte de fonction de HDAC3 (Histone deacetylase 3) *in vitro* induit un rallongement de la phase G2 via la stabilisation de CDK1 et entraîne une diminution de la prolifération des cellules souches neurales adultes de l'hippocampe. Dans des souris conditionnellement invalidées pour HDAC3, les auteurs observent une diminution de la prolifération et de la neurogenèse, mais le nombre de progéniteurs Sox2⁺ n'est pas affecté (Jiang and Hsieh, 2014). Dans le mésencéphale dorsal du poisson zèbre, l'invalidation de Stmn4 induit un rallongement de la phase G2 (1H30 à 2H) et diminue la fraction de cellules H3P⁺. Ceci s'accompagne d'une différenciation neuronale précoce et la surexpression de CDC25A, régulateur de la transition G2/M, corrige la neurogenèse prématurée dans ce contexte (Lin and Lee, 2016).

Notre équipe a montré que dans le tube neural de poulet, la perte de fonction de CDC25B rallonge la phase G2 et augmente l'auto-renouvellement des progéniteurs au dépend de la production neuronale (Peco et al. 2012). A l'inverse, dans les domaines où l'on trouve des divisions neurogéniques, la phase G2 est plus courte (Peco et al., 2012; Saade et al., 2013).

Dans le cortex en développement, le ralentissement de la transition G2/M (1H30 à 2H) dans les aRGs et les bIPs par une exposition à la morphine n'affecte pas la phase S ou le taux de

sortie du cycle cellulaire. Les auteurs n'ont cependant pas étudié les conséquences de ce rallongement sur la corticogenèse (Sargeant et al., 2008).

Si les résultats de ces études peuvent paraître contradictoires, il faut remarquer que l'analyse de différents modèles animaux et tissus neuraux rend l'établissement de liens difficile. Aucune étude n'a encore exploré le rôle de la cinétique de la phase G2 dans le cortex en développement.

Chapitre 3 : La phosphatase CDC25B est un régulateur de la transition G2/M et de la neurogenèse

La phosphatase CDC25B appartient à la famille des CDC25s, un groupe de phosphatases à double spécificité qui activent les complexes CDKs et contrôlent ainsi la progression dans le cycle cellulaire.

A. La famille des phosphatases CDC25s

Cette famille a été découverte chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, qui ne possède qu'un gène CDC25. La délétion de ce gène via un allèle thermosensible induit un arrêt du cycle en phase G2, ce qui en fait un gène essentiel pour la division cellulaire chez cette espèce (Russell and Nurse, 1986). Cette famille de gènes est retrouvée dans tous les organismes eucaryotes, excepté les plantes (**Figure 33**). Du côté des invertébrés, on les retrouve chez la drosophile (*string*, contrôlant la mitose et *twine*, contrôlant la méiose) et chez *C.elegans* (*Caenorhabditis elegans*) (*cdc25.1* à *cdc25.4*) (Boutros et al., 2007a). On retrouve trois orthologues CDC25A, CDC25B et CDC25C chez tous les vertébrés, à l'exception du sous-ordre des Néognathes (dont fait partie le poulet) qui ne possèdent pas CDC25C. Chez le xénope *Xenopus laevis* et le poisson zèbre, une quatrième phosphatase CDC25D a été identifiée (Nakajo et al., 2011; Nogare et al., 2007). Les différents membres des phosphatases CDC25s diffèrent par plusieurs aspects : leur activité et leur régulation au cours du cycle cellulaire, leur surexpression ou non dans les cancers, leur localisation cellulaire et tissulaire et leur abondance (Ferguson et al., 2005). Dans la première partie de ce chapitre, nous aborderons ces différents aspects dans les systèmes cellulaires puis dans les modèles animaux. Je discuterai ensuite des connaissances concernant le rôle de CDC25B dans le développement du système nerveux.

A.1 Régulation et fonction des CDC25s au cœur de la cellule

CDC25A, CDC25B et CDC25C ont une masse moléculaire allant de 53 à 65 kDa, et contiennent respectivement de 524, 580 et 473 acides aminés (Sur and Agrawal, 2016). Les protéines CDC25s sont composées d'un domaine catalytique C-terminal, très conservé au cours de l'évolution (**Figure 33, 35**). Dans la partie N-terminale se trouve le domaine régulateur, plus divergent et plus sujet aux événements d'épissage alternatif, qui génère au moins deux variants pour CDC25A, et cinq variants pour CDC25B et CDC25C. Le domaine régulateur contient plusieurs sites de phosphorylation impliqués dans la régulation de l'activité enzymatique et la stabilité de la protéine. Cette partie contient aussi des peptides signaux, les séquences NLS et NES, qui contrôlent la localisation intracellulaire des CDC25s (Boutros et al., 2007a).

Les phosphatases CDC25s régulent positivement les transitions du cycle cellulaire en activant les complexes Cyclines-CDK via la suppression de phosphorésidus inhibiteurs sur des sites Threonine et Tyrosine. Il n'existe pas de spécificité moléculaire d'une CDC25 pour une CDK particulière, et potentiellement les trois gènes peuvent réguler les transitions G1/S et G2/M (Boutros et al., 2006). L'expression des CDC25s est cependant régulée de manière cycle

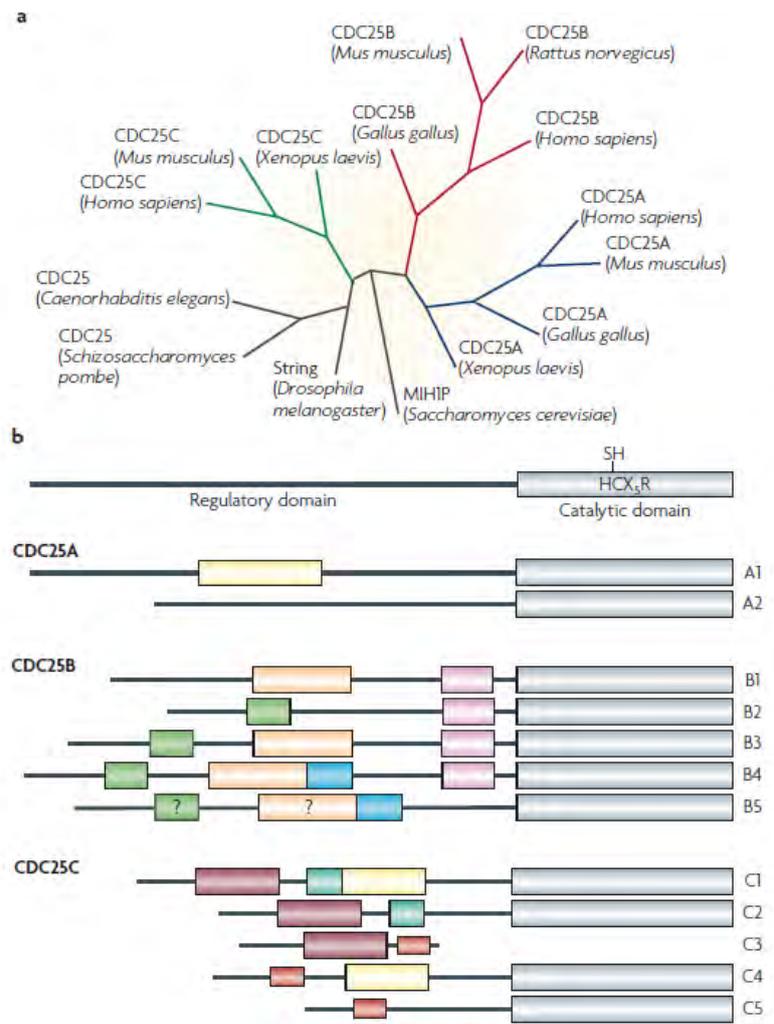


Figure 33: (a) Arbre phylogénétique des orthologues des phosphatases CDC25s. (b) Structure protéique des CDC25s et variants d'épissage. (Boutros et al., 2007a)

cellulaire dépendante, ce qui va déterminer avec quels complexes Cycline-CDK elles vont préférentiellement interagir. CDC25A est principalement exprimée en G1 et reste stable jusqu'en mitose. Le transcrit CDC25B commence à être détecté en début de phase S, pique en G2 et diminue de manière abrupte en début de G1 (Agius et al., 2014; Kakizuka et al., 1992; Körner et al., 2001). CDC25C est exprimée tout au long du cycle mais plus fortement en phase G2/M (Wickramasinghe et al., 1995). Ainsi au cours de la transition G2/M, CDC25B initie l'activation du complexe CyclineB-CDK1 au centrosome qui est ensuite complètement activé au noyau par CDC25C. CDC25A active principalement les complexes CyclineE-CDK2 et CyclineA-CDK2 pendant la transition G1/S, mais contribue également à l'activation complète de CyclineB-CDK1 durant la transition G2/M (Boutros et al., 2007a).

L'activité des CDC25s est très régulée au cours du cycle cellulaire par différents mécanismes, incluant des phosphorylations activatrices ou inhibitrices qui modulent leur localisation intracellulaire et leur interaction avec d'autres protéines. Le domaine N-terminal peut être régulé par les complexes Cycline-CDK eux-mêmes. Par exemple, CDC25B est phosphorylée et activée par Aurora A au centrosome, et initie l'activation du complexe CyclineB-CDK1. CDC25B

et C sont ensuite activées au noyau par la phosphorylation de CyclineB-CDK1 au sein d'une boucle d'auto amplification irréversible qui entraîne l'entrée en mitose de la cellule. La kinase PLK1 phosphoryle les résidus sérine dans la séquence NES de CDC25C, promouvant son import au noyau et amplifiant ainsi l'activation de CyclineB-CDK1. A l'inverse, la phosphorylation de CDC25C par CHK1 et CTAK1 génère un site de liaison pour les protéines de la famille 14-3-3, ce qui mène à la séquestration de CDC25C dans le cytoplasme et inhibe l'entrée en mitose.

La phosphorylation peut aussi réguler la stabilité des protéines CDC25s. CDC25A est dégradée par le protéasome via l'ubiquitination médiée en fin de mitose par APC/C, et en phase S et G2 par SKP1-CUL1-Fbox (SCF^{BTRCP}). Cette dégradation nécessite la phosphorylation d'un groupe de sérine par CHK1 et/ou CHK2. Durant la mitose, le complexe CyclineB-CDK1 phosphoryle CDC25A sur les groupes Sérine17 et 115, ce qui l'empêche son ubiquitination et sa dégradation (Boutros et al., 2007a).

Les CDC25s sont également régulées par les kinases ATM/ATR suite à des dommages à l'ADN, au travers de points de contrôle qui empêchent l'accumulation de mutations, maintiennent l'intégrité du génome et préviennent le développement de tumeurs. La kinase ATM est principalement activée en réponse à une cassure double brin de l'ADN, alors que ATR est activée par des cassures simple brin, toutefois il existe des redondances et des compensations entre les deux voies. Les kinases ATM et ATR phosphorylent et activent les kinases CHK1 et CHK2, qui entraînent l'inhibition et/ou la dégradation de CDC25s. CHK1 contrôle l'arrêt en S et G2 via la dégradation de CDC25A et peut aussi augmenter l'activité de Wee1 pour renforcer l'inhibition de complexes Cycline-CDK (Boutros et al., 2007a).

La régulation de l'expression et de l'activité des phosphatases CDC25B, qui permettent de maintenir un niveau adéquat d'activité CDK, est donc déterminante pour le déroulement correct du cycle cellulaire.

A.2 CDC25s et cancers

Les CDC25s sont aussi des composants clés de voies de signalisation impliquées dans les points de contrôles activés en cas de dommage à l'ADN. Toutes les cellules d'un système sont en effet sujettes au stress, comme les radiations UV ou la production de radicaux libres d'oxygène, qui peuvent endommager l'ADN. En réponse à ces facteurs, la cellule active un point de contrôle qui arrête le cycle cellulaire, permettant de déclencher, soit la réparation de l'ADN, soit la mort cellulaire programmée. Toutefois, lorsque ces mécanismes sont défectueux, la cellule continue de se diviser et lègue un ADN endommagé à ses cellules filles, ce qui résulte en une perte de l'intégrité du génome. La dérégulation des CDC25s, composant de ces mécanismes, peut ainsi contribuer à l'instabilité génomique.

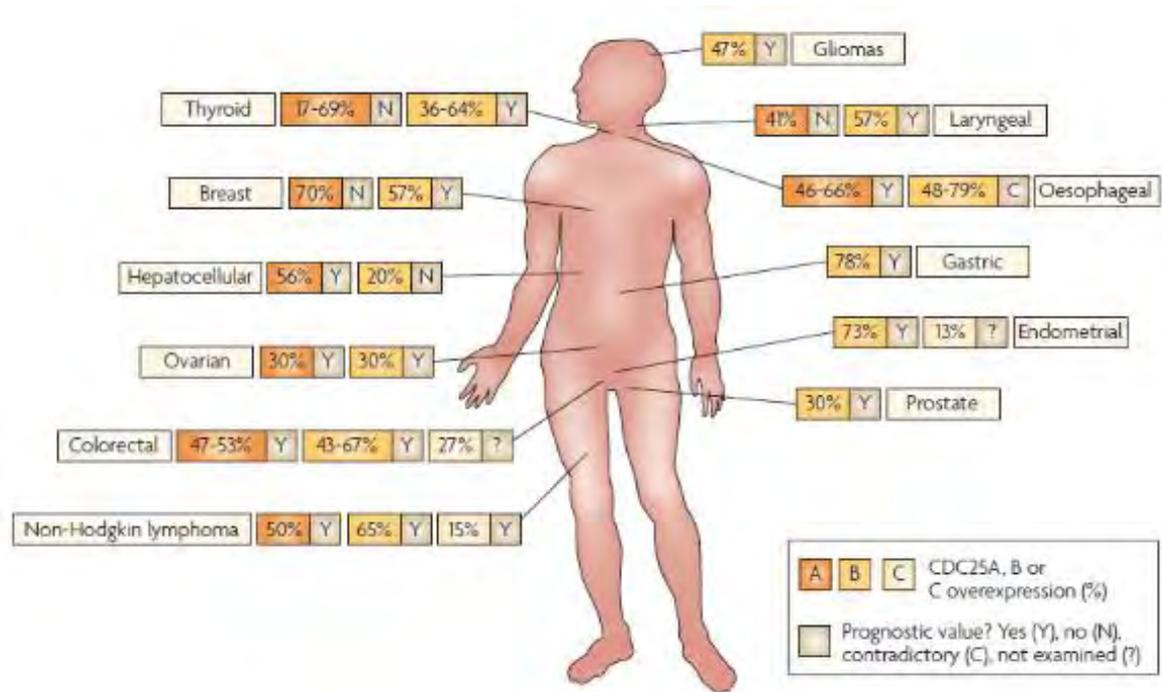


Figure 34 : Surexpression des protéines CDC25s dans les cancers chez l'Humain. (Boutros et al, 2007a)

Il n'est donc pas surprenant que les CDC25s soient impliquées dans l'apparition de tumeurs. CDC25A et B sont couramment surexprimés dans les cancers, mais rarement CDC25C (**Figure 34**). De plus la protéine CDC25B est plus souvent surexprimée dans des cancers de stade avancé et dans ce cas, la surexpression ne semble pas résulter d'une amplification génétique ou de mutations. Les CDC25s peuvent être dérégulées à tous les stades, comme la transcription, la traduction, ou au niveau post-traductionnel dans un même type de cancer. Par exemple 80% des neuroblastomes ont associés à une surexpression de l'ARN messager de CDC25B, alors que 5% sont liés à une hyperactivité de la protéine.

Au niveau transcriptionnel, CDC25A et CDC25B sont des cibles directes de MYC, un proto-oncogène. CDC25A est également une cible de la voie E2F-Rb1. Des études *in vitro* ont montré que les transcrits CDC25s sont aussi augmentés en cas d'infection virale. Au niveau post-traductionnel, la surexpression des CDC25s peut être causée par une augmentation de la demi-vie de la protéine. Par exemple, dans un mutant ATR, CDC25A est plus stable malgré la présence de radiations UV. De plus, les kinases CHKs, qui dégradent les CDC25s, sont mutées et/ou réprimées dans plusieurs cancers héréditaires dont les tumeurs cérébrales.

Des études ont cependant montré que la surexpression des CDC25s contribue au développement de cancers mais n'est pas suffisante pour les induire. *In vitro*, CDC25A et CDC25B coopèrent avec l'oncogène HRAS pour transformer des fibroblastes embryonnaires murins, alors capable de former des tumeurs *in vivo* (Galaktionov and Beach, 1991). L'expression d'un transgène CDC25B dans le tissu mammaire de souris provoque une hyperplasie alvéolaire mais n'entraîne pas l'apparition de tumeur spontanée. La surexpression de CDC25A dans une souris transgénique pour le proto-oncogène *ras* accélère la croissance

tumorale via une prolifération anormale et des aberrations chromosomiques. La surexpression des CDC25s accélère donc le développement du cancer mais les mécanismes en jeu dans ce processus restent à clarifier. On peut imaginer que la dérégulation des CDC25s, contribuent à ces cancers au travers d'une modification de l'activité des complexes Cyclines-CDK, poussant les cellules à travers les transitions du cycle d'une façon qui induit des aberrations génétiques. En effet, la surexpression de CDC25B pousse les cellules en phase S ou G2 à entrer rapidement en mitose alors que la réplication de l'ADN est incomplète. La surexpression de CDC25A induit une entrée rapide en S ou induit des mitoses. A l'inverse, l'injection d'anticorps contre CDC25B ou CDC25C, ou la transfection de mutants inactifs, cause un arrêt en G2, alors que ceux contre CDC25A causent un arrêt en G1. On peut aussi imaginer qu'une quantité anormalement élevée de CDC25s ne puisse pas être complètement dégradée par le protéasome, et active anormalement les points de contrôle, laissant les cellules progresser dans le cycle malgré des défauts. En effet, la surexpression de CDC25B résulte en une sortie prématurée du cycle cellulaire dû à un stress génotoxique (Boutros et al., 2007a). Ces données montrent bien que si les phosphatases CDC25s contribuent au développement de cancers, les mécanismes moléculaires qui provoquent des tumeurs en aval des CDC25s sont encore loin d'être bien caractérisés.

A.3 Rôle des phosphatases CDC25s au cours de l'embryogenèse et chez l'adulte

A.3.1 *Patron d'expression tissulaire des CDC25s*

En parallèle d'une expression dépendante du cycle cellulaire, des études montrent les phosphatases CDC25s sont différentiellement exprimées dans les tissus embryonnaires et adultes.

Dans l'embryon murin, le gène CDC25A n'est pas exprimé avant le stade blastocyste. Il est ensuite exprimé de manière ubiquitaire dans les ébauches de cerveau, cœur, reins, glande surrénale, foie, poumons, et estomac dès le stade E13,5 et encore au stade E16,5. Chez l'adulte, il est exprimé dans le cœur, le foie, les muscles squelettiques, les testicules et les reins, et faiblement dans le cerveau (Wickramasinghe et al., 1995).

L'ARNm de CDC25B est détecté à partir du stade 1 cellule ; son expression diminue à 2 cellules puis re-augmente au stade 4 cellules, indiquant une composante maternelle de CDC25B (Wickramasinghe et al., 1995). Au cours du développement, CDC25B est exprimé – de manière plus restreinte que CDC25A – principalement dans le foie et le système nerveux. De plus, ce patron d'expression évolue : entre E10,5 et E13,5 CDC25B est exprimé plus fortement dans le métencéphale, puis ensuite dans le mésencéphale, suivant ainsi une dynamique de formation des vésicules du SNC (Kakizuka et al., 1992). Chez le rat adulte, CDC25B est exprimé dans le cerveau, le cœur, le poumon, les testicules et ovaires, faiblement dans l'intestin et le muscle et fortement dans la rate (Wu and Wolgemuth, 1995a).

Dans la souris adulte, CDC25C est exprimé dans la rate, le thymus, l'intestin, ainsi que dans les organes génitaux. Dans les testicules, il est exprimé dans les spermatozoïdes en formation, toutefois dans l'ovaire, CDC25C n'est exprimé que dans les cellules somatiques de support des

oocytes en formation (Wu and Wolgemuth, 1995a). Dans l'équipe, nous avons vu que CDC25C est exprimé durant la neurogenèse dans le tube neural ainsi que dans le cortex en développement (non montré). Il reste à préciser dans quels autres tissus le CDC25C s'exprime.

A.3.2 Les modèles murins mutants pour les CDC25s

Dans le but de comprendre le rôle des CDC25s dans le développement embryonnaire et chez l'adulte, plusieurs modèles de perte de fonction par knock-out ont été réalisés chez la souris.

Les souris CDC25C^{-/-} sont viables, et ne présentent pas d'anormalités apparentes au niveau de leur croissance (Chen et al., 2001). L'examen histologique des reins, du cœur, des poumons, de la rate, du foie, du thymus, des testicules et des ovaires n'a pas révélé de malformation. Malgré l'expression élevée de CDC25C dans les organes reproducteurs, sa perte de fonction n'affecte pas la fertilité des mâles et des femelles. Pour déterminer si cette absence de phénotype peut être dû à une compensation par CDC25A et CDC25B, les auteurs ont comparé le taux d'ARNm de ces deux gènes dans les testicules d'animaux sauvages et CDC25C^{-/-}. Ils n'observent cependant pas de surexpression de ces gènes dans les souris mutantes. Les auteurs ont également analysé les paramètres du cycle dans ces mutants : le statut de phosphorylation de CDK1, l'entrée en mitose, et la réponse cellulaire à un dommage à l'ADN ne sont pas perturbés dans des fibroblastes embryonnaires murins CDC25C^{-/-}, ce qui suggère une redondance fonctionnelle des phosphatases entre elles.

La perte de fonction de CDC25B n'affecte pas non plus la viabilité des souris mutantes. Les femelle CDC25B^{-/-} sont cependant stériles (Lincoln et al., 2002). Lors de l'ovogénèse, il y a deux points d'arrêt du cycle cellulaire : en prophase de la méiose I et en métaphase de la méiose II. La reprise du cycle nécessite l'activation du complexe Cycline B CDK1, appelé MPF (Maturation Promoting Factor). CDC25C s'exprime dans les spermatozoïdes et les cellules de support des ovocytes, mais seule CDC25B est exprimé dans les ovocytes (Wu and Wolgemuth, 1995b). Ainsi, la perte de fonction de CDC25B bloque les ovocytes en prophase de méiose I. L'injection d'ARNm de CDC25B permet la reprise de la méiose dans les ovocytes en culture. Les auteurs observent une surexpression de 30% de CDC25A dans des fibroblastes embryonnaires murins CDC25B^{-/-} (Lincoln et al., 2002).

L'absence de phénotype majeur en perte de fonction de CDC25B ou CDC25C soulève ainsi la possibilité d'une redondance fonctionnelle entre les deux phosphatases ou avec CDC25A. Pour vérifier ce point, une lignée murine double knock-out CDC25B^{-/-} CDC25C^{-/-} (BCKO) a été créé (Ferguson et al., 2005). Ces souris sont obtenues selon des ratios mendéliens attendus, montrant que la double perte de fonction n'entraîne pas d'anomalie majeure du cycle cellulaire et du développement. Alors que l'utilisation d'anticorps α -CDC25B ou α -CDC25C arrête des cellules MEFs en culture en phase G2 (Ferguson et al., 2005), des cellules MEF isolées de souris BCKO présentent des paramètres de cycle normaux et répondent normalement aux dommages à l'ADN aux points de contrôles en G1, S et G2 (Lee et al., 2009). Les auteurs notent que les souris BCKO ont un poids inférieur aux sauvages (environ -6 à -10%), et que les souris seulement BKO ont déjà un poids inférieur de -8% à -14%. Les auteurs

n'observent pas de modification dans l'expression des ARNm ou du niveau de la protéine CDC25A (Ferguson et al., 2005).

La phosphatase CDC25A quant à elle, semble être essentielle au développement. En effet sa perte de fonction est létale au stade embryonnaire suite à un défaut de post-implantation (avant E7,5). A ce stade, les embryons présentent de fortes anomalies morphologiques et meurent suite à une augmentation de l'apoptose. Pour étudier la fonction de CDC25A dans les différents organes, les auteurs ont invalidé le gène par knockout inducible spécifiquement dans tous les tissus adultes, et ont montré que ces souris sont viables (Lee et al., 2009). Si cette délétion de CDC25A dans les tissus adultes est réalisée dans une lignée BCKO (souris TKO), cette combinaison est létale après une semaine d'induction. Les souris TKO présentent une perte de poids et une régression sévère des villosités intestinales suite à une réduction de la prolifération des cellules souches intestinales contenues dans les cryptes. Ces cellules sont caractérisées par un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et/ou G2. Les auteurs notent aussi une différenciation trop précoce des cellules souches et que la voie Wnt – nécessaire au maintien de l'auto-renouveaulement – est suractivée dans les souris TKO.

Les cellules souches intestinales sont les plus prolifératives chez l'adulte, suivies par celles de la peau et du sang. Il est donc possible que la perte de fonction de CDC25A dans les tissus environnant l'intestin grêle contribue au phénotype observé dans les souris TKO. Pour vérifier ce point, les auteurs ont induit la perte de fonction de CDC25A spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales (souris vAKO) dans différents contextes (BKO, CKO, BCKO). Les souris vA-BKO et vA-BCKO ne sont pas viables une semaine après induction et présentent les mêmes défauts de prolifération intestinale que ceux observés dans les souris TKO. Les souris vAKO ou vA-CKO ne sont pas affectées. Ces résultats montrent que CDC25C n'est pas nécessaire à l'homéostasie intestinale, et que dans le contexte de la prolifération intestinale, CDC25A et CDC25B peuvent compenser mutuellement leur perte de fonction (Lee et al., 2011).

Pour conclure, ces différentes études montrent que seule CDC25A est essentielle pour le développement embryonnaire précoce, mais que chez l'adulte et notamment dans l'intestin, CDC25A et CDC25B sont complémentaires dans le maintien de la balance prolifération / différenciation. Le groupe de Helen Piwnicka-Worms démontre ainsi la forte redondance fonctionnelle des CDC25s, d'où la nécessité d'utiliser des modèles de perte de fonction conditionnelle pour raffiner au maximum l'étude de la fonction d'une des phosphatases. Ainsi, même si CDC25B et CDC25C ne sont pas essentielles pour la viabilité d'un organisme, on ne peut pas exclure qu'elles aient un rôle plus fin dans la mise en place optimale du système.

B. Rôle de CDC25B dans le développement du système nerveux

Notre équipe étudie le rôle de la phosphatase CDC25B dans le développement du système nerveux. Dans une première partie, je décrirai plus en détail la régulation et la fonction cellulaire de cette protéine. Dans les deux dernières parties, j'aborderai la fonction de CDC25B dans la neurogenèse spinale dans le modèle poulet, puis dans le modèle murin.

B.1 La phosphatase CDC25B

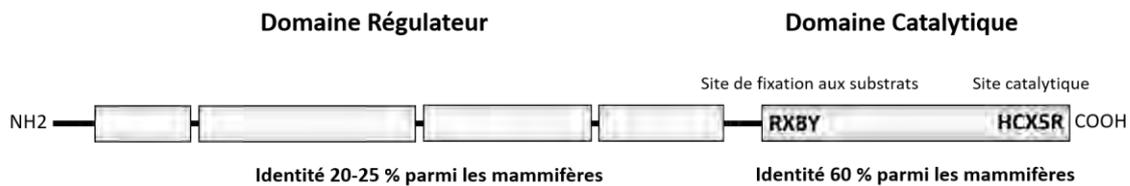
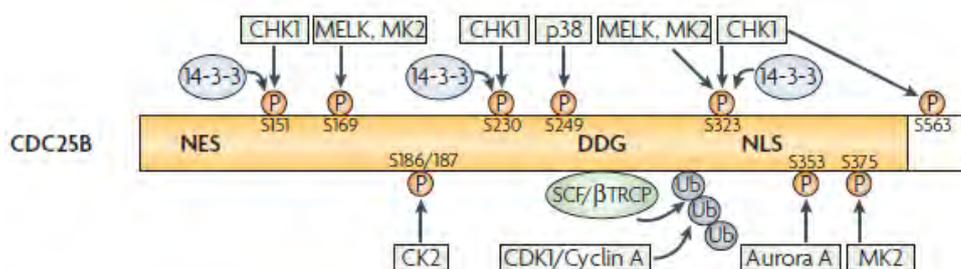


Figure 35: Schéma de la protéine CDC25B. le domaine catalytique C-terminal contient les sites de fixation aux substrats et le site catalytique. Adapté de Agius et al, 2015

Dans la cellule, CDC25B peut être localisée au noyau, dans le cytoplasme, ou au niveau du centrosome (**Figure 36**). CDC25B est localement phosphorylée et pré-activée dans le noyau en phase G1. CDC25B quitte le noyau en phase G2 et est activée au niveau du centrosome, par phosphorylation de Aurora A sur Ser353, où elle initie l'activation du complexe CyclineB-CDK1. La localisation cytoplasmique de CDC25B dépend de la séquence d'exportation nucléaire NES, dont la mutation cause une perte partielle de l'activité mitotique de CDC25B. Au centrosome, CDC25B peut aussi être régulée négativement par la phosphorylation de CHK1 sur Ser230 et 563. CHK1 cause également la phosphorylation inhibitrice de CDK1 sur Tyr15. CDC25B a une durée de demi-vie courte, elle est dégradée au protéasome via l'ubiquitination par la voie SCF^{βTRCP} au cours de la transition métaphase-anaphase. En condition de stress cellulaire, les protéines JNK (c-Jun N-terminal kinases) et p38 phosphorylent CDC25B sur Ser101, ce qui induit une dégradation rapide de la phosphatase et l'arrêt du cycle. MEK1, acteur de la voie MAPK5, phosphoryle CDC25B sur Ser249, la déstabilise, et mène à sa dégradation via le protéasome. La liaison à la protéine 14-3-3 régule la localisation et l'activité de CDC25B. Cette protéine se lie sur trois sites Ser151, 230 et 323, mais ce dernier est celui pour lequel la protéine 14-3-3 a le plus d'affinité. Cette interaction diminue l'accès au substrat CDK1 et diminue donc l'activité du complexe. Durant la mitose, le site Ser321 est phosphorylé par CDK1, ce qui empêche la liaison du site Ser323 à la protéine 14-3-3 et active complètement CDC25B. La kinase PKA phosphoryle CDC25B sur Ser321 dans les ovocytes murins, ce qui séquestre et inhibe CDC25B par 14-3-3. Enfin, la phosphatase CDC14A inhibe l'activité catalytique de CDC25B en le déphosphorylant au niveau des sites de liaison avec CDK1 (Sur and Agrawal, 2016).



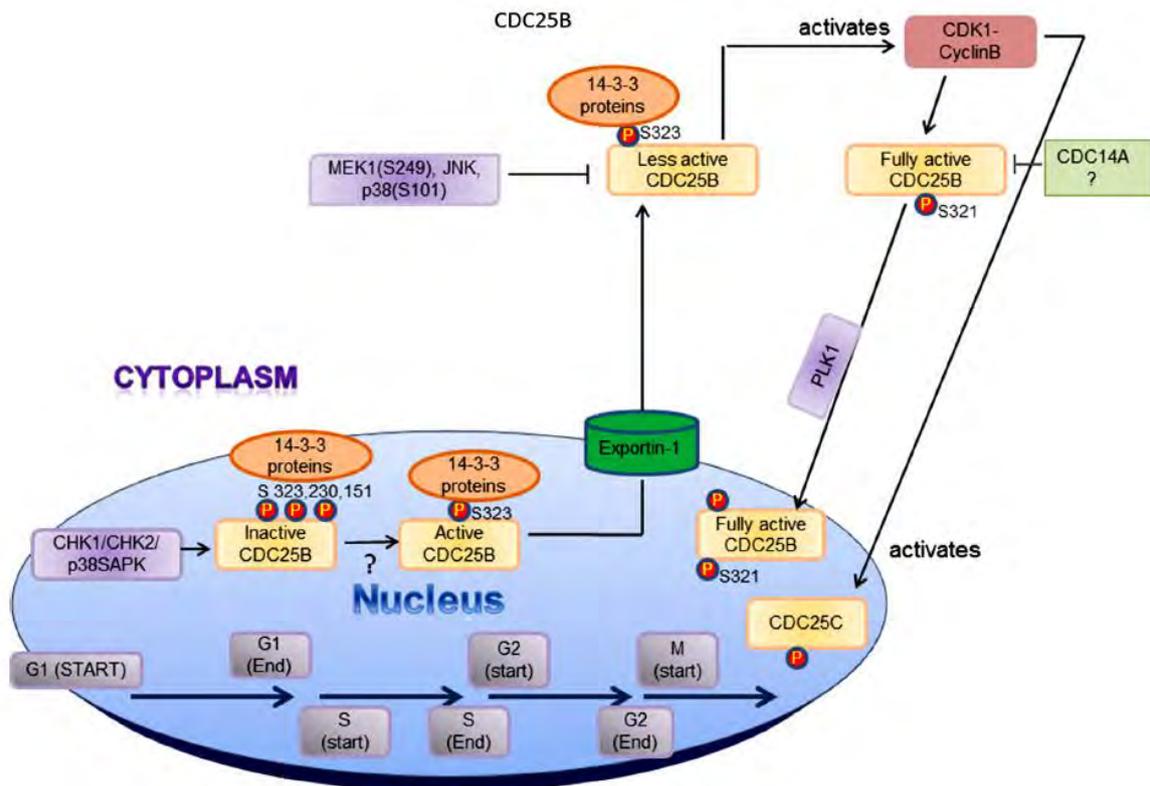


Figure 36 : Régulation de la phosphatase CDC25B au niveau de la protéine, et dans les différents compartiments de la cellule. (Boutros et al, 2007b ; Sur and Agrawal, 2016)

Plusieurs études ont montré que CDC25B est impliquée dans le cycle de maturation du centrosome. Au cours de ce processus, le centrosome se duplique en phase S, accumule du matériel péricentriolaire en phase G2 puis se divise en deux et les centrosomes néoformés migrent à chaque pôle de la cellule, ou ils permettent la nucléation des microtubules et la bonne ségrégation des chromosomes en mitose (**Figure 37**).

CDC25B est localisée au centrosome dès le début de la phase S et forcer cette localisation en culture cellulaire cause une nucléation et une structure aberrante des microtubules, ainsi qu'une accumulation anormale de γ -tubuline. La surexpression de CDC25B entraîne une surduplication des centrosomes (plus de deux centrosome par cellules) et est suffisante pour promouvoir la formation *de novo* de foyers centriolaires (Boutros et al., 2007a). Pour cela il augmente la stabilité des protéines centrine-2 et γ -tubuline, qui ont le potentiel de recruter des protéines centrosomales supplémentaires et de devenir des centrosomes fonctionnels. Cette fonction se fait via la déphosphorylation et l'activation de CDK2 durant la transition G1/S. CDK2 stabilise alors Msp1 qui en retour régule le niveau de centrin-2 au centrosome (Boutros et al., 2013). A l'inverse, l'inhibition de l'activité phosphatase de CDC25B inhibe l'assemblage des microtubules en interphase et la localisation centrosomale de γ -tubuline (Boutros et al., 2007b). Les auteurs observent également que la protéine CDC25B est répartie de manière asymétrique aux deux centrosomes, avant et après leur séparation, jusqu'à la fin de la phase G2. On la retrouve au niveau du cil primaire où réside le centrosome mère, lieu de départ de la nucléation. De même, les kinases inhibitrices CHK1 et WEE1 et le substrat CDK1

sont réparties de manière asymétrique. Cette localisation particulière de CDC25B et de ses partenaires dépend du cycle cellulaire. En G1/S, leur répartition est complètement asymétrique et on ne les détecte que sur un des centrosomes, en G2 on commence à les détecter sur l'autre centrosome et juste avant la mitose, leur répartition devient quasiment symétrique. L'inactivation de CDC25B par interférence à l'ARN inhibe la duplication du centrosome, montrant le rôle des régulateurs du cycle dans la coordination entre duplication du centrosome et cycle de division cellulaire (Boutros and Ducommun, 2008).

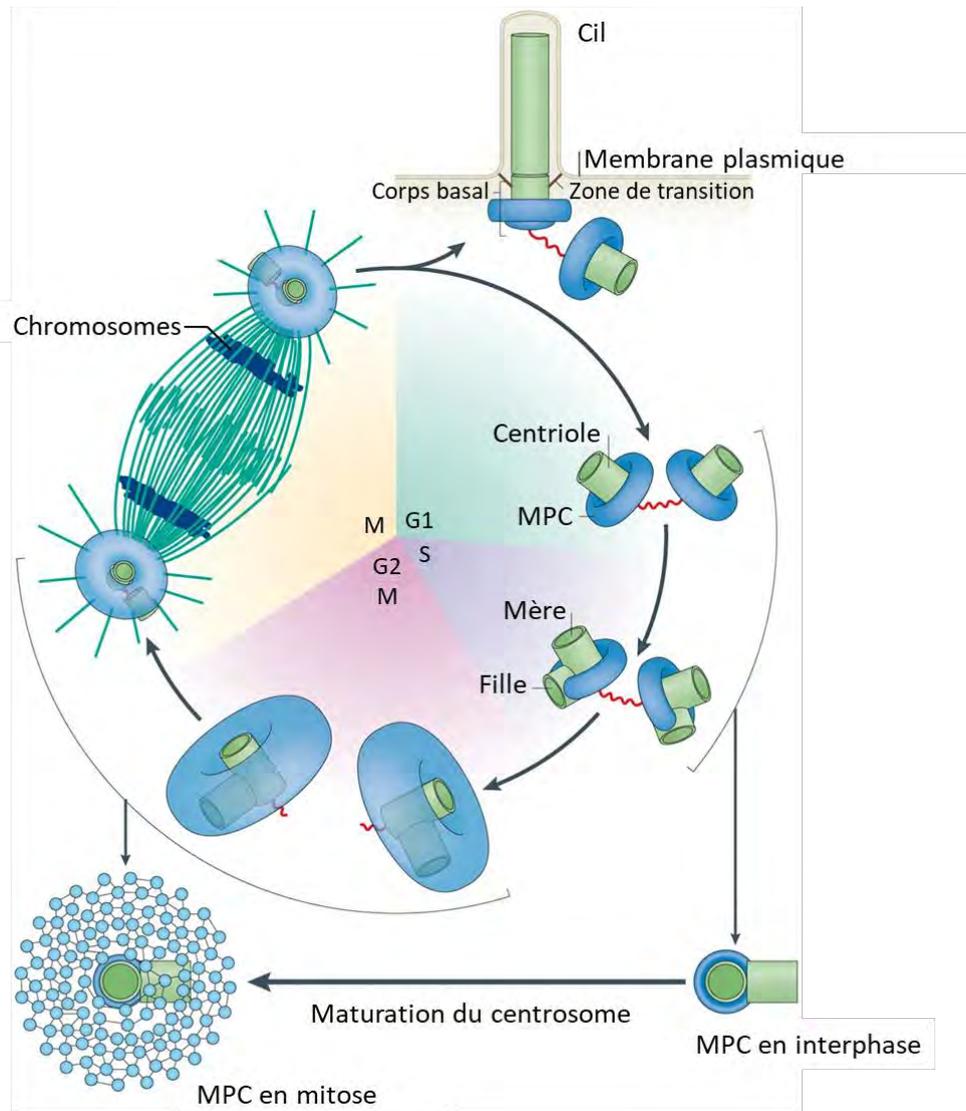


Figure 37: Comportement du centriole, du centrosome et du cil primaire pendant le cycle cellulaire. PCM : matériel péri-centriolaire. (Conduit et al., 2015)

Un acteur du centrosome, Kizuna, a été identifié comme étant un nouveau substrat de CDC25B (Thomas et al., 2014). En début de mitose, le centrosome nécessite le recrutement rapide de protéines telles que Kizuna pour stabiliser les pôles du fuseau et garantir une division correcte. Kizuna prévient la fragmentation du matériel péri-centriolaire et doit pour cela être phosphorylé par PLK1 sur le résidu Thr379. L'expression d'une forme stable de CDC25B, qui ne peut pas être dégradée par le protéasome, entraîne des défauts mitotiques importants (multiplication du fuseau mitotique, mauvais alignement des chromosomes). Dans

ce contexte, l'activité du complexe CyclineB-CDK1 n'est pas affectée et la multiplication des fuseaux n'est pas due à une amplification du centrosome mais à une fragmentation du matériel péricentriolaire, en conséquence d'une déphosphorylation anormale de Kizuna par CDC25B. Ainsi CDC25B régule d'une part l'amplification des centrosomes, via l'activation des complexes Cycline-CDK en G1/S, puis leur stabilité via la déphosphorylation de Kizuna en mitose.

B.2 La phosphatase CDC25B régule la neurogenèse spinale dans l'embryon de poulet

Dans la moelle épinière en développement des Vertébrés, la production neuronale suit une dynamique spatio-temporelle, de l'antérieur vers le postérieur et parallèlement du ventral vers le dorsal.

L'expression des régulateurs de la neurogenèse, comme le morphogène Shh, suit cette progression. De façon intéressante, l'expression de CDC25B suit également cette progression et les domaines d'activité de Shh corrént avec le niveau de transcrit de CDC25B. Des travaux réalisés dans notre équipe indiquent que CDC25B est une cible de la voie Shh dans le tube neural (Bénazéraf et al., 2006). En effet, l'expression ectopique de Shh dans l'embryon de poulet induit en 6h l'expression de CDC25B. A l'inverse, le blocage de la voie Shh par la cyclopa mine *in ovo* entraîne une diminution de l'expression de CDC25B de manière dose-dépendante après seulement 3h de traitement. La signalisation Shh est donc critique pour l'activation transcriptionnelle de CDC25B dans le tube neural.

L'analyse plus détaillée de l'expression de CDC25B dans ce tissu confirme que son expression corréle avec la dynamique spatio-temporelle de la neurogenèse tout au long de la maturation du tube neural. En effet, CDC25B, contrairement à d'autres régulateurs de la transition G2/M comme Cycline B ou CDK1, n'est pas exprimé dans tous les progéniteurs en prolifération. Son expression est initiée dans les progéniteurs dans les domaines de production neuronale. Dans l'embryon de poulet, après la fermeture du tube neural à E2,5, CDC25B est exprimé dans la région ventrale qui produit à ce moment-là des neurones moteurs, mais est absent de la région dorsale qui ne produit pas encore de neurones. Plus tard entre E4,5 et E7, lorsque les neurones dorsaux sont produits, l'expression de CDC25B progresse dans la région dorsale (**Figure 38**). Elle s'éteint au moment de la transition neuro-gliale et CDC25B n'est pas exprimé dans les progéniteurs d'oligodendrocytes. Son expression persiste dans les jeunes neurones post mitotiques puis s'éteint dans les neurones matures. Ces observations postulaient un rôle de CDC25B dans la production des neurones spinaux. Notre équipe a montré que la perte de fonction par ARNi entraîne une diminution du nombre de neurones moteurs et une augmentation des progéniteurs spinaux (Peco et al., 2012). Dans ce contexte, la phase G2 est rallongée de 40 minutes. La longueur totale du cycle et de la phase S ne sont pas affectées ce qui suggère une compensation par un raccourcissement de la phase G1. Un tel mécanisme a déjà été décrit chez la drosophile (Reis and Edgar, 2004). Cette étude montre pour la première fois qu'un régulateur positif du cycle cellulaire, la phosphatase CDC25B, promeut la différenciation dans le tube neural.

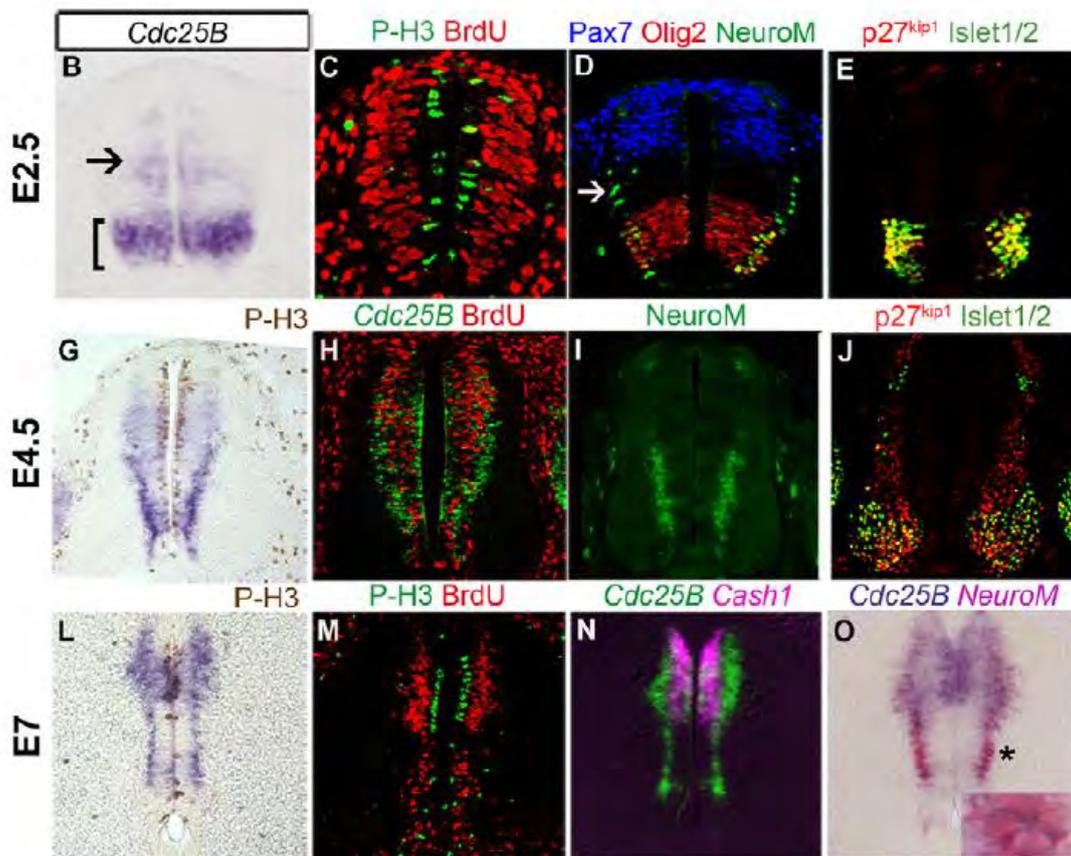


Figure 38 : L'expression de CDC25B corrèle avec les domaines neurogéniques pendant le développement de la moelle épinière de poulet. (B-E) A E2,5 CDC25B est exprimé en ventral dans les progéniteurs de motoneurones (Olig2), qui sont en train de produire des motoneurones (Islet1/2, p27^{Kip1}) mais pas dans les progéniteurs dorsaux (Pax7) qui sont en train de proliférer. (G-O) L'expression de CDC25B progresse à E4,5 et E7 dans les progéniteurs de la région dorsale (Cash1) qui produisent les interneurones (NeuroM, p27^{Kip1}) à ces stades. (Peco et al., 2012)

Dans une étude plus récente, notre équipe a montré que dans l'embryon de poulet, CDC25B régule la neurogenèse spinale en modifiant le mode de division des progéniteurs neurax (Bonnet et al., 2018a). Les progéniteurs spinaux peuvent se diviser de trois façons : par des divisions symétriques prolifératives produisant deux progéniteurs (PP); par des divisions asymétriques neurogéniques, produisant un neurone et un progéniteur (PN) ou des divisions symétriques terminales, générant deux neurones (NN). A l'aide de biomarqueurs permettant de distinguer les trois types de divisions (Le Dréau et al., 2014), et par la technique de *rainbow* (Loulrier et al., 2014), nous avons montré que le gain-de-fonction de CDC25B promeut les divisions neurogéniques au dépend des divisions prolifératives, et favorise ainsi les transitions PP > PN > NN. Toutefois, une partie de cette fonction est indépendante de la fonction cycle cellulaire de CDC25B. En effet, le gain-de-fonction d'une forme mutée de CDC25B (CDC25^{ΔCDK}) qui n'interagit plus avec son substrat CDK1 et ne régule donc plus la phase G2, est toujours capable de promouvoir la transition PP > PN. La transition PN > NN nécessite cependant la fonction cycle de CDC25B. En parallèle, le gain-de-fonction de la forme sauvage

ou mutée de CDC25B induit dans les deux cas un détachement rapide du noyau des progéniteurs de la surface du ventricule pendant la phase G1. Ces données montrent que dans le tube neural de poulet, CDC25B affecte le comportement du noyau en G1 précoce et promeut la neurogenèse par des mécanismes à la fois cycle-dépendant et indépendant (Bonnet et al., 2018b).

B.3 CDC25B pourrait être un régulateur de la neurogenèse chez les mammifères

Kakizuka et coll. ont montré que chez la souris, CDC25B est exprimé de manière restreinte au système nerveux (Kakizuka et al., 1992), ce qui suggère que sa fonction neurogénique découverte dans l'embryon de poulet est conservée chez les mammifères.

Dans le tube neural murin, l'expression de CDC25B est activée comme chez le poulet au moment où le tube neural se ferme et commence à produire des neurones. Le gène est exprimé dans tout l'axe dorso-ventral à E9. Dans des embryons *Shh*^{-/-} à E9,5, l'expression de CDC25B est retardée et son expression ventrale est diminuée comparé à son expression dans la partie dorsale du tube neural. Chez les mammifères, l'expression de CDC25B semble donc également être régulée, au moins en partie, par la voie *Shh* (Bénazéraf et al., 2006).

Plusieurs études montrent une corrélation entre modification du niveau d'expression de CDC25B et défaut de neurogenèse cérébrale, ce qui suggère que CDC25B pourrait également être impliqué dans le développement du cerveau. Le gène *FoxM1* – cible transcriptionnelle indirecte de *Shh* – est exprimé dans les précurseurs granulaires du cervelet en développement. C'est un régulateur du cycle cellulaire et notamment des transitions G1/S et G2/M. Sa perte de fonction n'affecte pas la phase S mais augmente le nombre de cellules H3P⁺ « faible », correspondant aux cellules en fin de G2. Ceci indique un délai dans la transition G2/M. L'analyse de l'expression de régulateurs du cycle dans ces mutants *FoxM1* révèle une augmentation de l'expression de Cycline B1 et de CDC25B associée à la production d'un fuseau anormal et de centrosomes multiples en mitose (Schüller et al., 2007). Une autre étude montre que la perte de fonction de *FoxM1* dans le cortex provoque une anomalie des mouvements intercinétiques nucléaires via la diminution de Cycline B1 et CDC25B. Les mouvements basaux-apicaux et apico-basaux sont fortement ralentis dans les aRGs de ces mutants. Les phases G1, S et G2 sont rallongées ce qui se traduit par un ralentissement global du cycle cellulaire. Ces défauts sont accompagnés d'une diminution du nombre d'aRGs et une augmentation de la production des bIPs par les aRGs. *FoxM1* est donc impliqué dans le maintien de la balance aRGs/bIPs. Ce déséquilibre au niveau des progéniteurs se traduit chez les individus mutants adultes par une diminution de nombre global de neurones corticaux et une diminution du comportement d'anxiété chez les adultes mutants (Wu et al., 2014). Ces modifications pourraient être liées en partie à la diminution de l'expression de CDC25B.

Le facteur de transcription *Snail* régule d'une part la survie des aRGs via un mécanisme p53-dépendant, et d'autre part la balance prolifération-différenciation via CDC25B. La perte de fonction de *Snail* augmente l'apoptose, et diminue la prolifération ainsi que le nombre d'aRGs, de bIPs et de neurones *Satb2*⁺. La perte de fonction de p53 abolit l'apoptose et corrige

partiellement le phénotype, soit la diminution du nombre d'aRGs et de neurones. La diminution du nombre de bIPs résulte d'un défaut de prolifération des aRGs, dont le cycle cellulaire est arrêté. Les auteurs ont analysé l'expression des régulateurs du cycle et observent que la surexpression de Snail entraîne une augmentation du transcrit de CDC25B. Dans un contexte sauvage, la surexpression de CDC25B à E13,5 augmente la proportion d'aRGs et de bIPs, et diminue le nombre de neurones *Satb2* trois jours plus tard. La surexpression de CDC25B corrige le défaut de prolifération induit par la perte de fonction de Snail ainsi que la diminution du nombre de bIPs suggérant qu'il pourrait être requis pour leur production (Zander et al., 2014).

Dans des souris microcéphaliques *McpH1*^{-/-}, la réduction de taille du cerveau, due à un switch précoce des divisions prolifératives vers des divisions neurogéniques, est associée à une augmentation de l'activité de CDC25B. La perte de MCPH1 diminue la localisation de CHK1 au centrosome, ce qui active précocement CDC25B et donc CDK1. Les paramètres du cycle cellulaire sont altérés avec une entrée en mitose prématurée associée à une G2 plus courte, alors que la durée de la mitose et du cycle total sont plus longues. L'entrée prématurée en mitose est découplée de la maturation du centrosome, ce qui affecte la mise en place du fuseau et l'alignement des chromosomes. Les auteurs observent une augmentation des divisions obliques, qu'ils associent à des divisions asymétriques (PN). Les progéniteurs sortent en effet prématurément du cycle et produisent des neurones trop tôt (**Figure 39**). La répression de CDC25B dans ce contexte corrige les défauts d'orientation au niveau du plan de division ainsi que la neurogenèse précoce (Gruber et al., 2011).

L'ensemble de ces données indique que CDC25B pourrait, comme dans le tube neural, contrôler la maturation des progéniteurs neuraxiaux dans le cortex en développement.

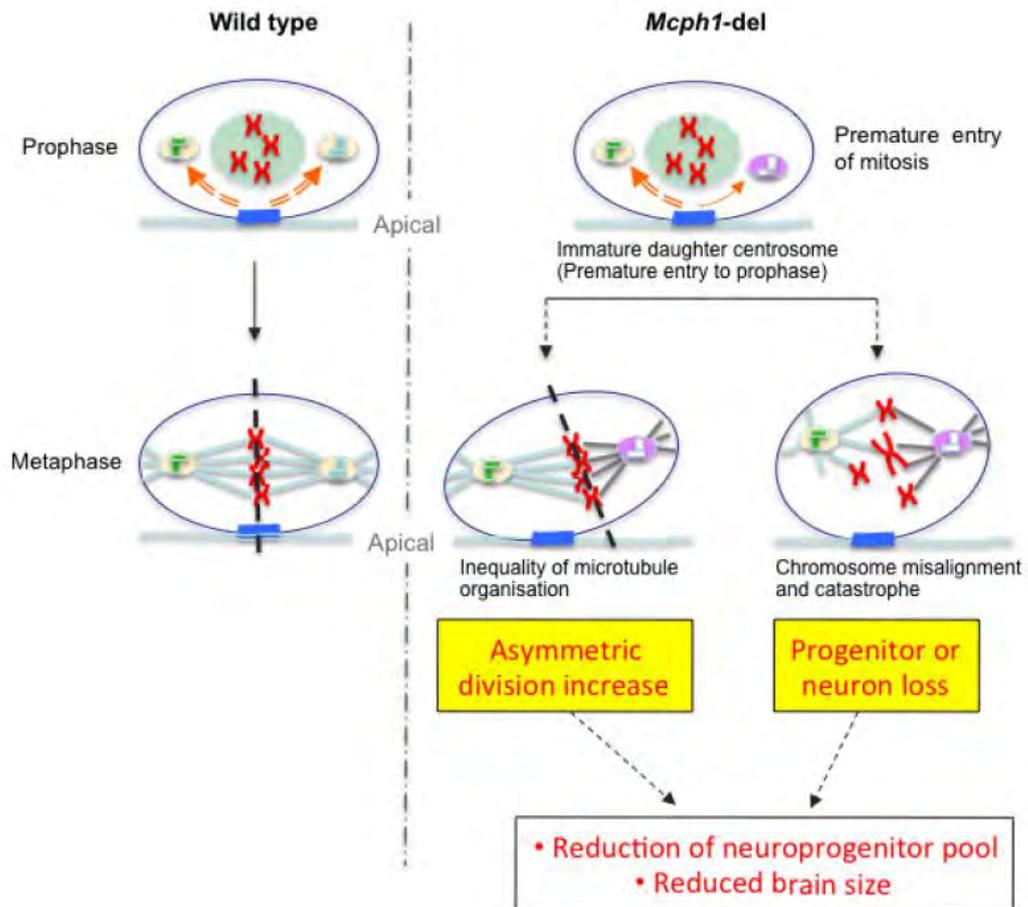


Figure 39 : Résumé graphique des conséquences de la perte de fonction de *Mcp1* sur le mode de division des progéniteurs corticaux. (Gruber et al, 2011)

Objectifs : Déterminer le rôle de CDC25B dans la neurogenèse spinale et corticale chez les mammifères

En dépit des liens existants entre des défauts neuro-développementaux et la dérégulation de CDC25B, sa fonction n'a jamais été directement étudiée au cours de la neurogenèse des mammifères. Les mammifères possèdent un cerveau plus élaboré que celui des oiseaux, avec l'émergence du cortex. Contrairement aux Néognathes, les mammifères possèdent une autre phosphatase CDC25, la phosphatase CDC25C, qui pourrait partager une partie des fonctions de CDC25B dans la neurogenèse. De plus, le rôle de la phase G2 dans ce processus n'a pas été clairement établi puisque dans les études que je viens de présenter, la modification de la longueur de phase G2 est toujours associée au changement de la longueur d'une autre phase du cycle.

Au cours de mes travaux de thèse, j'ai donc adressé directement la question de la fonction de la phosphatase CDC25B au cours de la neurogenèse en utilisant un modèle murin dans lequel l'expression de CDC25B est invalidée. En relation avec les précédents travaux de l'équipe dans le tube neural de poulet, j'ai d'abord voulu déterminer si la fonction neurogénique de CDC25B est conservée dans la moelle épinière en développement chez la souris. Dans un second temps, l'établissement de ce modèle murin m'a donné l'opportunité d'analyser en détail sa fonction dans le développement du cortex cérébral, dont la complexité apportera des informations complémentaires dans la compréhension du mécanisme d'action de CDC25B dans la neurogenèse.

Résultats

A. Partie 1 : La phosphatase CDC25B est nécessaire pour produire efficacement des neurones dans la moelle épinière en développement de souris

La majorité des résultats de cette partie ont été publiés dans ELife (Bonnet et al. 2018, Annexe 2)

A.1 L'expression de *Cdc25b* corrèle avec la dynamique de la neurogenèse spinale

L'analyse détaillée du patron d'expression de *Cdc25b* au cours de la neurogenèse spinale murine révèle que, de la même façon que dans l'embryon de poulet (Bénazéraf et al., 2006; Peco et al., 2012), l'expression de *Cdc25b* corrèle avec la dynamique de la neurogenèse. Les motoneurons en région ventrale sont produits dès le stade embryonnaire E9 jusqu'à E10. L'expression de *Cdc25b* débute à E9 dans le tube neural, puis à partir de E10,5 se restreint à la partie dorsale (**Fig.40**), où sont produits les interneurons et les neurones sensoriels lors de deux vagues, entre E10-E12,5 (dIL^1-6) et E11-E13 (dIL^A et dIL^B). A partir du switch neuro-glial à E13, *Cdc25b* n'est plus exprimé dans les progéniteurs spinaux.

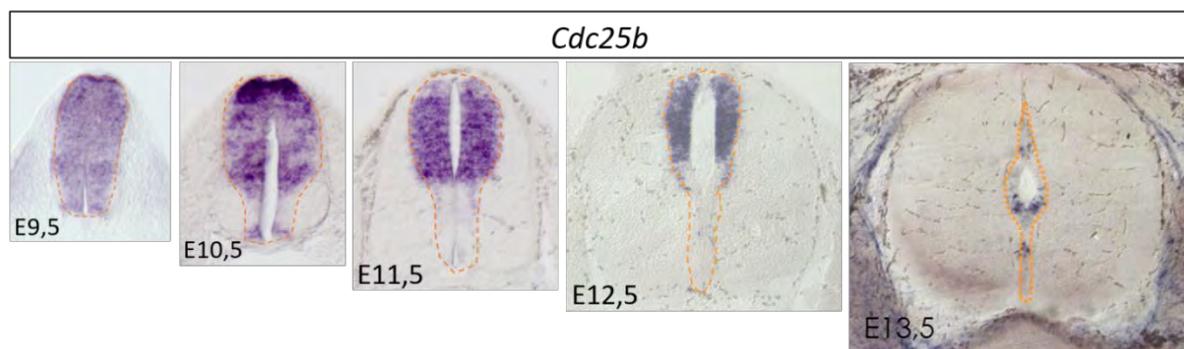


Figure 40: Progression spatio-temporelle du patron d'expression de *Cdc25b* dans le tube neural de souris. La zone ventriculaire, qui contient les progéniteurs neuronaux, est entourée en pointillés orange.

Afin d'invalider spécifiquement *Cdc25b* dans le tube neural murin, notre équipe a fait construire une lignée *Cdc25b^{fl/fl}*, dont les exons 4 à 7 du gène sont encadrés de sites *LoxP* (cf Matériels et Méthodes). Cette lignée est croisée avec une lignée *Nestin-Cre*, qui exprime la *Cre* recombinase sous le contrôle des éléments régulateurs de *Nestin*, gène qui s'exprime dans tous les progéniteurs du système nerveux central. La recombinaison engendrée par l'expression de la *Cre* recombinase génère un ARNm tronqué que l'on ne détecte pas en hybridation *in situ*. De plus, la protéine *CDC25B* n'est plus retrouvée par immuno-détection sur western blot dans les embryons mutants (voir Annexe 1).

A.2 Choix de la fenêtre temporelle d'analyse

Avant de pouvoir analyser l'effet de la perte de fonction conditionnelle de *Cdc25b* dans les embryons mutants *Cdc25b^{nesKO}*, il a été nécessaire de déterminer quelle fenêtre temporelle est la plus pertinente pour pouvoir observer un phénotype.

Sous le contrôle des éléments régulateurs de Nestin, la Cre recombinase commence à être exprimée dans les progéniteurs neuraux vers le stade E8,5 (**Fig.41D**). Nous avons regardé à partir de E9.5 si l'expression de *Cdc25b* est modifiée dans le tube neural, sur des coupes transversales d'embryons mutants (**Fig. 41C « *Cdc25b*^{nesKO} »**). A E9,5, *Cdc25b* est encore exprimé mais plus faiblement que chez les contrôles, et aux stades E10,5 et E11,5, l'ARNm *Cdc25b* n'est plus du tout détecté (**Fig.41C**). Dans l'embryon de poulet, la perte de fonction de CDC25B par ARNi commence à affecter la neurogenèse 24h après injection (au stade E3), et le phénotype est fortement accentué après 48h (au stade E4) (Peco et al., 2012). Le phénotype est donc cumulatif, et nécessite que CDC25B soit invalidée depuis au moins 24h pour être significatif. Dès E10,5 dans l'embryon murin, l'expression de *Cdc25b* est restreinte à la région dorsale du tube neural (**Fig.41C « CTL »**), lieu de production des interneurons dorsaux. Ces neurones sont produits de E10 à E13,5, en deux vagues successives (**Fig.41F**). En considérant ces différents aspects, nous avons choisi de réaliser nos analyses dans la partie dorsale du tube neural à partir du stade E11, soit environ 24h après perte de fonction de *Cdc25b*, stade auquel un bon nombre de neurones dorsaux ont été produits en contexte sauvage.

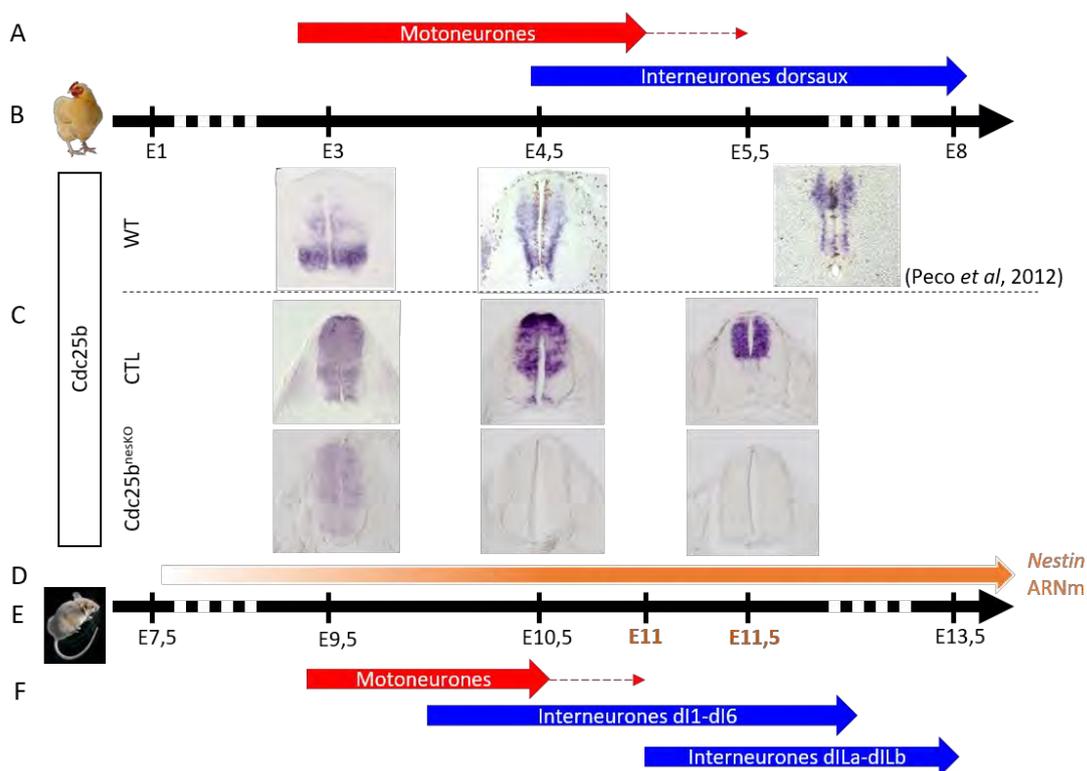


Figure 41: Résumé graphique illustrant le choix des stades embryonnaires d'analyse. (A,F) Fenêtres temporelles de production des motoneurones ventraux et des interneurons dorsaux dans l'embryon de poulet (A) et dans l'embryon de souris (F). **(B, E)** Correspondance développementale des stades embryonnaires entre le poulet (B) et la souris (E). **(C)** Hybridation in situ de *Cdc25b* dans le tube neural d'embryon de poulet « WT » (Peco et al, 2012) et dans le tube neural d'embryon de souris « CTL » et « *Cdc25b*^{nesKO} ». **(D)** Fenêtre temporelle d'expression du gène Nestin dans les progéniteurs neuraux.

A.3 La perte de fonction de Cdc25b augmente la durée de la phase G2 sans affecter le taux de prolifération des progéniteurs spinaux

Pour valider ce modèle génétique, nous avons tout d’abord analysé la longueur de la phase G2 à E11 en utilisant une méthode appelé le paradigme du pourcentage des mitoses marquées (PLM, cf Matériels et Méthodes) (Quastler and Sherman, 1959). Les embryons sont collectés 1, 2, ou 3h après injection de d’EdU et le pourcentage de cellules positives H3P⁺ et EdU⁺ parmi le total de cellules H3P⁺ est quantifié en fonction des temps croissant d’exposition à l’EdU (**Fig.42A-D**). Comme la progression de ce pourcentage est proportionnelle à la durée de la phase G2, on peut extraire des courbes une durée moyenne de la G2 (T_{G2}) (cf Matériels et méthodes).

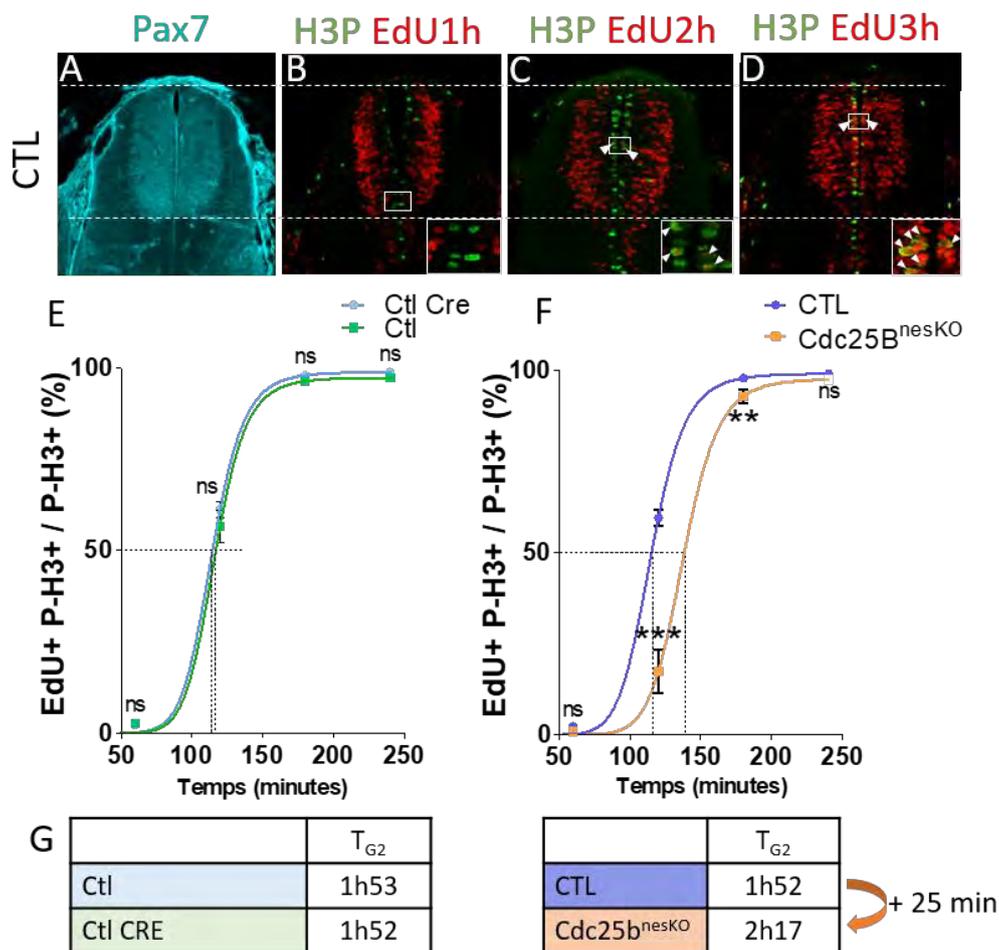


Figure 42: La perte de fonction conditionnelle de Cdc25b augmente la durée de la phase G2 dans le tube neural. (A-D) Coupes transversales de tube neural d’embryon de souris Cdc25b^{CTL} au stade E11. Immunodétection des progéniteurs dorsaux Pax7⁺ (A), des cellules en phase S EdU⁺ et des cellules en mitose H3P⁺, après 1h (B), 2h (C) et 3h (D) d’injection d’EdU. Quelques cellules EdU⁺H3P⁺ sont indiquées par les têtes de flèches. (E,F) Pourcentage du nombre de cellules H3P⁺EdU⁺ par rapport au nombre total de cellules H3P⁺ en fonction du temps d’injection d’EdU. (E) Comparaison de la longueur de la phase G2 entre les embryons « Ctl et Ctl Cre ». t-test Mann Whitney. (F) Comparaison de la longueur de la phase G2 entre l’ensemble des embryons Cdc25b^{CTL} et les embryons Cdc25b^{nesKO}. t-test Mann Whitney. (G) Durée moyenne de la phase G2 T_{G2} par condition. Nombre d’embryons analysés :

$N(\text{Cdc25b} \ll \text{Ctl} \gg) = 7 \text{ à } 17$, $N(\text{Cdc25b} \ll \text{Ctl Cre} \gg) = 2 \text{ à } 10$, $N(\text{Cdc25b}^{\text{CTL}}) = 9 \text{ à } 24$, $N(\text{Cdc25b}^{\text{nesKO}}) = 4 \text{ à } 7$.

Dans un premier temps, nous avons vérifié que la présence de la Cre recombinase n'affecte pas à elle seule le phénotype analysé. Nous avons comparé le phénotype entre les embryons « Ctl » ne possédant pas la Cre ($\text{Cdc25b}^{\text{fl/-}}$ et $\text{Cdc25b}^{\text{fl/+}}$) et les embryons « Ctl Cre » ($\text{Cdc25b}^{\text{fl/fl}}$; *Nestin-Cre*) (cf Matériels et Méthodes V.I). Comme le montre la **Fig.42E**, nous n'observons pas de différences significatives entre les deux types de contrôles : les courbes sont similaires et la durée moyenne de la phase G2 est de 1h53 pour les « Ctl » et de 1h52 pour les « Ctl Cre ». La Cre recombinase n'a donc pas d'effet sur la longueur de la phase G2. Nous avons donc utilisé l'ensemble des embryons de ces trois génotypes comme condition contrôle « CTL », pour les comparer aux embryons mutants $\text{Cdc25b}^{\text{nesKO}}$ ($\text{Cdc25b}^{\text{fl/-}}$; *Nestin-Cre*) (**Fig.42F**).

Pour la condition CTL, après 1, 2 et 3h d'injection d'EdU, le pourcentage de cellules $\text{EdU}^+\text{H3P}^+$ est respectivement de 2,41%, 61,03% et 97,23% (**Fig.42F**). La durée moyenne de la phase G2 (T_{G2}) est de 1h52 dans les progéniteurs contrôles (**Fig.42F**). Pour la condition mutante $\text{Cdc25b}^{\text{nesKO}}$, après 1h, 0,94% des cellules sont $\text{EdU}^+\text{H3P}^+$. Après 2h, seulement 22,46% des cellules sont $\text{EdU}^+\text{H3P}^+$ et après 3h, 92,68% des cellules sont $\text{EdU}^+\text{H3P}^+$ (**Fig.42F**). Les progéniteurs dorsaux en phase S dans les embryons mutants mettent donc plus de temps à atteindre la mitose, puisque en effet la durée T_{G2} dans la condition $\text{Cdc25b}^{\text{nesKO}}$ est de 2h17, ce qui correspond à une augmentation de 25 minutes (**Fig.42F**). Dans notre modèle murin, la perte de fonction conditionnelle de Cdc25b induit donc un rallongement de la phase G2.

Nous avons ensuite vérifié si ce rallongement affecte la capacité des progéniteurs à proliférer. Le taux de prolifération peut être estimé par deux paramètres : la fraction de cellules en phase S (nombre de cellules EdU^+ parmi une population de progéniteurs Pax7^+) et l'index mitotique (nombre de cellules en mitose H3P^+ parmi une population de progéniteurs Pax7^+) (**Fig.43A-B**) (cf Matériel et Méthodes). Nous avons comparé les embryons « Ctl » aux « Ctl Cre » mais n'avons pas observé de différences, la moyenne étant respectivement de 41,91% et 39,91% de cellules $\text{Pax7}^+\text{EdU}^+$ entre les deux conditions (**Fig.43C**). Les embryons mutants ont une moyenne légèrement inférieure (35,81%), mais la différence par rapport aux CTL n'est pas significative (**Fig.43D**).

Les **Fig.43E-F** représentent la répartition des embryons par condition et par portée pour l'index mitotique. Les valeurs des embryons « Ctl » et « Ctl Cre » sont très homogènes, avec une moyenne respective de 3,10% et 3,12% (**Fig.43E**). Les embryons mutants ont une moyenne inférieure (2,20%) mais qui n'est pas non plus significativement différente par rapport aux CTL ($p = 0.0559$) (**Fig.43F**). Le pourcentage de cellules en phase S et de cellules en mitose n'est donc pas significativement modifié dans les mutants $\text{Cdc25b}^{\text{nesKO}}$.

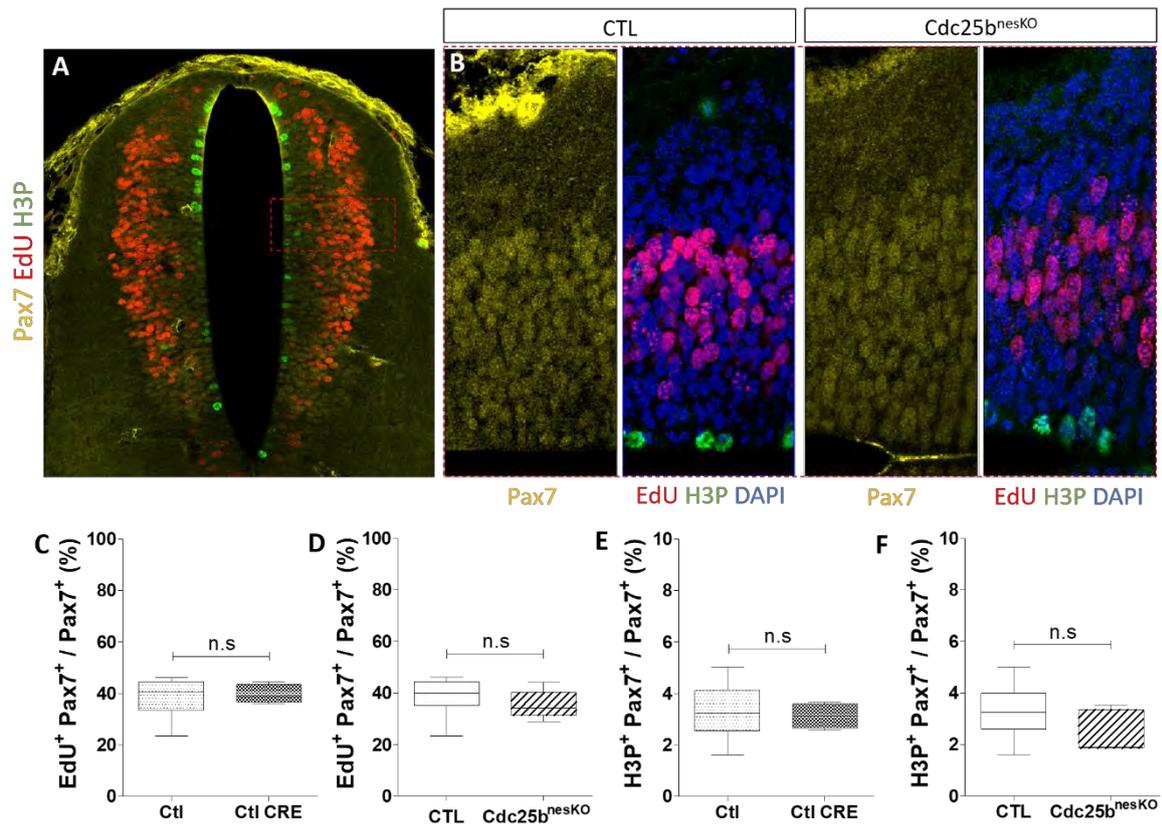


Figure 43: La perte de fonction de Cdc25b n’affecte pas le taux de prolifération. (A-B) Coupes transversales de tube neural d’embryon CTL et Cdc25b^{nesKO} au stade E11. Immunodétection des progéniteurs dorsaux Pax7⁺, des cellules en mitose H3P⁺, des cellules en phases S EdU⁺ après 1h d’injection d’EdU et des noyaux DAPI⁺. Les cellules sont quantifiées dans la zone encadrée en pointillés rouges. (C-D) Analyse de la fraction de cellules en phase S EdU⁺ parmi la population proliférante Pax7⁺. Digramme en boîte comparant la fraction de cellules en phase S EdU⁺Pax7⁺/Pax7⁺, entre les embryons Ctl vs Ctl Cre (C) et CTL vs Cdc25b^{nesKO} (D). Statistiques par modèle mixte. (E-F) Diagramme en boîte comparant l’index mitotique, soit la fraction de cellules H3P⁺Pax7⁺/Pax7⁺, entre les embryons Ctl vs Ctl Cre (E) et CTL vs Cdc25b^{nesKO} (F). Statistiques par modèle mixte.

Dans l’embryon de souris, la perte de fonction conditionnelle de Cdc25b rallonge donc la phase G2 sans affecter le taux de prolifération des progéniteurs spinaux, comme ce qui avait été observé chez l’embryon de poulet (Peco et al., 2012). Notre modèle génétique de perte de fonction de Cdc25b est donc validé et nous pouvons l’utiliser pour analyser les paramètres de la neurogenèse.

A.4 La perte de fonction de Cdc25b diminue le nombre d’interneurones dorsaux

Nous avons ensuite analysé l’effet de la perte de fonction de Cdc25b sur l’équilibre progéniteurs – neurones. Pour cela nous avons quantifié la quantité de neurones dorsaux GABAergiques Pax2⁺ (dI4-6, dIL^A) et glutamatergiques Tlx3⁺ aux stades E11,5 et E12,5 (Fig.44). Nous avons ainsi quantifié les neurones dorsaux lors des deux vagues de production et ce, 24h et 48h après invalidation de Cdc25b. Ici encore, nous avons d’abord vérifié que la présence de la Cre recombinase n’affecte pas la neurogenèse, puis nous avons comparé l’ensemble des embryons contrôles aux embryons mutants. Dès le stade E11,5 le nombre de neurones Tlx3⁺

est diminué de manière significative de 13,3% dans les embryons mutants. Les neurones Pax2⁺ sont aussi également réduits mais pas de manière significative. On observe 24h plus tard une diminution claire et significative des deux types neuronaux Pax2⁺ et Tlx3⁺ de respectivement 25,7% et 28% (**Fig.44**).

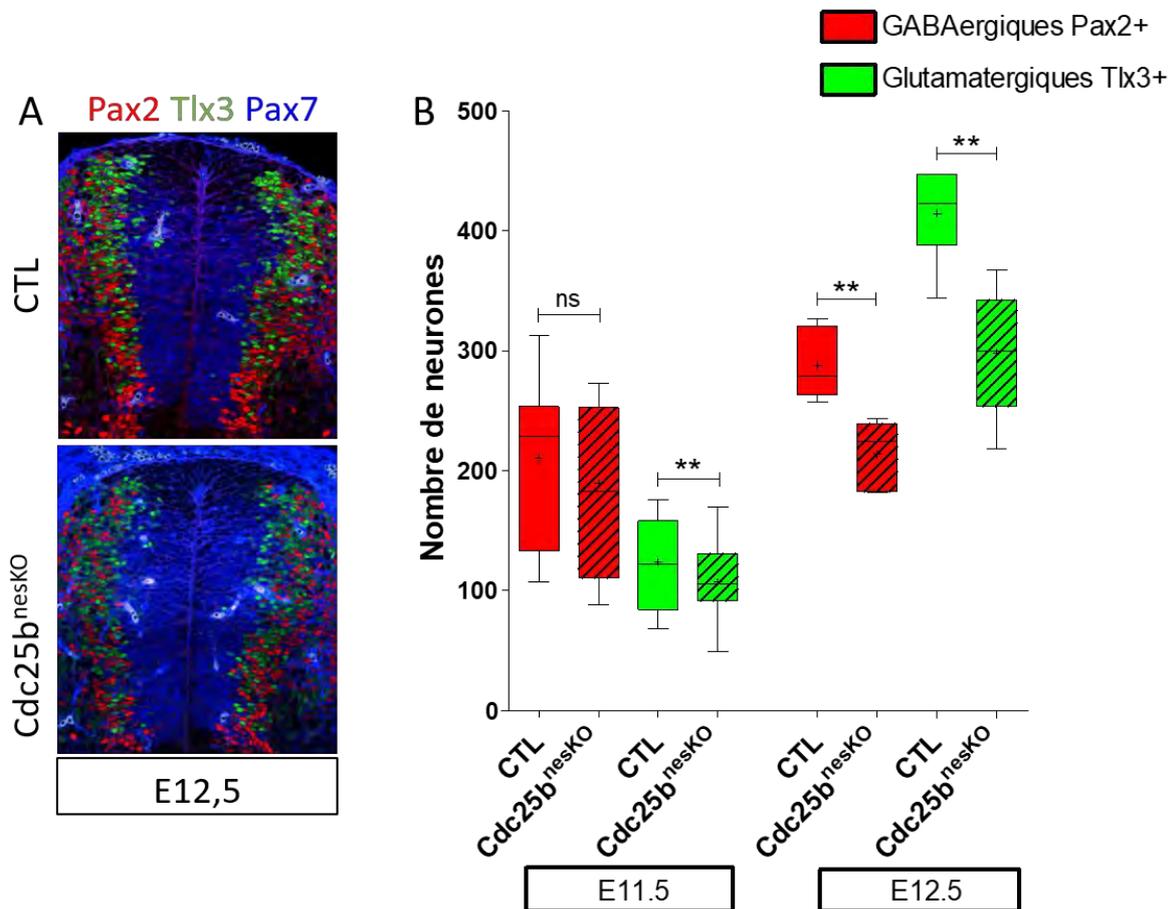


Figure 44: La perte de fonction conditionnelle de Cdc25b réduit le nombre d’interneurones dorsaux Pax2⁺ et Tlx3⁺. (A) Coupes transversales de tube neural d’embryon de souris au stade E12,5. Immunodétection des progéniteurs dorsaux Pax7⁺, des interneurones dorsaux Pax2⁺ et Tlx3⁺ (B) Digramme en boîte représentant la répartition des embryons pour le marquage Pax2 et Tlx3, par condition et par stade. Statistiques par modèle mixte. Nombre d’embryons analysés à E11,5 : 15 CTL vs 10 Cdc25b^{nesKO} ; à E12,5 : 6 CTL vs 5 Cdc25b^{nesKO}.

La quantification des cellules positives pour la Caspase 3 activée montre que cette diminution n’est pas due à une augmentation de l’apoptose (**Fig.45**). De plus, le ratio de neurones dIL^A GABAergiques et glutamatergiques dIL^B est similaire entre les embryons contrôles (ratio = 0,68) et mutant (ratio = 0,71) confirmant que Cdc25b n’impacte pas la spécification d’un sous-type particulier mais a plutôt un effet générique sur la production neuronale.

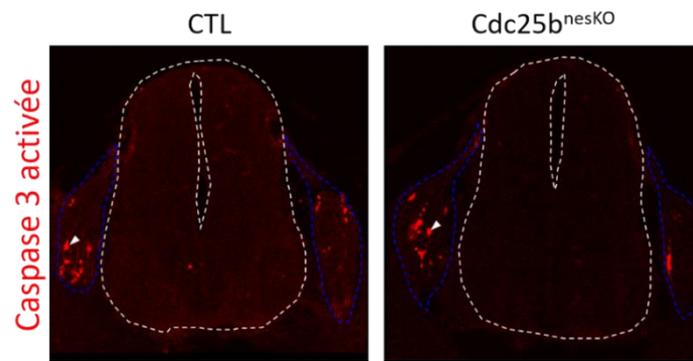


Figure 45: La perte de fonction conditionnelle de CDC25B n’induit pas d’apoptose dans le tube neural. Coupes transversales de tube neural à E11.5. Immunodétection des cellules en apoptose Caspase 3⁺ activée. Le tube neural est délimité par les pointillés blancs. Les ganglions spinaux sont délimités par les pointillés bleus. Les têtes de flèches indiquent des cellules en apoptose.

Dans l’embryon de poulet, CDC25B promeut la neurogenèse en modifiant le mode de division des progéniteurs neuraux. Les progéniteurs spinaux peuvent se diviser selon trois modes : des divisions prolifératives (PP), qui génèrent deux progéniteurs, des divisions neurogéniques asymétriques (PN), qui produisent un progéniteur et un neurone et des divisions neurogéniques symétriques (NN) qui génèrent deux neurones. Dans le tube neural de poulet, CDC25B augmente les divisions neurogéniques PN et NN au dépend des divisions prolifératives PP. Pour déterminer si la diminution des neurones dorsaux observée dans les embryons *Cdc25b^{nesKO}* est due au même mécanisme, nous avons utilisé la lignée *Tis21-GFP*, dans laquelle la GFP est exprimée dans les progéniteurs qui expriment le gène *Tis21* (cf Matériel et Méthodes). Ce gène s’exprime durant la phase G1 des progéniteurs qui réalisent des divisions neurogéniques PN et NN. Nous avons croisé cette lignée avec notre lignée *Cdc25b^{nesKO}* et avons quantifié la proportion de progéniteurs Pax7⁺ GFP⁺ à E12,5. Nous n’avons pas observé de différences significatives entre les embryons CTL et *Cdc25b^{nesKO}* (Fig.46). La perte de fonction de *Cdc25b* dans le tube neural murin n’affecte donc pas la transition entre les divisions PP vers PN ou NN.

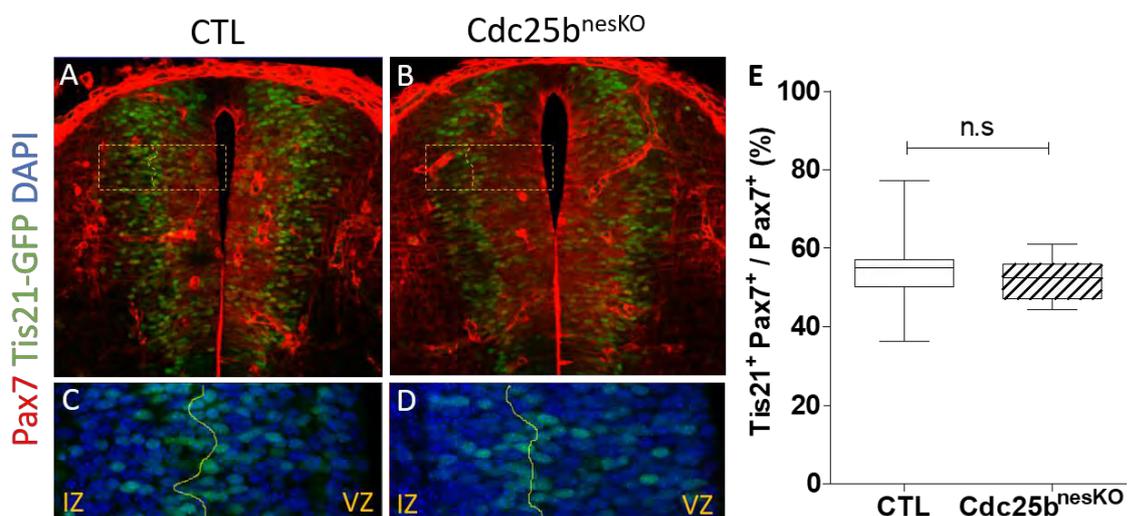


Figure 46: La proportion de progéniteurs Tis21⁺ n'est pas modifiée dans les embryons Cdc25b^{nesKO}. (A-D) Coupes transversales de tube neural d'embryons Tis21-GFP CTL (A,C) et Cdc25b^{nesKO} (B,D) à E12,5. Immunodétection des progéniteurs dorsaux Pax7⁺ et des noyaux avec du DAPI. La proportion de progéniteurs dorsaux neurogéniques Tis21⁺ est déterminée par la quantification des noyaux GFP⁺ Pax7⁺ parmi le total de progéniteurs Pax7⁺ (C,D) dans la zone ventriculaire délimitée en pointillés jaunes (C,D). (E) Diagramme en boîte comparant le pourcentage de progéniteurs Pax7⁺ GFP⁺ dans 21 embryons contrôles et 12 embryons Cdc25b^{nesKO}. Statistiques par modèle mixte. VZ : zone ventriculaire, IZ : zone intermédiaire.

Dans le tube neural de poulet, la répression de CDC25B mène à une augmentation du stock de progéniteurs ventraux. Pour estimer la quantité de progéniteurs dorsaux chez la souris, nous avons mesuré l'aire de la surface occupée par les progéniteurs dorsaux aux deux stades en utilisant les marqueurs Pax7⁺ à E11,5 ou Sox2⁺ à E12,5 (**Fig.47A-B,D-E**). Nous n'avons pas observé de différences significatives entre les contrôles et les mutants à aucun des deux stades (**Fig.47G,I**). Nous avons également analysé la densité nucléaire des progéniteurs en utilisant le DAPI comme marqueur des noyaux (**Fig.47C,F**), et identifié une faible et constante diminution de 7,5% à E11,5 et 7,3% à E12,5 (**Fig.47H,J**). La réduction du nombre de neurones pourrait donc être due en partie à cette faible réduction de la population de progéniteurs.

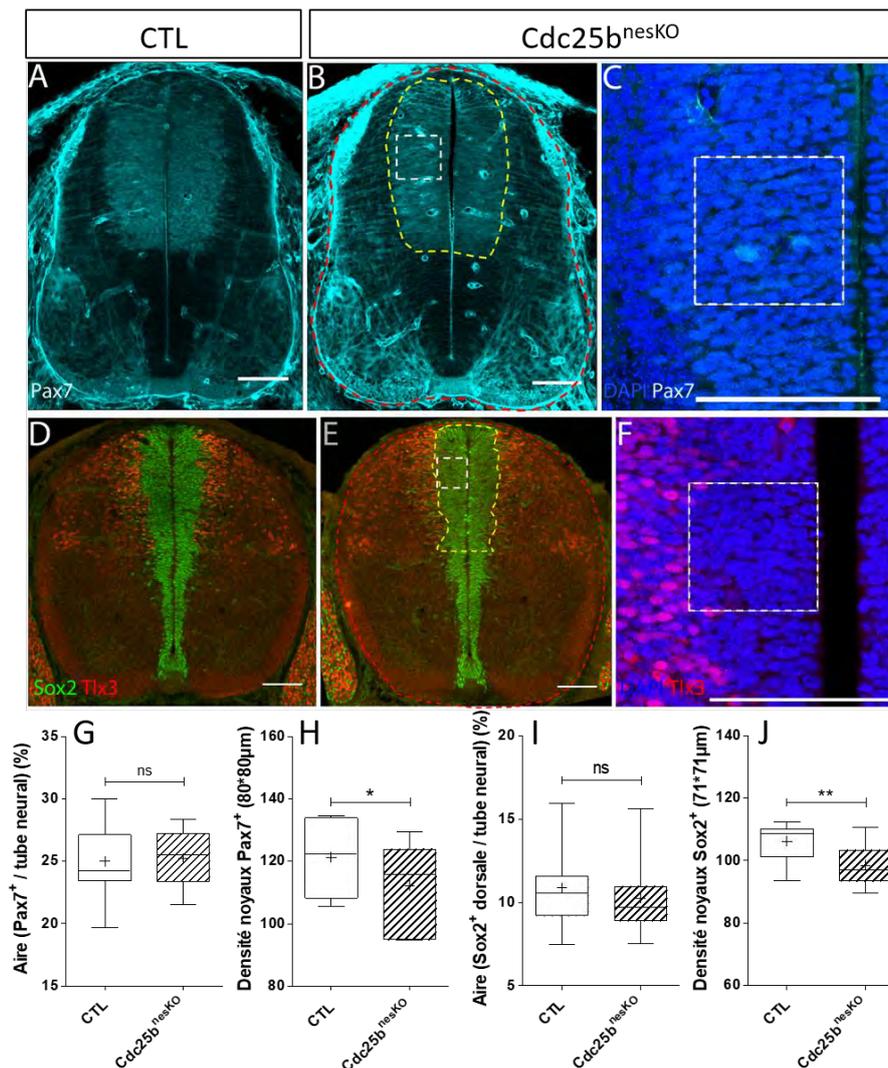


Figure 47: La perte de fonction conditionnelle de Cdc25b modifie la densité des progéniteurs dorsaux. (A-C) Coupes transversales du tube neural d'embryons CTL (A) et Cdc25b^{nesKO} (B-C) à E11.5. La taille de la zone de progéniteurs est déterminée par le pourcentage de l'aire occupée par les progéniteurs Pax7⁺ (B, pointillés jaunes) par rapport à l'aire du tube neural (B, pointillés rouges). Le nombre de noyau est quantifié à l'aide du marquage DAPI (C) dans un carré mesurant 80x80 µm (B-C, pointillés blancs). (D-F) Coupes transversales du tube neural d'embryons CTL (D) et Cdc25b^{nesKO} (E-F) à E12.5. La taille de la zone de progéniteurs est déterminée par le pourcentage de l'aire occupée par les progéniteurs dorsaux Sox2⁺ dans la région dorsale produisant les neurones Tlx3⁺ (E, pointillés jaunes) par rapport à l'aire du tube neural (E, pointillés rouges). Le nombre de noyau est quantifié à l'aide du marquage DAPI (F) dans un carré mesurant 71x71 µm (E-F, pointillés blancs). (G-J) Diagrammes en boîte comparant à E11,5 l'aire des progéniteurs dans 19 embryons contrôles et 13 Cdc25b^{nesKO} (G), la densité nucléaire dans 8 embryons contrôle et 6 Cdc25b^{nesKO} (H) ; à E12.5, l'aire des progéniteurs dans 15 embryons contrôles et 9 Cdc25b^{nesKO} (I), et la densité nucléaire dans 12 embryons contrôles et 8 Cdc25b^{nesKO} (J). Statistiques par modèle mixte. La croix indique la valeur moyenne. Les échelles représentent 100 µm.

Pour résumer cette première partie, la perte de fonction de Cdc25b dans le tube neural murin rallonge la phase G2 sans affecter le taux de prolifération des progéniteurs, et diminue la production des neurones dorsaux. Comme dans l'embryon de poulet, Cdc25b régule donc la neurogenèse spinale et promeut la production neuronale. Toutefois chez la souris, le mécanisme moléculaire mis en jeu dans cette fonction semble différent de celui mis en jeu dans l'embryon de poulet. Il sera intéressant d'explorer ce qui diffère entre ces deux espèces.

B. Partie 2 : La phosphatase CDC25B est nécessaire pour produire efficacement des progéniteurs basaux dans le cortex cérébral (Roussat et al. En préparation)

B.1 Cdc25b est exprimé dans les progéniteurs aRGs Pax6+

Pour déterminer le patron de *Cdc25b* dans le cortex, nous avons réalisé des hybridations *in situ* de *Cdc25b* sur des coupes frontales de cerveau à différents stades clés de la corticogenèse. *Cdc25b* commence à être exprimé dès le stade E10,5 dans le neuroépithélium. A E11,5 on peut voir que le gène est exprimé dans le télencéphale dorsal et ventral, et plus particulièrement dans la zone ventriculaire selon un gradient suivant la transition NECs -> aRGs. En effet le gène est plus exprimé en région latérale, où les progéniteurs sont en train de produire des neurones par divisions asymétriques, et moins fortement en région médiale, où les cellules neuroépithéliales sont encore en prolifération. Ce gradient est toujours visible à E14,5, mais à E16,5, le transcrit *Cdc25b* est exprimé de manière homogène dans la zone ventriculaire le long de l'axe médio-latéral (**Fig.48A**).

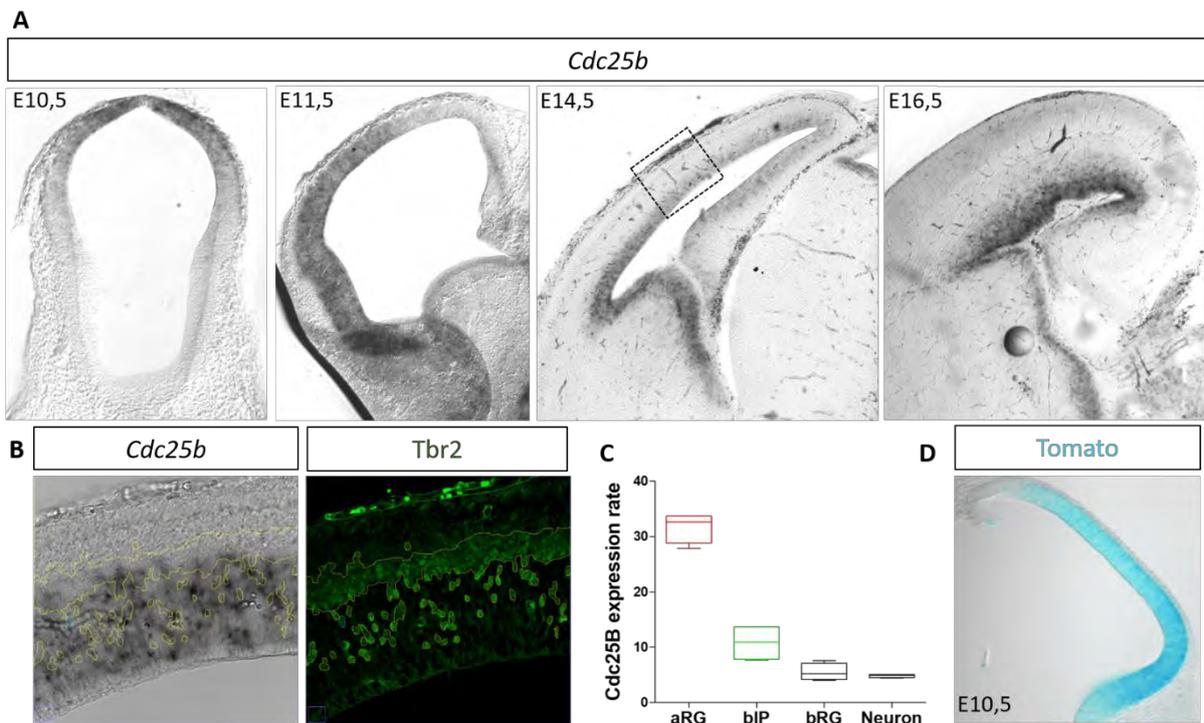


Figure 48: Cdc25b est spécifiquement exprimé dans les cellules Pax6⁺ aRGs. (A) Hybridation *in situ* de *Cdc25b* sur des coupes frontales d'embryons à 10,5 – 11,5 – 14,5 et 16,5 jours embryonnaires (E). **(B)** Zoom sur la zone encadrée à E14,5 : co-marquage de l'expression de *Cdc25b* par hybridation *in situ* et de *Tbr2* par immunofluorescence. **(C)** Quantification de l'expression de *Cdc25b* dans les aRGs, bIPs, bRGs et les neurones corticaux, à partir de données de RNA-Seq (Florio et, 2015). **(D)** Coupe frontale de cortex à E10,5 après croisement de la lignée *Cdc25b^{nesKO}* avec une lignée *Rosa-Tomato*.

La zone ventriculaire contient des progéniteurs apicaux aRGs, mais aussi des progéniteurs basaux bIPs qui émergent des divisions des aRGs à partir de E12,5 et qui migrent ensuite à travers la VZ pour aller s'accumuler dans la zone sous-ventriculaire. Pour déterminer si *Cdc25b* est exprimé à la fois dans les aRGs et les bIPs, nous avons utilisé l'expression de *Tbr2* comme

marqueur des bIPs, en combinaison avec la détection de l'ARNm de *Cdc25b* à E14,5. Cette analyse révèle que *Cdc25b* ne semble pas co-exprimé avec *Tbr2* dans la VZ et qu'il n'est plus détecté dans la SVZ, délimitée par l'immunomarquage *Tbr2*⁺ (**Fig.48B**). De plus, l'analyse de données RNA-Seq provenant de (Florio et al., 2015) appuie le fait que *Cdc25b* est fortement exprimé dans les aRGs en comparaison avec les progéniteurs basaux bIPs et bRGs, et s'éteint complètement dans les neurones (**Fig.48C**). *Cdc25b* est donc fortement exprimé dans les aRGs puis est progressivement réprimé dans les progéniteurs basaux.

Etant donné son expression dans les aRGs, *Cdc25b* pourrait réguler leur prolifération et/ou leur différenciation en progéniteurs basaux ou en neurones. Pour explorer ces hypothèses, nous avons invalidé *Cdc25b* de manière conditionnelle à l'aide de la lignée *Nestin-Cre*, qui exprime la Cre dans tous les progéniteurs du système nerveux central et que nous avons déjà utilisée pour l'analyse de la moelle épinière. Pour déterminer à partir de quel stade le gène *Cdc25b* est invalidé, nous avons croisé la lignée *Nestin-Cre* avec une lignée *Rosa-Tomato*, dans laquelle le rapporteur fluorescent Tomato est placé en 3' d'une cassette Stop flanquée de deux sites flox. La fluorescence révèle le moment et le domaine d'activité de la Cre recombinase (*cf* Matériel et Méthodes). Comme le montre la **Figure 48D**, on commence à voir l'expression de Tomato dans le cortex dès le stade E10,5. Nous avons donc analysé les paramètres de la corticogenèse à partir de E13,5, soit au moins 48h après invalidation de *Cdc25b*, en utilisant des coupes frontales de cerveau au niveau du lobe frontal et du futur cortex moteur. Comme pour la moelle épinière, nous avons comparé les embryons mutants à l'ensemble des embryons contrôles (y compris ceux possédant la Cre recombinase) pour chaque analyse après avoir vérifié que la présence de la Cre recombinase n'affecte pas significativement le phénotype observé (non montré).

B.2 La perte de fonction de *Cdc25b* augmente fortement la durée de la phase G2 sans affecter la durée totale du cycle cellulaire des aRGs

Nous avons d'abord analysé les paramètres du cycle cellulaire dans les aRGs des embryons *Cdc25b*^{nesKO} à E14,5– soit un stade intermédiaire de la corticogenèse. Comme dans la moelle épinière, nous avons commencé par mesurer la longueur de la phase G2 par la méthode du PLM (*cf* Matériel et Méthodes). Les embryons sont collectés 2, 3, 4, 5 ou 6h après injection d'EdU et le pourcentage de cellules positives H3P⁺ EdU⁺ parmi le total de cellules H3P⁺ est quantifié en fonction des temps croissants d'exposition à l'EdU (**Fig.49A**). Ce pourcentage est constamment inférieur dans les aRGs des embryons *Cdc25b*^{nesKO}. La perte de fonction de *Cdc25b* dans les aRGs augmente dramatiquement leur T_{G2}, qui est de 2h dans les embryons contrôles et de 3h40 dans la condition *Cdc25b*^{nesKO} (**Fig.49B**). Nous avons également mesuré la durée de la phase G2 en début (**E12,5, Fig.49C**) et en fin (**E16,5, Fig.49D**) de corticogenèse, dans des embryons contrôles et mutants. Comme décrit dans la littérature (Kicheva et al., 2014), nous voyons que la durée de la phase G2 dans les aRGs CTL augmente au cours du temps (1h48 – 2h et 2h28 respectivement à E12,5 – E14,5 et E16,5). Le rallongement de T_{G2} dans les mutants *Cdc25b*^{nesKO} est déjà détectable au stade E12,5 (1h42 dans les CTL vs 2h05 dans les mutants) et s'accroît jusqu'à au moins E16,5 (2h28 dans les CTL vs 4h41 dans les

mutants) (**Fig.49C,D, E**). De plus, nous observons un fort délai de la migration apicale des noyaux des progéniteurs marqués avec l'EdU. (**Fig.49A**), ce qui corrèle avec des données montrant qu'une partie de la fonction de CDK1 (cible de Cdc25b) est de réguler le mouvement apical au cours de l'INM (Baffet et al., 2015).

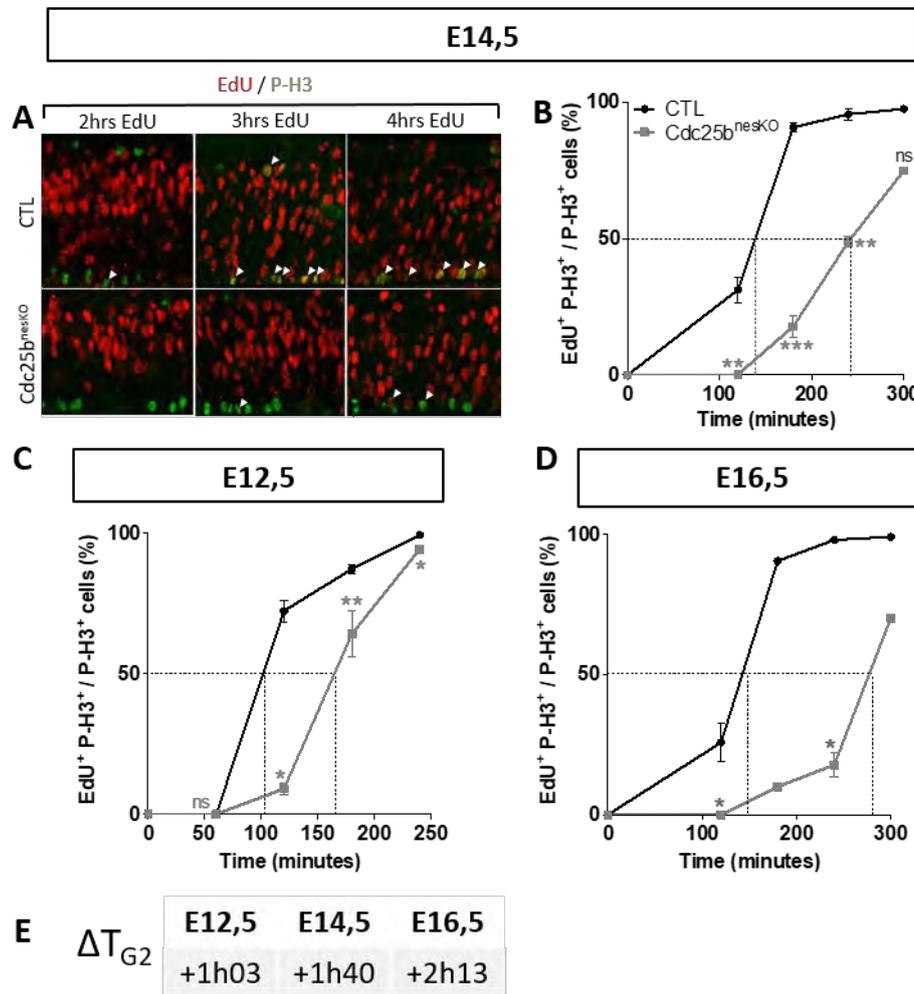


Figure 49: Mesure de la durée de la phase G2 au cours de la corticogenèse dans les aRGs d'embryons CTL et Cdc25b^{nesKO}. (A) Marquage H3P 2, 3 et 4 heures après injection d'EdU dans des embryons CTL et Cdc25b^{nesKO}. Les cellules co-marquées EdU⁺P-H3⁺ sont indiquées par les têtes de flèches. (B-D) Quantification de la proportion de progéniteurs apicaux aRGs EdU⁺P-H3⁺/P-H3⁺ à E12,5 (C) – E14,5 (B) et E16,5 (D). T_{G2} correspond à la durée à laquelle 50% des cellules P-H3⁺ sont EdU⁺ (indiqué par les lignes en pointillés). t-test Mann-Whitney. Nombre d'embryons analysés par points à E12,5 (CTL : 3 à 6 vs Cdc25^{nesKO} : 2 à 5) – E14,5 (CTL : 3 à 10 vs Cdc25^{nesKO} : 3 à 8) et E16,5 (CTL : 3 à 5 vs Cdc25^{nesKO} : 1 à 4).

Nous avons ensuite déterminé si ce ralentissement de la G2 dans les aRGs affecte leur taux de prolifération et/ou la durée totale du cycle cellulaire. Pour évaluer le taux de prolifération des aRGs, nous avons collecté les embryons 1h après injection d'EdU et quantifié les cellules EdU⁺ parmi les aRGs (correspondant aux cellules Tbr2- dans la VZ, **Fig.50A**). Ce pourcentage reflète la proportion d'aRGs en phase S, et nous n'avons pas observé de différences entre les embryons contrôles et Cdc25b^{nesKO} (**Fig.50B**).

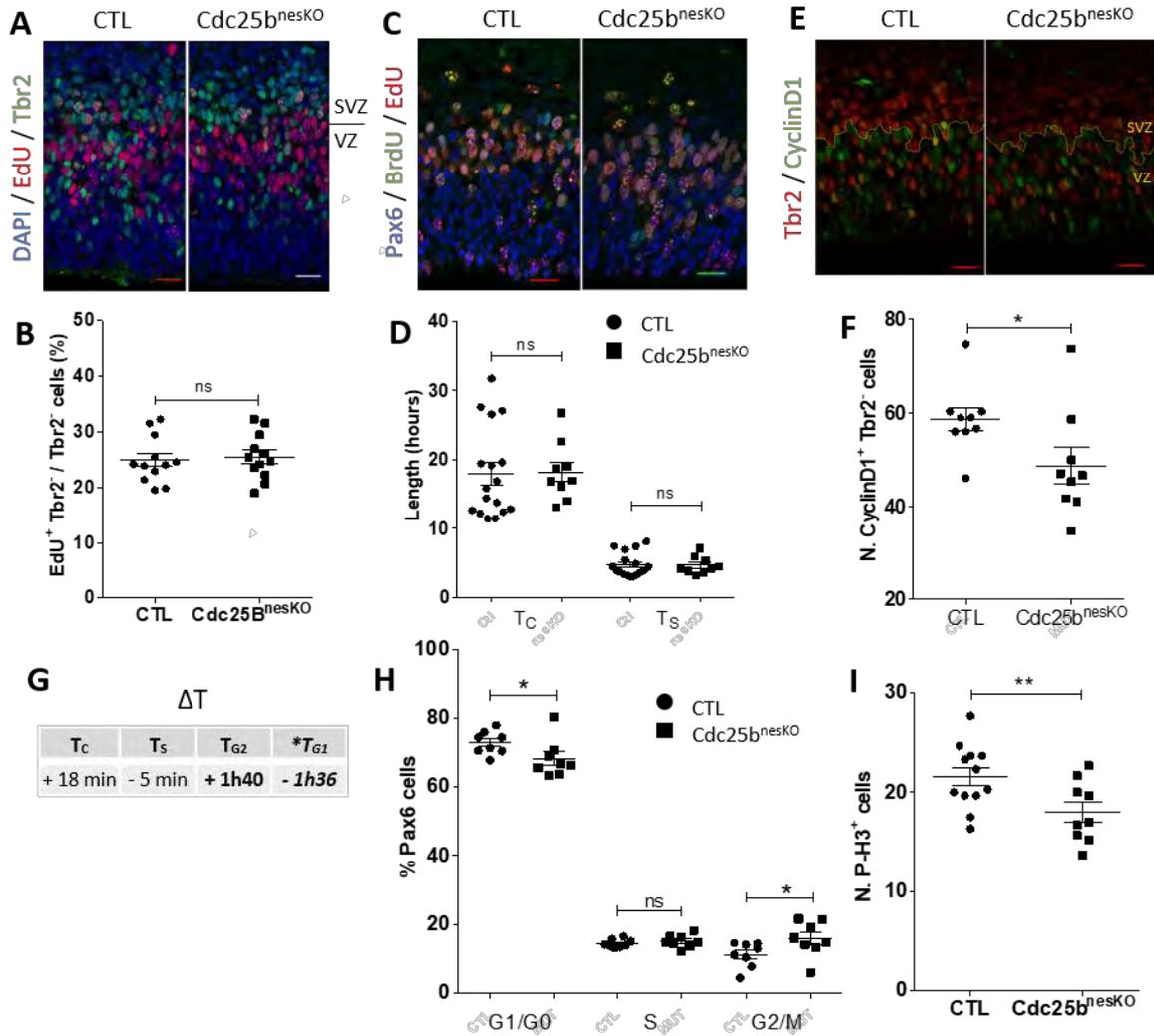


Figure 50: La perte de fonction de Cdc25b n’affecte pas le taux de prolifération ni la durée totale du cycle cellulaire des aRGs. Analyse des paramètres du cycle cellulaire à E14.5 (A-B) Marquage Tbr2 1h après injection d’EdU permettant de déterminer la proportion de cellules Tbr2⁻ dans la VZ (aRGs) en phase S (A). Quantification des cellules EdU⁺ parmi les cellules Tbr2⁻ dans la VZ (aRGs) dans des embryons CTL et Cdc25b^{nesKO} (B). t-test Mann-Whitney. (C-D) Co-marquage EdU/BrdU permettant de déterminer la durée totale du cycle cellulaire (T_C) et de la phase S (T_S) dans les progéniteurs Pax6⁺ de la VZ (C). Le T_C et T_S sont calculés à partir des comptages de cellules EdU⁺BrdU⁻ et EdU⁺BrdU⁺ comme décrit dans (Martynoga et al., 2005). Nuage de points représentant les longueurs moyennes T_C et T_S dans des embryons CTL et Cdc25b^{nesKO} (D). Statistiques par modèle mixte. (E-F) Co-marquage CyclinD1 et Tbr2 pour déterminer la proportion de progéniteurs Tbr2⁻ dans la VZ (aRGs) en phase G1 (CyclinD1⁺) (E). Quantification des cellules CyclinD1⁺ VZ Tbr2⁻ dans des embryons CTL et Cdc25b^{nesKO} (F). Statistiques par modèle mixte. (G) Différence (ΔT) des durées moyennes mesurées T_C, T_S et T_{G2} et déduite (*) T_{G1} entre les conditions CTL et Cdc25b^{nesKO}. (H) Analyse par cytométrie de flux de la proportion de cellules Pax6⁺ dans chaque phase du cycle cellulaire, dans des embryons CTL et Cdc25b^{nesKO}. t-test Mann-Whitney. (I) Quantification des cellules en mitose apicale H3P⁺ sur une distance de 400 μ m le long du ventricule, dans des embryons CTL et Cdc25b^{nesKO}. Statistiques par modèle mixte. L’échelle représente 20 μ m. VZ = zone ventriculaire, SVZ = zone sous-ventriculaire.

Comme le taux de prolifération n'est pas affecté, nous avons cherché à savoir si le rallongement de la G2 a pu causer un ralentissement global de la durée totale du cycle cellulaire. Pour cela, nous avons réalisé un double marquage EdU et BrdU pour estimer la durée totale du cycle (Tc) et de la phase S, comme décrit par (Martynoga et al., 2005). (cf Matériel et Méthodes) (**Fig.50C**). Comme le montrent les figures **50D et 50G**, la durée totale du cycle et de la phase S ne sont pas significativement modifiées dans les aRGs $Cdc25b^{nesKO}$. Nous avons déduit de ce résultat qu'un raccourcissement de la phase G1 et/ou M pourrait compenser le fort rallongement de la phase G2. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons directement évalué la longueur de la phase G1, soit en comptant le nombre de cellules exprimant Cycline D1⁺ (exprimée spécifiquement en phase G1) parmi les aRGs (correspondant aux cellules Tbr2⁻ dans la VZ, **Fig.50E-F**), ou en quantifiant le pourcentage d'aRGs (Pax6⁺) en G1 par cytométrie de flux (**Fig.50H**). Nous observons une réduction du nombre de cellules Cycline D1⁺ dans les aRGs $Cdc25b^{nesKO}$ (**Fig.50F**, $58.7 \pm 2.5 / 130 \mu\text{m}$ dans les contrôles versus 48.7 ± 3.8 dans les embryons $Cdc25b^{nesKO}$) et du pourcentage d'aRGs étant en phase G1 (**Fig.50H**, $72,98 \pm 1,19 \%$ versus $68,3 \pm 1,95 \%$ dans $Cdc25b^{nesKO}$) indiquant que la phase G1 est plus courte dans les aRGs $Cdc25b^{nesKO}$. Enfin, nous avons quantifié le nombre total de mitose apicale (cellules H3P⁺) et trouvé une réduction significative ($21.6 \pm 0.9 / 400 \mu\text{m}$ versus 18 ± 1.03 dans les embryons $Cdc25b^{nesKO}$) (**Fig.50I**). Comme la longueur totale du cycle cellulaire et l'index de prolifération ne sont pas modifiés, cette réduction indique un raccourcissement de la durée de la mitose dans les aRGs $Cdc25b^{nesKO}$. Pour conclure, l'inactivation de $Cdc25b$ mène à un fort rallongement de la phase G2 dans les aRGs, qui est compensé par une diminution de la durée de la phase G1 et de la phase M, ce qui leur permet de garder une longueur de cycle cellulaire et un index prolifératif normaux.

B.3 $Cdc25b$ régule le ratio de progéniteurs basaux

Nous avons ensuite regardé si ces défauts du cycle cellulaire des aRGs $Cdc25b^{nesKO}$ étaient associés à un défaut de production des progéniteurs corticaux. Nous avons d'abord quantifié les aRGs et les bIPs en dénombrant respectivement les cellules exprimant Pax6⁺ Tbr2⁻ et Tbr2⁺ Pax6^{+/-}, à différents stades embryonnaires : à E13,5 (**Fig.51A-C**) – soit un stade de début de production de bIPs et des neurones des couches profondes, puis à E14,5 (**Fig.51D-G**) et E16,5 (**Fig.51H-K**) qui sont deux stades de forte production de neurones et de progéniteurs basaux bIPs et bRGs (Govindan and Jabaudon, 2017). Le nombre d'aRGs n'est affecté à aucun des trois stades dans les embryons $Cdc25b^{nesKO}$ (**Fig.51B,E,I**). Lors de la quantification des bIPs, nous avons distingué ceux qui viennent d'être produits par les aRGs et qui sont présents dans la VZ, de ceux qui ont eu le temps de migrer dans la SVZ. A E14,5 le nombre de bIPs est diminué dans la VZ, de $65.98 \pm 2.7 / 130 \mu\text{m}$ dans les contrôles à 57.28 ± 3.2 dans la condition $CDC25B^{nesKO}$ (**Fig.51F**). De façon intéressante, 48h plus tard, cette diminution n'est plus détectée dans la VZ mais dans la SVZ. (**Fig.51J**, $69.7 \pm 2.8 / 113 \mu\text{m}$ dans les contrôles versus 58.56 ± 4.3 dans $CDC25B^{nesKO}$).

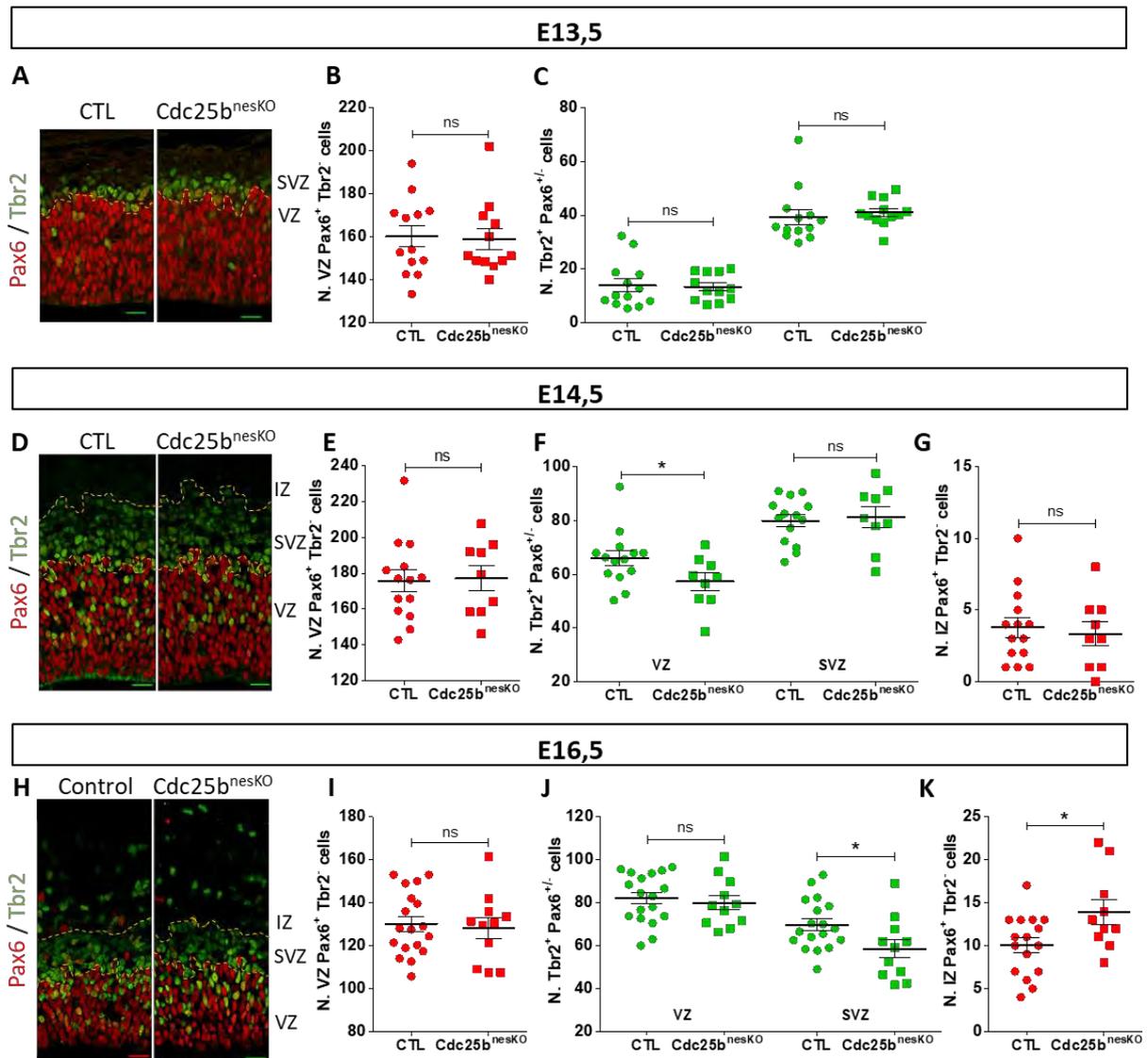


Figure 51 : Cdc25b régule le ratio de progéniteurs basaux. (A,D,H) Immunomarquage Pax6 et Tbr2 sur des coupes frontales de cerveau à E13,5 (A) E14,5 (D) et E16,5 (H) d’embryons contrôles et Cdc25b^{nesKO}. (B-C, E-G, I-K) Nuage de points représentant le nombre de cellules Pax6⁺ dans la VZ (B, E, I), Tbr2⁺ dans la VZ et la SVZ (C, F, J) et Pax6⁺ dans l’IZ (G, K) à E13,5 – E14,5 et E16,5 dans des embryons contrôles et mutants. Cellules quantifiées dans des fenêtres d’une largeur de de 113 μ m à E13,5 – 130 μ m à E14,5 et 11 μ m à E16,5. Statistiques par modèle mixte. L’échelle représente 20 μ m. VZ = zone ventriculaire, SVZ = zone sous-ventriculaire, IZ = zone intermédiaire.

Pour éliminer la possibilité que cette réduction soit due à une augmentation de l’apoptose dans les mutants, nous avons quantifié les cellules positives pour la Caspase 3 activée à E16,5 mais aucune différence n’est détectée entre les embryons contrôles et Cdc25b^{nesKO} (Fig.52A-B). De plus, nous avons quantifié la prolifération des bIPs à E14.5 et trouvé que les index prolifératif et mitotique ne sont pas significativement affectés, excluant l’hypothèse que la réduction du nombre de bIPs résulte d’une diminution de leur prolifération. (Fig.52C-D). Nous avons également mesuré la durée de la phase G2 dans les bIPs des embryons mutants à E14,5

et observé qu'elle est augmentée de 41 minutes (**Fig.52E**), soit moins fortement que dans les aRGs au même stade (**Fig.52E**, ΔT_{G2} aRG = +1h40)

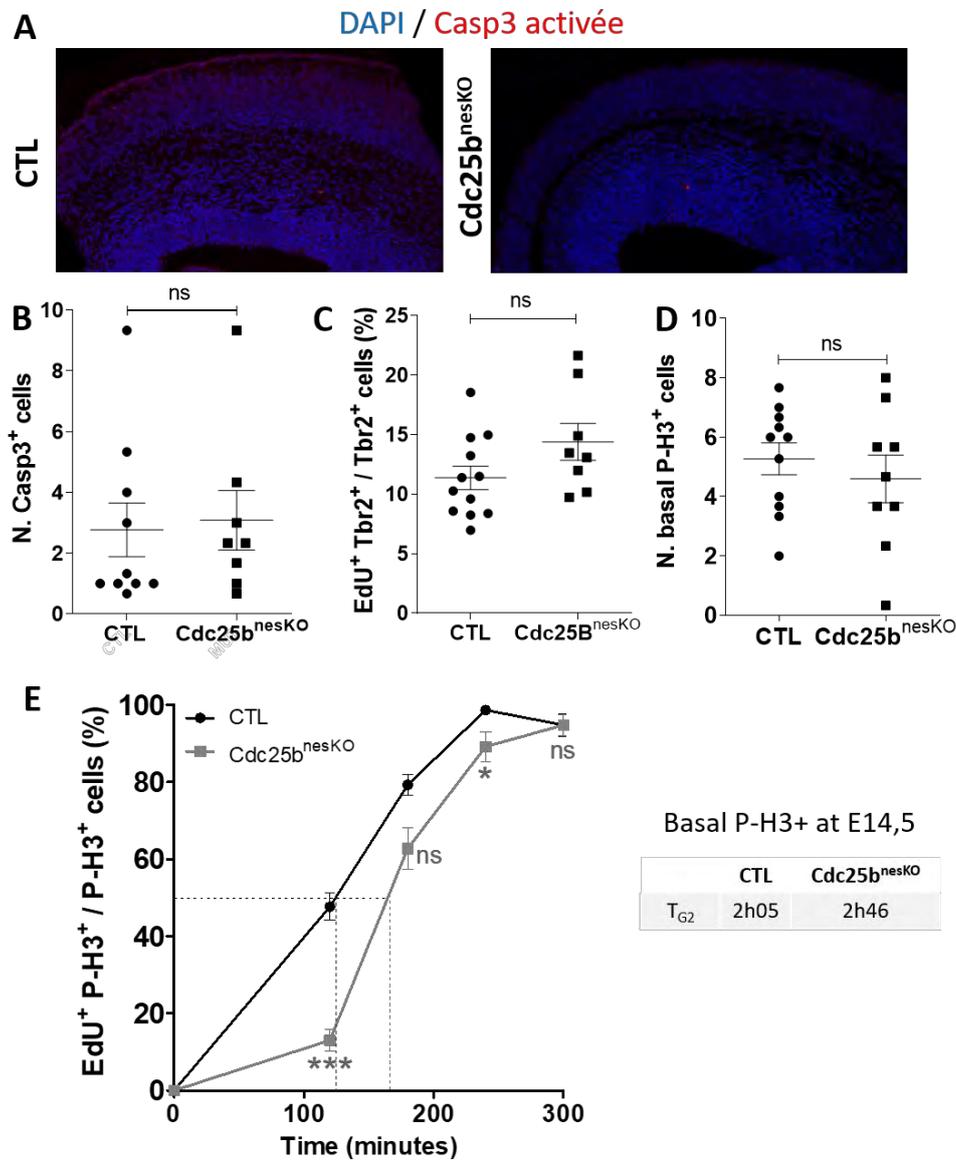


Figure 52 : La diminution du nombre de bIPs dans les embryons Cdc25b^{nesKO} n'est pas due à une augmentation de l'apoptose ou une diminution de leur prolifération. (A-B) Immunomarquage Caspase 3 activée sur des coupes frontales de cerveau d'embryons contrôles et Cdc25^{nesKO} à E16,5 (A). Nuage de points représentant par embryons le nombre de cellules positives pour Casp3 activée comptées sur trois hémisphères, par condition (B). Statistiques par modèle mixte. **(C)** Nuage de points représentant le pourcentage de cellules Tbr2⁺ en phase S EdU⁺ à E14,5, par embryons CTL et Cdc25b^{nesKO}. Statistiques par modèle mixte. **(D)** Quantification des cellules en mitose basale P-H3⁺ à E14,5 dans une fenêtre de 400 μ m de largeur, par embryons CTL et Cdc25b^{nesKO}. Statistiques par modèle mixte. **(E)** Quantification de la proportion de cellules basales (bIPs) EdU⁺P-H3⁺/P-H3⁺ à E14,5. T_{G2} correspond à la durée à laquelle 50% des cellules P-H3⁺ sont EdU⁺ (indiqué par les lignes en pointillés). t-test Mann-Whitney. Nombre d'embryons analysés par points : CTL = 3 à 10 vs Cdc25^{nesKO} = 3 à 8.

Pour finir, nous avons quantifié les cellules Pax6⁺ Tbr2⁻ dans la zone intermédiaire (IZ) aux deux stades, puisqu'il a été proposé que ces cellules soient des progéniteurs bRGs, qui ressemblent au oRG présents chez les Mammifères gyrencéphaliques supérieurs (tel que le furet ou les Primates) (Florio and Huttner, 2014; Govindan and Jabaudon, 2017). Le nombre de cellules Pax6⁺ Tbr2⁻ dans la IZ est augmenté à E16,5, passant de 10.06 ± 0.9 dans les contrôles à 13.9±1.4 dans les embryons Cdc25b^{nesKO} (Fig.51K). Ces résultats suggèrent que la perte de fonction de Cdc25b dans les aRGs affecte le destin de leur cellules filles, menant à un déséquilibre dans la production des progéniteurs basaux à E14,5 et à E16,5.

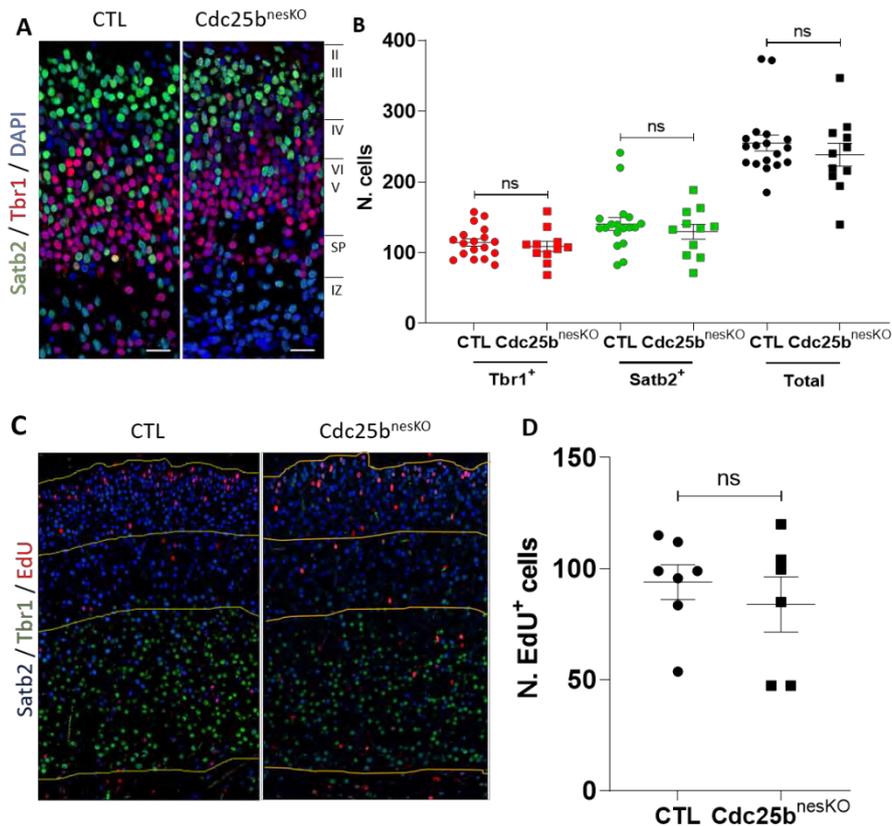


Figure 53 : Le nombre de neurones produits à E16,5 n'est pas significativement modifié dans les embryons Cdc25b^{nesKO}. (A-B) Immunofluorescence des neurones Satb2⁺ et Tbr1⁺ sur des coupes frontales de cerveau d'embryons CTL et Cdc25b^{nesKO} à E16,5 (A). Quantification des neurones Satb2⁺ (en vert) ou Tbr1⁺ (en rouge), et du nombre total de neurones Satb2⁺Tbr1⁺ (en noir) à E16,5, dans des fenêtres de 113 µm de large (B). Statistiques par modèle mixte. (C-D) Immunomarquage au stade post-natal P0 de l'EdU après injection au stade E16,5, et des neurones Satb2⁺ et Tbr1⁺ sur des coupes frontales d'embryons CTL et Cdc25b^{nesKO} (C). Nuage de points représentant par embryons le nombre de neurones nés à E16,5 en quantification les cellules EdU⁺ Satb2⁺ et/ou Tbr1⁺ (D). Statistiques par modèle mixte.

Etant donné que ces différents types de progéniteurs n'ont pas les mêmes capacités neurogéniques, nous avons déterminé si ce changement de ratio des BPs a des conséquences sur la production neuronale. Pour cela, nous avons quantifié les neurones glutamatergiques corticaux en utilisant Satb2⁺ (neurones des couches II, III, IV) et Tbr1⁺ (neurones des couches VI, SP) comme marqueurs à E16,5 (Fig.53A-B), ou en réalisant des expériences de *birth dating*

en marquant les progéniteurs à E14,5 et E16,5 par incorporation d'EdU puis en analysant leur devenir au stade post natal P0 (**Fig.53C-D**). Par ces deux approches, nous n'avons pas observé de différences significatives entre les embryons contrôles et mutants (**Fig.53D**). Nous avons ensuite mesuré la taille des hémisphères corticaux et l'épaisseur de la plaque corticale au stade postnatal P0. Bien que l'on voit une diminution de l'aire du cortex dans les embryons $Cdc25b^{nesKO}$, elle n'est pas significative (modèle mixte, $p = 0.1585$) et dans l'ensemble, nous n'avons pas observé de défauts (**Fig.54**). Ces résultats indiquent que le changement du ratio de progéniteurs basaux observé dans les individus $Cdc25b^{nesKO}$ n'a pas d'impact majeur sur le nombre global de neurones corticaux.

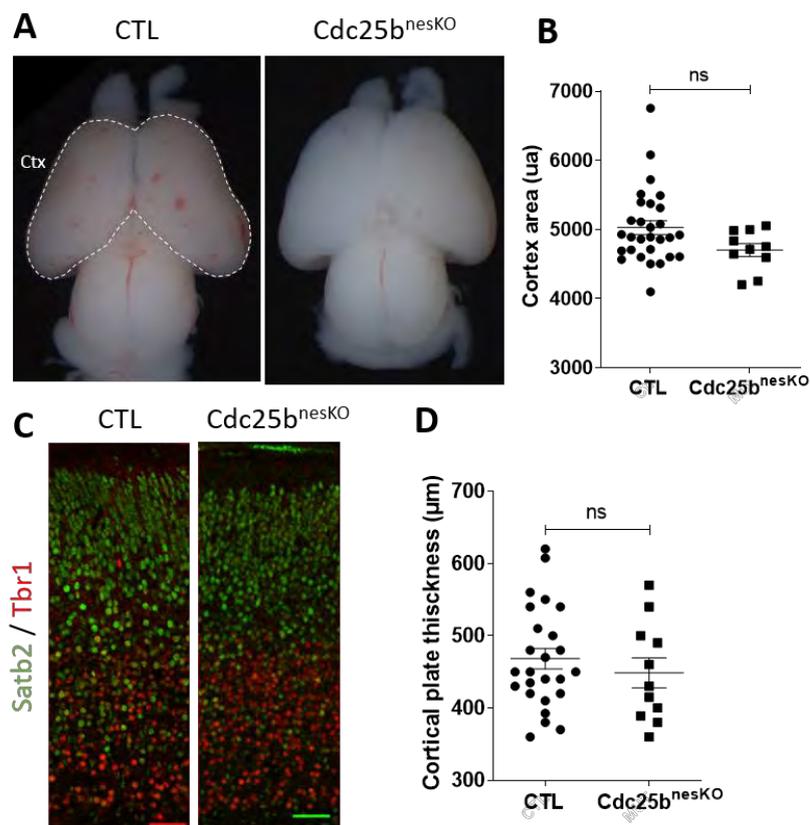


Figure 54 : La taille du cortex n'est pas affectée dans les individus $Cdc25b^{nesKO}$ au stade post-natal P0. (A-B) Mesure de l'aire du cortex (délimité en pointillé blanc) au stade P0 dans les conditions contrôle et $cdc25b^{nesKO}$ (A) et quantification par embryons (B). Statistiques par modèle mixte. ua = unité arbitraire. Ctx = cortex. **(C-D)** Immunomarquage Satb2 et Tbr1 sur des coupes frontales de cerveaux contrôles et $Cdc25b^{nesKO}$ au stade P0 (A) permettant de mesure de l'épaisseur de la plaque corticale par embryons (D). Statistiques par modèle mixte.

Nous avons montré que dans la moelle épinière de poulet, $Cdc25b$ promeut la neurogenèse via un changement du mode de division prolifératif vers différenciation. Pour voir si $Cdc25b$ contrôle également le mode de division des progéniteurs corticaux, nous avons croisé les souris $Cdc25b^{nesKO}$ avec des souris Knock-in $Tis21-GFP$, pour distinguer les progéniteurs engagés dans des divisions différenciatives (produisant des neurones ou des bIPs), des divisions prolifératives (auto-renouvellement aRG + aRG ou bIP + bIP) (Haubensak et al., 2004). Comme le montre la **Figure 55**, nous n'avons pas détecté de différence dans le nombre de

cellules Tis21-GFP⁺ parmi les aRGs ou les bIPs dans nos mutants, suggérant que Cdc25b ne contrôle pas le mode de division, à ce niveau.

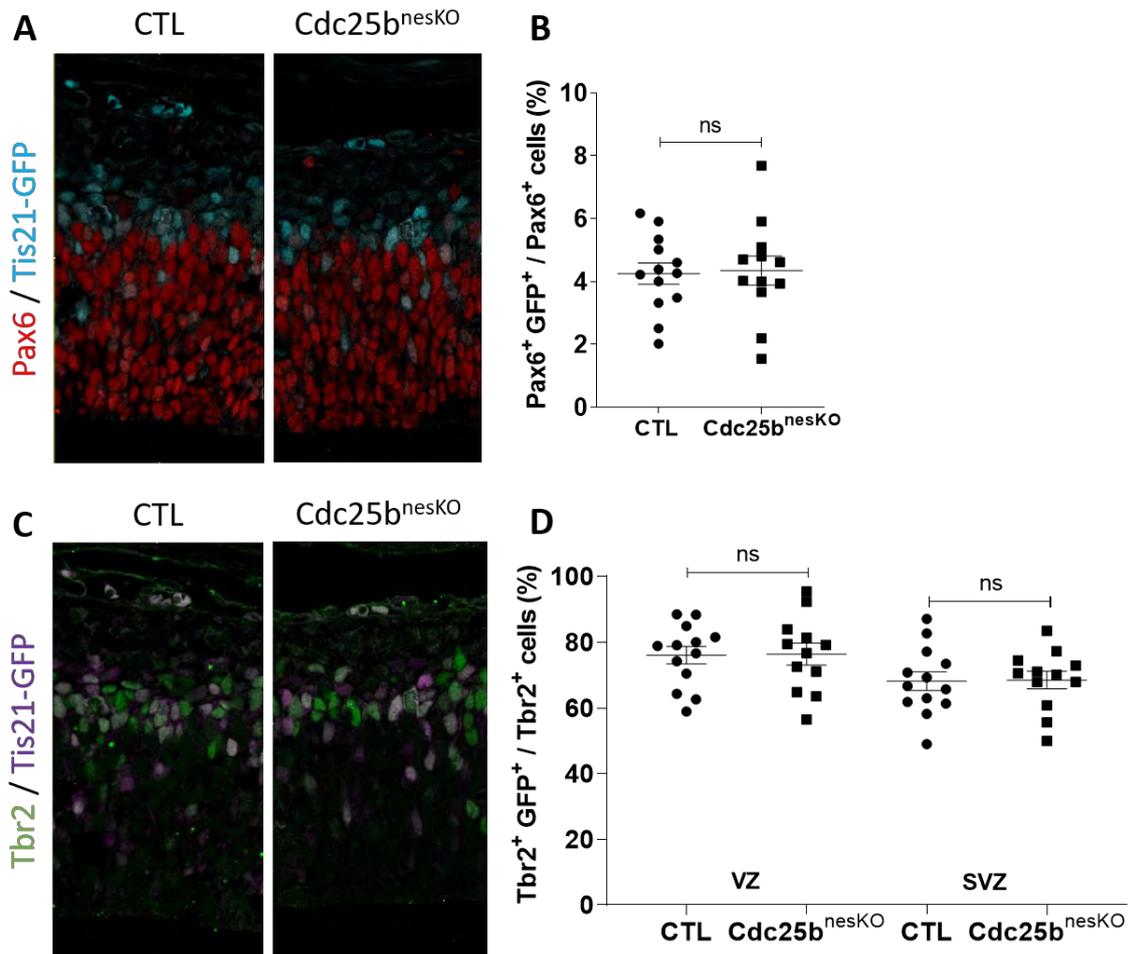


Figure 55 : La proportion de divisions neurogéniques n’est pas modifiée dans les cortex mutants $Cdc25b^{nesKO}$. (A,C) Immunomarquage Pax6 (A), Tbr2 (C) et GFP sur des coupes frontales de cortex à E13,5 dans des embryons CTL et $Cdc25b^{nesKO}$. (B) Nuage de points représentant par embryons contrôles et mutants le pourcentage de cellules Pax6⁺ exprimant Tis-21-GFP. Statistiques par modèle mixte. (D) Nuage de points représentant par embryons contrôles et mutants le pourcentage de cellules Tbr2⁺ exprimant Tis-21-GFP dans la VZ ou la SVZ. Modèle mixte. Cellules quantifiées dans une fenêtre de 113 μm de largeur. Statistiques par modèle mixte.

Cdc25b semble donc agir à un stade plus tardif dans la régulation des progéniteurs corticaux. Le nombre d’aRGs étant inchangé dans la condition $Cdc25b^{nesKO}$, la diminution des bIPs et l’augmentation des bRGs pourrait impliquer un changement dans le destin des aRGs. Ainsi, dans les mutants $Cdc25b^{nesKO}$, les divisions aRG > aRG + bIP seraient réduites en faveur de divisions aRG > aRG + bRG ou aRG + neurone.

B.4 La perte de fonction de Cdc25b semble modifier l’angle de division des progéniteurs corticaux

Nous avons ensuite regardé si la perte de fonction de Cdc25b dans les aRGs affecte leur angle de division. En effet, même si ce mécanisme est encore controversé, il a été proposé que la

production des bRGs soit favorisée quand le plan de division est oblique, alors que les divisions générant des bIPs et des neurones sont associées à des divisions horizontales (l'axe qui passe par les centrosomes est horizontal par rapport au ventricule, le plan de division est vertical par rapport au ventricule) (Delaunay et al., 2017). Nous avons donc mesuré l'angle formé par l'axe passant par les centrosomes par rapport au ventricule, lors de la mitose des aRGs dans les conditions CTL vs $Cdc25b^{nesKO}$. La **Figure 56** montre une diminution des divisions horizontales puisque dans les embryons CTL, 58% des cellules ont un angle compris entre 0 et 10°, contre 49% dans les embryons $Cdc25b^{nesKO}$. A l'inverse, on note une augmentation des divisions obliques (40% des mitoses CTL vs 48% des mitoses $Cdc25b^{nesKO}$ ont un angle de division compris entre 10 et 45°, et 2% vs 3% ont un angle compris entre 45 et 80°, respectivement dans les embryons CTL vs mutants). Ces résultats suggèrent que la perte de $Cdc25b$ pourrait modifier l'angle de divisions des aRGs et favoriser les divisions obliques.

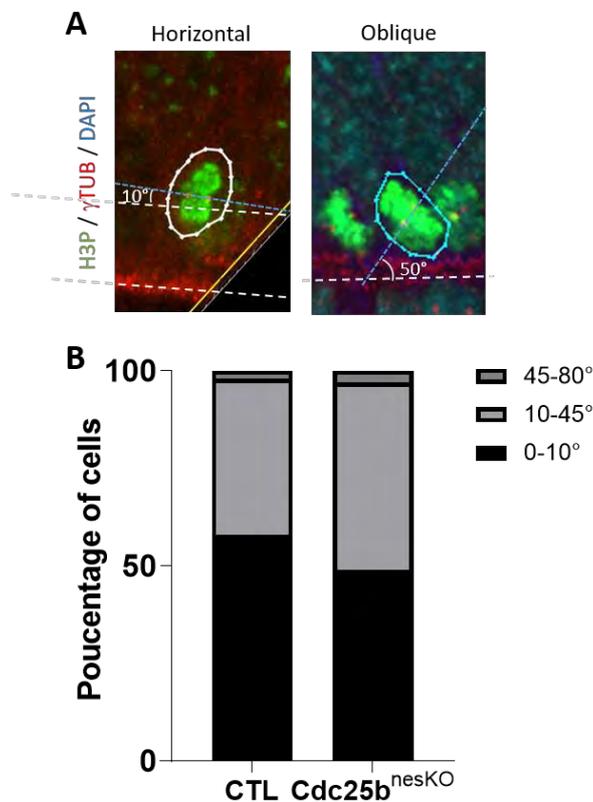


Figure 56 : La perte de fonction de $Cdc25b$ semble modifier l'orientation du fuseau mitotique lors des divisions apicales. (A) Immunomarquage des centrosomes avec γ tubuline, des noyaux en division avec H3P et marquage de la chromatine avec du DAPI. Représentation type d'une division dite « horizontale » et d'une division dite « oblique ». Le croisement de la ligne bleue (qui passe par les deux centrosomes de la cellule) et de la ligne blanche (qui marque le ventricule du cortex) forme un angle de division, dont le degré définit le type de division. **(B)** Diagramme à barres empilées représentant le pourcentage de cellule ayant un angle de divisions compris entre 0 et 10° (horizontal), 10 et 45° (oblique) ou 45 et 80° (oblique), pour la condition CTL et $Cdc25b^{nesKO}$. Nombre de cellules analysées : CTL = 106, $Cdc25b^{nesKO}$ = 93.

B.5 Les changements des paramètres du cycle causent le déséquilibre des progéniteurs corticaux dans les embryons mutants pour *Cdc25b*.

Le changement des paramètres du cycle et en particulier le raccourcissement de la phase G1 a été associé à un changement dans le ratio de progéniteur (Lange et al., 2009b; Pilaz et al., 2009). D'un autre côté, les régulateurs du cycle comme Cycline D1 ou CDC25B ont été montrés comme entraînant la neurogenèse de manière indépendante de leur fonction sur le cycle (Bienvenu et al., 2010; Bonnet et al., 2018a). Comme CDC25B affecte la longueur de la G1/G2 et le nombre de progéniteurs corticaux, la prochaine étape était de déterminer le lien causal entre ces deux événements. Pour répondre à cette question, nous avons décidé de comparer l'action de CDC25B^{WT} avec celle d'une forme mutée de CDC25B, CDC25B^{ΔCDK}, qui n'est plus capable d'interagir avec CDK1 (Bonnet et al., 2018), par électroporation *in utero* à E13,5 puis en analysant le destin des cellules 28h plus tard. Comparé à un vecteur contrôle pmp-LacZ, le gain de fonction de CDC25B^{WT} augmente la proportion de cellules Tbr2⁺ (de 36,36 ± 2,51 % dans le contrôle à 47,53 ± 2,25 % dans le gain-de-fonction CDC25B^{WT}) sans affecter la proportion d'aRGs (déduit des cellules Tbr2⁻ dans la VZ) ou de neurones (déduit des cellules Tbr2⁻ dans l'IZ ou la SVZ), indiquant qu'il est suffisant pour produire les bIPs à partir des aRGs (**Fig.57**). Nous avons ensuite testé la capacité de CDC25B^{ΔCDK} à phénotyper la forme sauvage et nous avons trouvé que la surexpression de cette forme mutée ne modifie ni le nombre de cellules Tbr2⁺ (de 36,36 ± 2,51 % dans le contrôle à 34,86 ± 1,76 % dans le gain-de-fonction CDC25B^{ΔCDK}) ni le nombre d'aRGs ou de neurones (**Fig.57**).

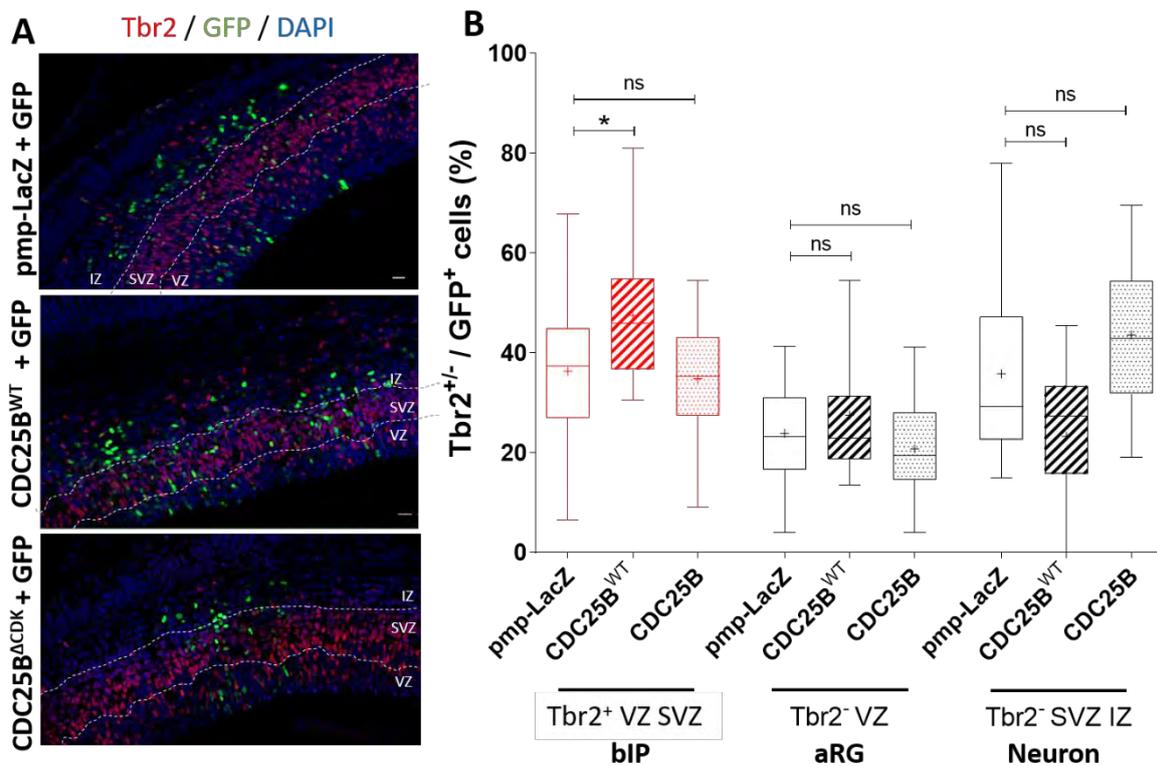


Figure 57 : Cdc25b contrôle le ratio de progéniteurs basaux à travers son interaction avec CDK1. (A) Immunofluorescence Tbr2 sur des coupes de cerveau à E14,5 après co-électroporation *in utero* d'un plasmide contrôle pmp-LacZ, pmp-CDC25B^{WT} (CDC25B^{WT}), CDC25B^{ΔCDK} + GFP.

gain-de-fonction sauvage) ou pmp-CDC25B^{ΔCDK} (CDC25B^{ΔCDK}, gain-de-fonction de la forme mutée) avec un plasmide pCIG-GFP à E13,5. **(B)** Diagramme en boîte représentant le pourcentage de cellules Tbr2⁺, Tbr2⁻ dans la VZ et Tbr2⁻ dans la SVZ/IZ parmi les cellules GFP⁺, par coupes de chaque condition. t-test Mann-Whitney. VZ = zone ventriculaire, SVZ = zone sous-ventriculaire zone, IZ = zone intermédiaire. L'échelle représente 20 μm.

Ces résultats indiquent que CDC25B agit via son interaction avec CDK pour changer le ratio de progéniteurs suggérant que ce phénotype est directement lié au changement de la durée des phases G1/G2.

Ces données montrent que dans le cortex en développement, Cdc25b régule la production des progéniteurs basaux bIPs et bRGs issus des progéniteurs apicaux aRGs. De plus, l'inactivation de Cdc25b mène à un fort rallongement de la phase G2 dans les aRGs, qui est compensé par une diminution de la durée de la phase G1 et de la phase M, ce qui leur permet de garder une longueur de cycle cellulaire et un index prolifératif normaux. Ces deux phénotypes sont liés, puisque l'interaction de CDC25B avec CDK1, son substrat qui contrôle la transition G2/M, est nécessaire pour réguler la proportion de bIPs. Il reste maintenant à confirmer si c'est la modification de la durée de la phase G2 qui est impliquée dans ce contrôle.

C. Résultats supplémentaires

C.1 Analyse de la lignée *Emx1-Cre x Cdc25b^{fl/-}*

Afin de renforcer nos résultats, il nous semblait important de valider nos observations faites dans les embryons *Cdc25b^{nesKO}*, en utilisant une autre stratégie. En effet, l'utilisation de la lignée *Nestin-Cre* est controversée car plusieurs études pointent le fait que la recombinaison du gène floxé n'est pas complète ou l'est mais assez tardivement dans le développement du cortex (Liang et al., 2012a). Nous avons donc analysé les conséquences de la perte de fonction conditionnelle de *Cdc25b* en utilisant cette fois une lignée dans laquelle la Cre recombinase est sous le contrôle des éléments de régulation du gène *Emx1*. *Emx1* est un gène qui s'exprime plus tôt que *Nestin* et spécifiquement dans les progéniteurs corticaux et il a été montré que *Emx1-Cre* est beaucoup plus efficace et agit plus tôt dans les progéniteurs corticaux que *Nestin-Cre* (Liang et al., 2012a). Nous avons donc commencé à analyser différents paramètres de la corticogenèse dans des embryons *Cdc25b^{emx1KO}*.

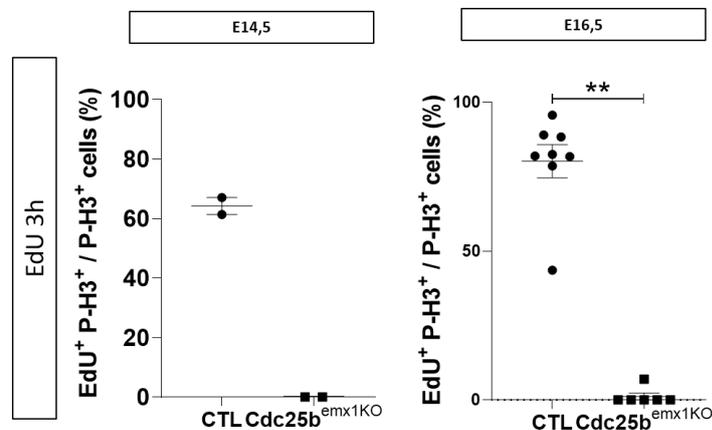


Figure 58 : La longueur de la phase G2 est augmentée dans les embryons *Cdc25b^{emx1KO}*. Nuage de points représentant par embryons CTL et *Cdc25b^{emx1KO}*, le pourcentage de cellules $\text{EdU}^+\text{P-H3}^+/\text{P-H3}^+$, 3h après injection d'EdU, aux stades E14,5 et E16,5.

Comme précédemment, nous avons tout d'abord analysé si la longueur de la phase G2 est modifiée dans les embryons *Cdc25b^{emx1KO}* à l'aide de la méthode PLM. Comme attendu, lorsqu'on analyse la proportion d'aRGs $\text{EdU}^+\text{H3P}^+/\text{H3P}^+$ après un traitement EdU de 3h juste avant le prélèvement des embryons, cette proportion est nettement inférieure dans les embryons *Cdc25b^{emx1KO}* par rapport aux embryons CTL, et ce à E14,5 et à E16,5 (**Fig.58**). Ce résultat indique que la phase G2 est bien plus longue dans les cortex *Cdc25b^{emx1KO}*. Il nous faudra réaliser des analyses après différents temps de traitement EdU pour calculer précisément la durée de la phase G2 dans ces mutants.

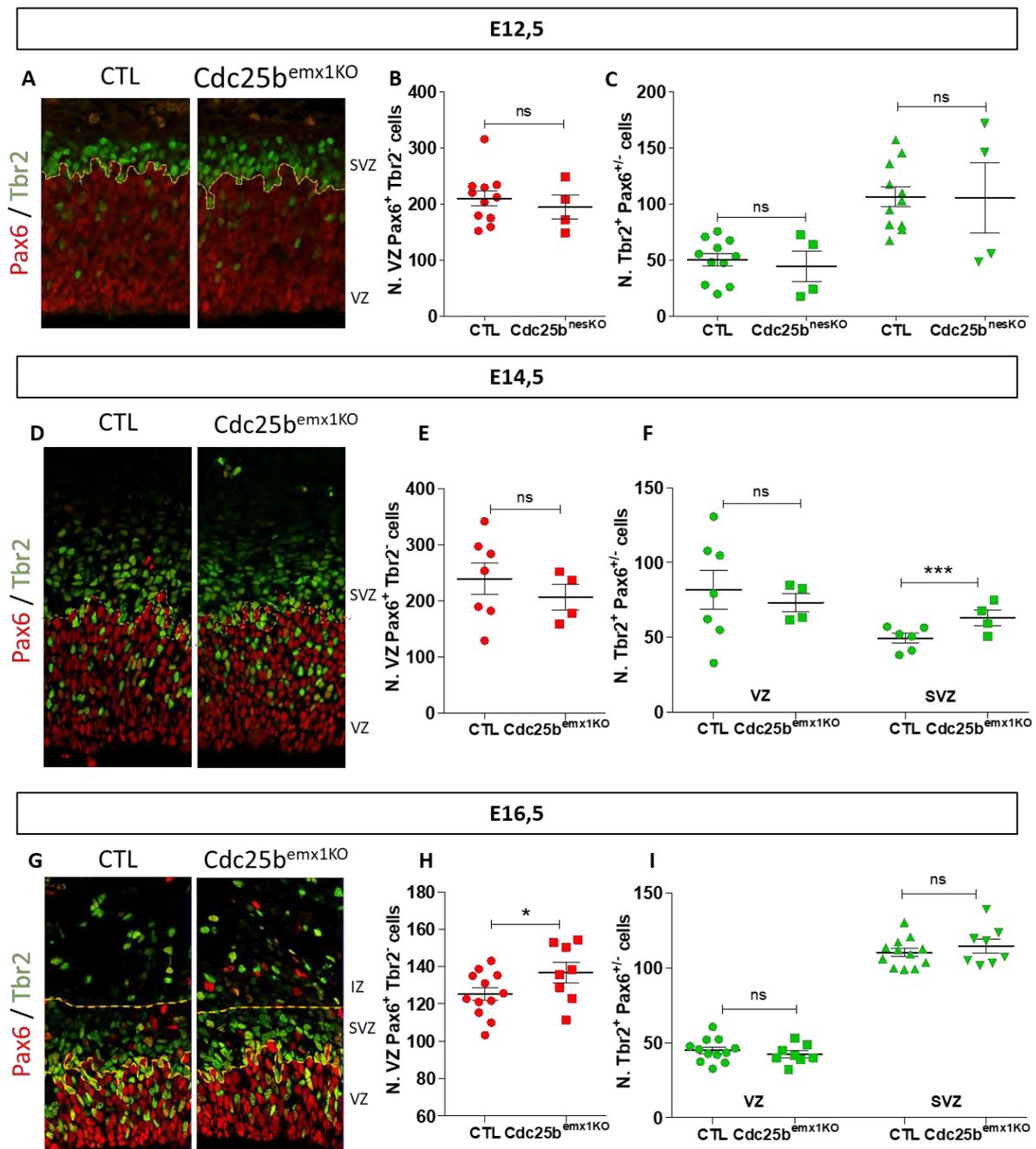


Figure 59 : La corticogenèse est modifiée dans les embryons $Cdc25b^{emx1KO}$. (A,D,G) Immunomarquage Pax6 et Tbr2 sur des coupes frontales de cerveau à E12,5 (A) E14,5 (D) et E16,5 (G) d'embryons contrôles et $Cdc25b^{emx1KO}$. (B-C, E-F, H-I) Nuage de points représentant le nombre de cellules Pax6⁺ dans la VZ (B, E, H) et Tbr2⁺ dans la VZ et la SVZ (C, F, I) à E12,5 – E14,5 et E16,5 dans des embryons contrôles et mutants. Cellules quantifiées dans des fenêtres d'une largeur de de 130 μ m. Statistiques par modèle mixte. VZ = zone ventriculaire, SVZ = zone sous-ventriculaire, IZ = zone intermédiaire.

Nous avons ensuite quantifié les progéniteurs aRGs et bIPs à E12,5 – E14,5 et E16,5 (**Fig.59**). Des résultats préliminaires montrent qu'à E12,5, l'ensemble des progéniteurs aRGs et bIPs a tendance à être diminué. On note cependant une importante variabilité entre les embryons mutants, nécessitant l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons. Cependant à E14,5 on observe une augmentation significative des bIPs dans la SVZ, et 48h plus tard des aRGs.

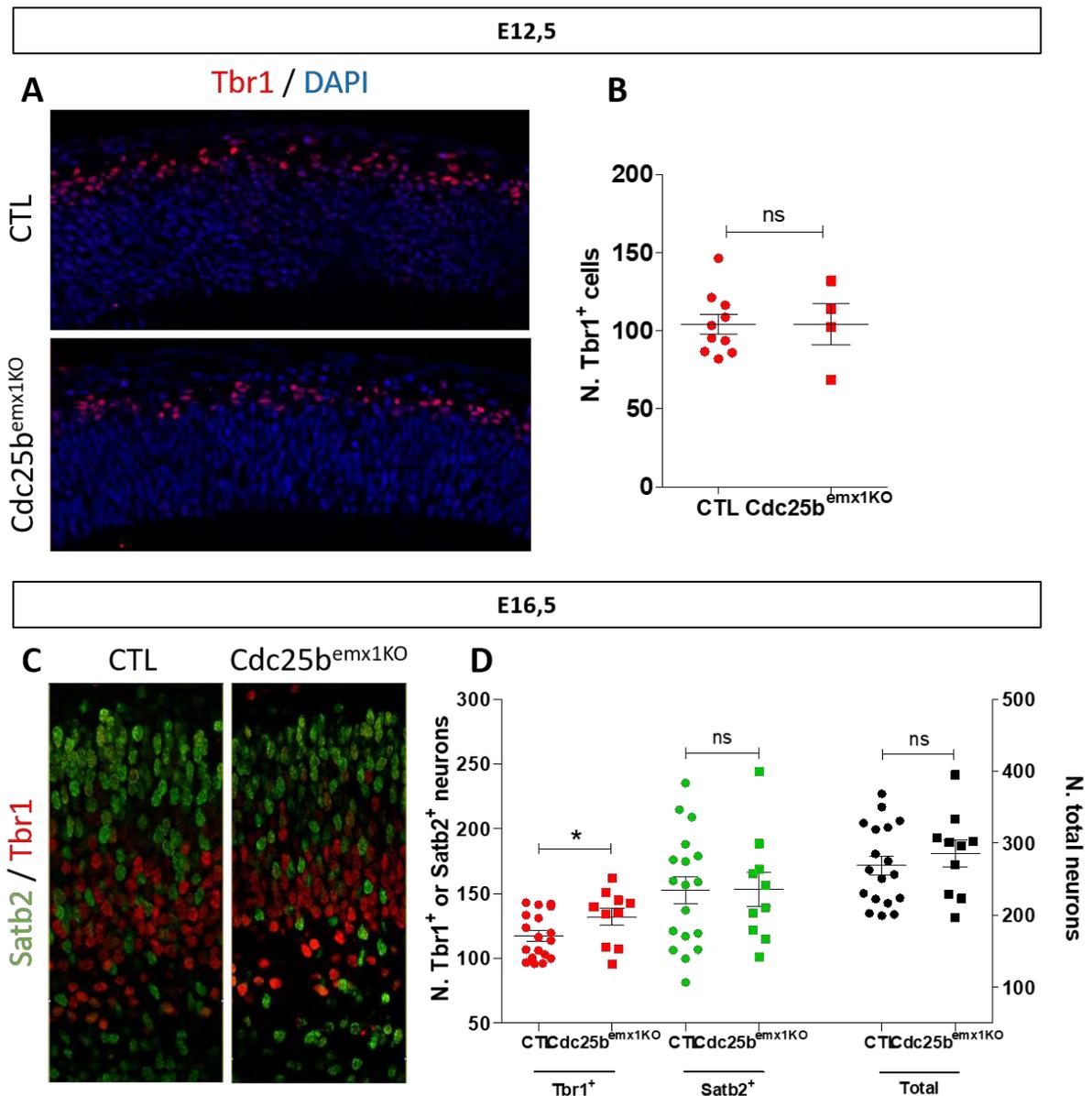


Figure 60 : Le nombre de neurone Tbr1⁺ est augmenté à E16,5 dans les embryons Cdc25b^{emx1KO} (A,B) Immunomarquage Tbr1 sur des coupes frontales de cerveau d’embryons contrôles et Cdc25b^{emx1KO} à E12,5. Quantification des neurones Tbr1⁺ dans des fenêtres de 380 μm de largeur. Modèle mixte. **(C,D)** Immunomarquage Tbr1 et Satb2 sur des coupes frontales de cerveau d’embryons contrôles et Cdc25b^{emx1KO} à E16,5.. Quantification des neurones Satb2⁺ (en vert) ou Tbr1⁺ (en rouge), et du nombre total de neurones Satb2⁺Tbr1⁺ (en noir) à E16,5, dans des fenêtres de 130 μm de largeur (B). Modèle mixte.

La quantification des neurones à E12,5 ne montre pas de différences significatives entre les embryons CTL et Cdc25b^{emx1KO}. Toutefois à E16,5, on observe une augmentation spécifiquement dans les neurones Tbr1⁺, avec un nombre moyen de 113 ± 4,14 cellules dans les embryons CTL contre 132 ± 6,74 cellules dans les embryons mutants. **(Fig.60)**

Ces résultats laissent penser que la perte de fonction de Cdc25b avec la lignée *Emx1-Cre* diminue les bIPs et potentiellement les aRGs plus tôt dans le développement qu’avec la lignée *Nestin-Cre*. L’augmentation des bIPs et des aRGs plus tard dans la corticogenèse pourrait être

la conséquence d'un mécanisme de compensation, due à une augmentation de leur prolifération. Cette compensation résulterait en une augmentation de la production neuronale à E16,5. Pour examiner cette hypothèse, nous avons évalué l'index mitotique des BIPs en quantifiant les mitoses basales H3P+ à E14,5 et en les rapportant au nombre moyen de cellules Tbr2+ à ce stade, pour chaque condition. Des données préliminaires montrent une tendance à l'augmentation de l'index mitotique dans les mutants *Cdc25b^{emx1KO}* (non montré). Ceci suggère que le défaut de production de ces progéniteurs à E12.5 est compensé par une sur-prolifération de ces mêmes progéniteurs aux stades suivants, comme décrit par Freret-Hodara et al.(2017).

Ces résultats suggèrent que la perte de fonction de *Cdc25b* avec la lignée *Emx1-Cre* réduit le nombre de progéniteurs plus tôt dans le développement qu'avec la lignée *Nestin-Cre*, et que ce défaut est ensuite compensé par le système. Toutefois le nombre d'embryons utilisés pour certaines analyses n'est pas toujours suffisant d'un point de vue statistique, ces résultats sont donc encore préliminaires et vont nécessiter un examen plus approfondi.

C.2 Mise au point d'un outil pharmacologique pour moduler la longueur de la phase G1

Nos données montrent que la perte de fonction de *Cdc25b* rallonge la phase G2 mais induit aussi un raccourcissement de la phase G1 et M. En parallèle, on observe d'une dérégulation du ratio de progéniteurs basaux. Afin de déterminer si c'est le raccourcissement de la phase G1 qui est responsable de ce phénotype, nous avons testé une stratégie de sauvetage, en bloquant le raccourcissement de la G1 avec un outil pharmacologique. Nous utilisons le Palbociclib (PD-0332991), un inhibiteur des CDK4/6, dont l'utilisation à une certaine dose permet de rallonger la phase G1 sans bloquer la transition G1/S (Hasenpusch-Theil et al., 2018). Dans cette étude, les auteurs administrent cette drogue par gavage dans des femelles gestantes à E13,5. Ils quantifient 24h plus tard le nombre de progéniteurs exprimant pRb^{Ser780} (une forme de Rb qui est phosphorylée par CDK4/6) et observent une réduction de pRb^{Ser780}, ce qui valide l'inhibition de CDK4/6 et donc le rallongement de la phase G1.

Nous avons traité les femelles gestantes de la lignée *Cdc25b^{nesKO}* avec du Palbociclib selon le même protocole (*cf* Matériel et Méthodes). Nous avons quantifié 24h plus tard les aRGs positifs pour pRb^{Ser780} et également pour Cycline D1 (afin d'estimer la proportion d'aRGs en phase G1) dans des embryons CTL et *Cdc25b^{nesKO}* non traités et des embryons CTL et mutants traités (CTL + Palbo, *Cdc25b^{nesKO}* + Palbo).

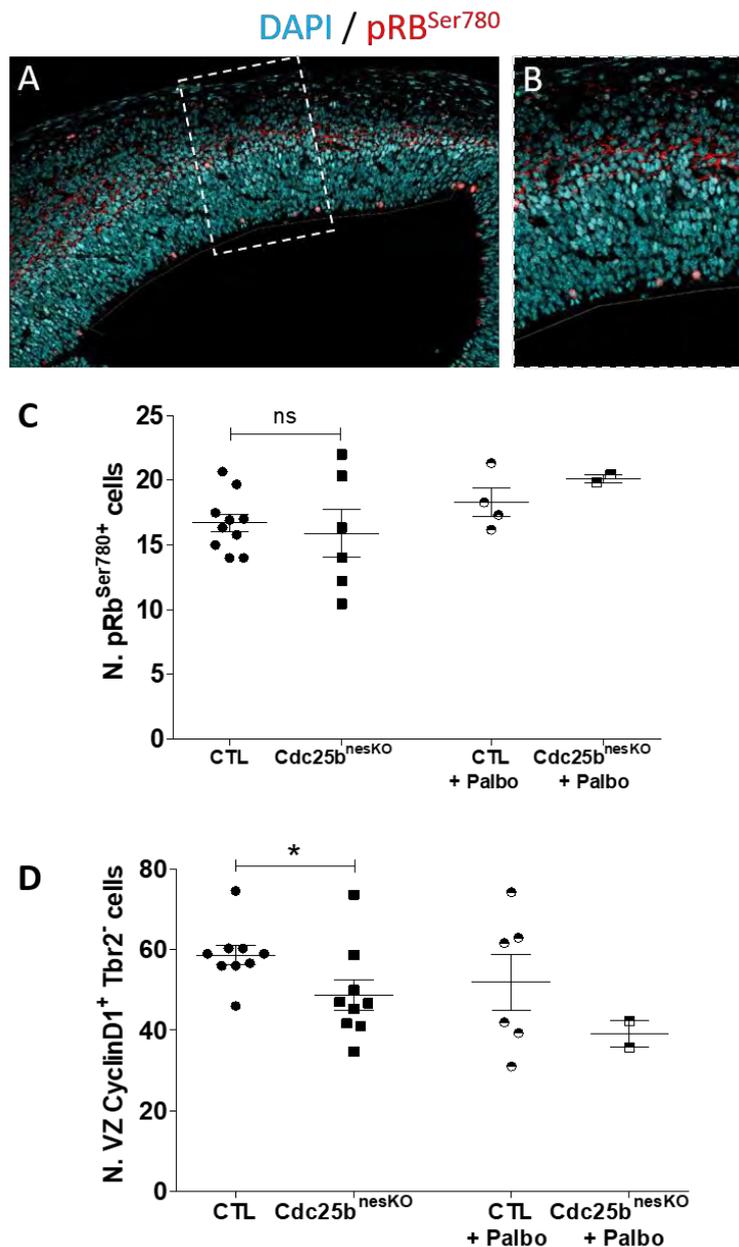


Figure 61 : L'administration de Palbociclib par gavage ne semble pas induire un rallongement de la phase G1. (A-B) Immunomarquage pRb^{Ser780} sur une coupe frontale de cerveau à E14,5. Zoom sur la partie médiale du cortex (B). **(C)** Nuage de points représentant le nombre de cellules apicales pRb^{Ser780+} par embryons dans les conditions CTL et Cdc25b^{nesKO} non traitées, et les conditions CTL et Cdc25b^{nesKO} traitées au Palbociclib. Quantification dans une fenêtre de 400 µm de large. Statistiques par modèle mixte. **(D)** Nuage de points représentant le nombre de cellules Cycline D1⁺ par embryons dans les conditions CTL et Cdc25b^{nesKO} non traitées, et les conditions CTL et Cdc25b^{nesKO} traitées au Palbociclib. Quantification dans une fenêtre de 130 µm de large. Statistiques par modèle mixte.

La **Figure 61C** montre que contrairement à ce qui est attendu, le nombre de cellules pRb^{Ser780+} n'augmente pas dans les embryons mutants (**Fig.61C, CTL vs Cdc25b^{nesKO}**). De plus les embryons CTL traités au Palbociclib, qui devrait avoir une phase G1 plus longue que les embryons CTL, n'ont pas moins de cellules pRb^{Ser780+} comparé aux CTL (**Fig.61C, CTL vs CTL +**

Palbo). Il semblerait donc que d'une part, le marquage pRb^{Ser780} ne soit pas un bon marqueur pour détecter une modification dans la longueur de la phase G1, et que d'autre part le traitement Palbociclib avec ce protocole n'affecte pas le taux de pRb^{Ser780+}.

Nous avons ensuite testé l'effet du traitement en quantifiant les aRGs Cycline D1⁺, qui pour rappel est diminué dans les embryons Cdc25b^{nesKO} en corrélation avec un raccourcissement de la phase G1 (**Fig.61D, CTL vs Cdc25b^{nesKO}**). Avec le traitement Palbociclib, on devrait s'attendre à une augmentation du nombre de cellules Cycline D1⁺ en corrélation avec un rallongement de la phase G1. Toutefois, nous n'observons pas de différences entre les embryons CTL et CTL + Palbo, mais plutôt une tendance à la diminution (**Fig.61D, CTL vs CTL + Palbo**). On retrouve cependant la même diminution du nombre de cellules Cycline D1⁺ dans les embryons Cdc25b^{nesKO} + Palbo comparé aux embryons CTL + Palbo diminution (**Fig.61D, CTL + Palbo vs Cdc25b^{nesKO} + Palbo**). Cette analyse montre que l'administration de Palbociclib par méthode de gavage ne semble pas rallonger la phase G1 dans les embryons CTL + Palbo par rapport aux embryons CTL. Nous testerons donc prochainement d'autres méthodes d'administration pour réaliser ces expériences de sauvetage.

Discussion

L'objectif de ce projet de thèse était de caractériser la fonction d'un régulateur de la phase G2 du cycle cellulaire, la phosphatase CDC25B, au cours de la neurogenèse chez les mammifères. J'ai regardé 1) si la fonction neurogénique de CDC25B – découverte dans le tube neural de poulet – est conservée dans la moelle épinière en développement chez la souris, et 2) si CDC25B régule également la neurogenèse dans le cortex en développement. Je vais discuter les résultats obtenus pour ces deux questions dans les deux parties suivantes.

A. Dans la moelle épinière de souris, *Cdc25b* régule la production des neurones dorsaux

Les précédents résultats de l'équipe, obtenus sur le modèle poulet, indiquaient que CDC25B promeut la neurogenèse, fonction assez inattendue pour un régulateur positif du cycle cellulaire. Nous voulions donc renforcer cette donnée en utilisant un modèle génétique. Pour répondre au premier objectif, j'ai analysé la neurogenèse spinale et les paramètres du cycle cellulaire dans un modèle murin de perte de fonction conditionnelle pour la phosphatase *Cdc25b* (*Cdc25b^{nesKO}*). Mes résultats montrent que comme attendu, **la perte de fonction de CDC25B rallonge la durée de la phase G2 sans affecter le taux de prolifération des progéniteurs spinaux et diminue la proportion de neurones**. Nos résultats sont en accord avec ceux déjà obtenus dans l'équipe sur le modèle poulet (Peco et al., 2012). En effet, nous observons une augmentation de la durée de la phase G2 d'environ 25 min. Nos résultats sur la prolifération sont aussi en accord avec ceux obtenus chez le poulet qui montrent que la perte de fonction de CDC25B affecte uniquement la longueur de la phase G2, sans modifier le taux de prolifération. Nous observons également une diminution significative du nombre de neurones.

Cependant, on peut noter des différences avec le modèle poulet. Premièrement, la proportion de divisions neurogéniques PN et NN n'est pas diminuée dans le tube neural murin (Bonnet et al., 2018). Il est possible que ce soit la transition PN vers NN qui soit affectée, or la lignée *Tis21-GFP* ne permet pas de différencier ces deux modes de division. Il est possible aussi que *Cdc25b* ne régule pas directement le mode de division des progéniteurs spinaux chez la souris, mais qu'il ait plutôt un rôle dans la maturation ou la spécification des progéniteurs vers le destin neuronal. De plus, le nombre de progéniteurs spinaux n'est pas augmenté en contrepartie de la diminution du nombre de neurones. Nous observons même une diminution faible mais significative de la densité cellulaire dans la zone ventriculaire. Bien que le taux de prolifération ne soit pas significativement modifié, on observe une tendance à la diminution (la fraction de cellules en phase S passe de 40% à 35,8% et l'index mitotique passe de 3,1 à 2,2%, respectivement dans les embryons CTL et mutants). Il est donc possible que la durée du cycle cellulaire soit légèrement ralentie, expliquant cette diminution. Comme nous l'avons fait dans le cortex, il serait nécessaire de mesurer précisément la durée du cycle dans les progéniteurs spinaux. De plus, nous pourrions modéliser mathématiquement nos observations pour voir si cette différence de prolifération entre les embryons contrôles et mutants pourrait expliquer la diminution des progéniteurs (densité -7%) et des neurones (quantité -25%) que nous

observons dans les tubes neuraux $Cdc25b^{nesKO}$ (Azaïs et al., 2018; Postel et al., 2019). Toutefois, il est peu probable que la diminution des neurones dorsaux – de l'ordre de 25% – soit seulement expliquée par une diminution de 7% de la densité des progéniteurs.

L'ensemble de ces résultats laisse penser que CDC25B régule la production des neurones spinaux chez la souris mais par un mécanisme différent de celui chez le poulet. Lorsqu'un progéniteur sort du cycle cellulaire, il passe par une étape de précurseur neuronal avant de se différencier en neurone dans la zone marginale. Dans les mutants $Cdc25b^{nesKO}$, la diminution du nombre de neurones dans la zone marginale pourrait être la conséquence d'un blocage au stade précurseurs, qui sont des cellules généralement situées du côté basal de la zone ventriculaire et qui exprime à la fois des marqueurs de progéniteurs (Pax7, Pax6) et de neurones précoce (Lbx1) (Gross et al., 2002). Des données préliminaires (non montrées) montrent que la proportion de cellules Lbx1 qui co-expriment Pax7 a tendance à augmenter dans les embryons $Cdc25b^{nesKO}$, ce qui suggère un blocage au stade précurseur neuronal. Un plus grand nombre d'échantillons devra être analysé pour confirmer cette hypothèse.

Comment expliquer cette différence de fonction de CDC25B entre le modèle poulet et murin ?

La perte de fonction chez le poulet a été réalisée de façon transitoire, par l'injection d'un ARNi contre CDC25B, alors que le gène est complètement délété et de façon pérenne dans notre modèle génétique. Il a été montré qu'un modèle génétique ne reflète pas toujours le phénotype observé avec un outil de « Knock-down » comme avec un ARNi ou un morpholino. Une étude récente montre que la mutation d'un gène peut induire la surexpression d'autres gènes, pouvant appartenir ou non à la famille du gène invalidé (El-Brolosy et al., 2019). Ce mécanisme induit une compensation, parfois complète, du défaut normalement induit par la perte de fonction. Il est donc difficile de comparer l'effet d'un KO et d'un KD, tout simplement car les deux méthodes ne sont pas équivalentes. De plus la délétion par ces deux stratégies n'a pas lieu dans la même fenêtre développementale et l'approche ARNi ne permet pas d'inactiver complètement $Cdc25b$, ce qui pourrait expliquer les différences que nous observons.

De plus, il faut noter que la phosphatase CDC25C n'existe pas chez le poulet. Ce gène est présent dans quasiment toutes les espèces de Vertébrés sauf chez les Néognathes, qui regroupent les Galliformes (poulet) et les Néoaves (oiseaux modernes) (**Fig.62**). Dans le règne des oiseaux, il est cependant présent chez les Paléognathes, et notamment chez l'autruche, le tinamou et le kiwi. Il semblerait qu'au moment de la séparation phylogénétique entre les deux sous-classes Paléognathes et Néognathes, le gène ait été « perdu ». On peut imaginer que

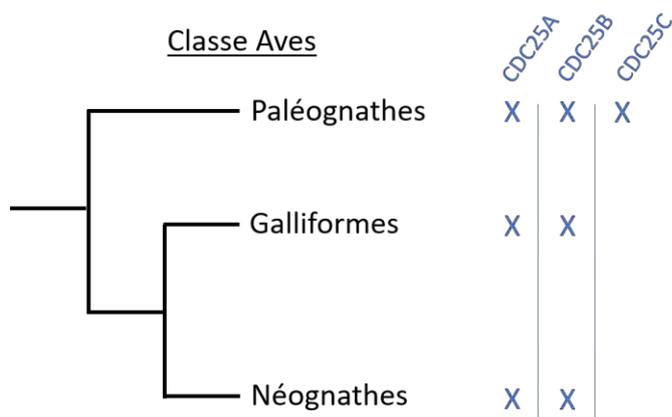


Figure 62 : Arbre phylogénétique simplifié de la Classe des oiseaux Aves. Indication de la présence des phosphatases CDC25s pour chaque sous-classe.

chez les Néognathes, CDC25B a récupéré la fonction neurogénique de CDC25C, alors que chez les autres Vertébrés, CDC25B et CDC25C se partagent cette fonction.

Afin de déterminer la part de la fonction de CDC25C dans la neurogenèse, plusieurs stratégies sont possibles. Dans la moelle épinière de souris, nous pourrions croiser notre lignée *Cdc25b^{fl/fl}* avec une lignée *Cdc25c KO* ou *fl/fl*, et voir si une double invalidation aggrave le phénotype sur la neurogenèse. Une

autre stratégie serait de voir si les deux gènes se complémentent chez l'oiseau. Nous pourrions regarder dans un modèle oiseau qui possède CDC25C, comme l'autruche (**Fig.62**), si CDC25B exerce toujours sa fonction neurogénique, ou si sa perte de fonction résulte en un phénotype correspondant à celui que nous observons chez la souris. De plus, il serait intéressant de coupler un gain de fonction de CDC25C à une perte de fonction de CDC25B dans le tube neural de poulet, afin de voir si CDC25C peut rattraper le défaut de neurogenèse induit par l'absence de CDC25B.

B. Dans le cortex murin en développement, *Cdc25b* régule le ratio de progéniteurs basaux par une modification de la longueur de la phase G2

B.1 Dans les mutants *Cdc25b^{nesKO}*, le nombre de bIPs est diminué alors que les bRGs sont augmentés

Le cortex est un tissu nerveux plus complexe que la moelle épinière, sa mise en place prend plus de temps et met en jeu une plus grande diversité de progéniteurs neuraux. L'objectif de la deuxième partie de cette thèse était de déterminer si *Cdc25b* régule également la neurogenèse corticale, et à quel niveau cellulaire.

Nos données montrent que **durant la corticogenèse, *Cdc25b* est majoritairement exprimé dans les aRGs**. Ce type de patron d'expression est retrouvé chez d'autres régulateurs du cycle cellulaire, comme Cycline D1 qui est spécifique des aRGs, alors que Cycline D2 est exprimé dans les bIPs (Glickstein et al., 2009). On peut également noter une expression poivre et sel de *Cdc25b* dans la zone ventriculaire, ce qui suggère une spécificité pour un sous-type de progéniteurs, et peut-être un mode de division. Il sera nécessaire de préciser ce patron avec des hybridations *in situ* plus résolutive, sur des coupes histologiques plus fines ou en utilisant une sonde fluorescente permettant une acquisition avec un microscope confocal.

L'invalidation de *Cdc25b* dans les progéniteurs neuraux (*Cdc25b^{nesKO}*) diminue les bIPs de 15%, alors que son gain-de-fonction augmente leur proportion au même stade. Dans les

deux cas, le nombre d'aRGs n'est pas affecté. Au moins deux mécanismes pourraient conduire à ce phénotype, i) une dérégulation de la transition $bIP > N$, avec une transition trop précoce dans le mutant, et à l'inverse un blocage au stade bIPs dans le gain-de-fonction, ii) un changement du destin des cellules issues des aRGs. Ces deux hypothèses s'accordent avec le fait que le nombre d'aRGs n'est pas modifié à la fois dans les expériences de perte et de gain-de-fonction. L'hypothèse i) est peu probable étant donné que Cdc25b ne semble pas exprimé dans les bIPs ; de plus on ne détecte pas d'augmentation de la production neuronale. L'hypothèse ii) sous-entend que d'autres populations cellulaires devraient être modifiées, en conséquence de la diminution de la production des bIPs. C'est le cas, puisque nous observons dans le mutant une augmentation des progéniteurs bRGs, eux aussi produits par les aRGs. Si les aRGs changent leur mode de division, quel pourrait être le mécanisme ?

Nos données suggèrent également que **dans les embryons Cdc25^{nesKO}, l'orientation des divisions des aRGs est modifiée, avec une augmentation des divisions obliques au dépend des divisions horizontales.** Plusieurs études montrent une corrélation entre les divisions obliques et la production de bRGs, et entre les divisions horizontales et la production de bIPs ou de neurones (Delaunay et al., 2017; LaMonica et al., 2013; Shitamukai et al., 2011; Wang et al., 2016a; Wong et al., 2015). La modification de l'angle de division que l'on observe dans les aRGs Cdc25b^{nesKO}, si elle est confirmée, pourrait expliquer ce changement de destin de aRG $> aRG + bIP$ ou $aRG > aRG + N$ vers $aRG > aRG + bRG$.

Dans ce cas, nous devrions donc aussi observer une diminution de la production des neurones au moment où nous observons la baisse de production des bIPs. De plus, la diminution des bIPs devrait résulter en une diminution des neurones. Or nos résultats montrent que **le nombre de neurones à E16,5 et la taille du cortex à P0 ne sont pas affectés dans le mutant Cdc25b^{nesKO}.** Cette absence de phénotype observable peut s'expliquer par un mécanisme de compensation. Contrairement aux bIPs, les bRGs peuvent s'auto-renouveler plusieurs fois avant de produire des neurones. La baisse de production neuronale des bIPs pourrait donc être compensée par une augmentation de la production des neurones issus des bRGs. Une autre possibilité, serait que les bIPs, suite à leur diminution, fasse une ou deux divisions de plus pour garder un bon taux de production neuronale. Nous avons mesuré le taux de prolifération à E14,5 dans les bIPs et nous observons une tendance non significative à l'augmentation. Il reste cependant possible que ce mécanisme se déroule à un stade plus tardif que nous n'avons pas encore analysé. Une preuve plus claire d'une diminution des divisions $aRG > aRG + N$, serait de quantifier les neurones produits directement par les aRGs. Dans (Wang et al., 2016b), les auteurs identifient un changement du mode de division des aRGs en quantifiant les cellules Pax6⁺, Tbr2⁺ et Tuj1⁺ (marquage neuronal précoce) dans la zone ventriculaire, afin de quantifier uniquement les cellules filles issus des aRGs. Il faudra de la même manière que nous quantifions les cellules Tuj1⁺ dans la VZ à E14,5 afin de déterminer si les aRGs produisent moins de neurones.

B.2 Le déroulement du cycle cellulaire est modifié dans les mutants Cdc25b

La perte de fonction de Cdc25b dans les aRGs ne modifie pas la durée totale de leur cycle cellulaire et leur prolifération, mais rallonge la phase G2 et raccourcit les phases G1 et M.

De plus, les mouvements intercinétiques en G2 sont ralentis en corrélation avec le rallongement de cette phase. Nous pouvons affirmer qu'il ne s'agit pas seulement d'un défaut de migration nucléaire mais bien d'un ralentissement de la durée de la G2. En effet, les progéniteurs bIPs – qui ne réalisent pas l'INM – ont aussi une phase G2 plus longue dans les embryons mutants. Ce phénotype est toutefois étonnant, puisque Cdc25b ne semble pas être exprimé dans les bIPs, ni même Nestin (Englund et al., 2005), excluant une recombinaison dans les bIPs. Toutefois, les bIPs étant issus des aRGs, ils devraient conserver l'inactivation de Cdc25b. Nos données suggèrent donc que les bIPs conservent les modifications du cycle cellulaire qu'ont subi les aRGs. De la même façon, l'expression de gènes temporo-dépendants (dont l'expression évolue entre E11 et E14) est « héritée » entre les aRGs et les bIPs (Okamoto et al., 2016).

Cdc25b n'est pas connu pour réguler la longueur de la G1, n'étant pas exprimé durant cette phase. Il existe par contre des mécanismes de compensation permettant la modification de la longueur d'une phase pour rattraper celle d'une autre, afin que la durée totale du cycle soit peu altérée. Les transitions G1/S et G2/M sont contrôlées via la régulation négative de E2F par CDK1/2. Le gène String, homologue de CDC25B chez la drosophile, exerce un rétrocontrôle négatif sur E2F en déphosphorylant CDK1 (Reis and Edgar, 2004). Le raccourcissement de la phase G1 mesuré dans le mutant Cdc25b^{nesKO} pourrait être dû à une suractivation de E2F et Cycline E, suite à la diminution de l'activité de CDK1.

Dans la moelle épinière, une partie de la fonction neurogénique de CDC25B est indépendante de son interaction avec CDK (Bonnet et al., 2018). **Nos expériences de gain-de-fonction montrent que dans le cortex, cette interaction est nécessaire à la fonction de Cdc25b sur la régulation du ratio de progéniteurs basaux.** Nous avons identifié des changements de la longueur des phases G2, G1 et M, qui pourraient être la cause du phénotype. Afin de déterminer quelle(s) phase(s) est (sont) en cause, notre stratégie est de tenter de corriger le phénotype, en empêchant soit le rallongement de la phase G2, soit le raccourcissement de la phase G1 dans les mutants Cdc25b^{nesKO}.

Dans les mutants Cdc25b^{nesKO}, le défaut de transition aRG > bIP est associée à un raccourcissement de la phase G1. Nous avons tenté de réaliser un sauvetage du raccourcissement de la phase G1 en utilisant du Palbociclib, un inhibiteur des CDK4/6, par administration orale dans des femelles gestantes à E13,5 (Hasenpusch-Theil et al., 2018). L'analyse des embryons 24h plus tard montre que, contrairement à ce qui est attendu, le nombre de cellules en phase G1, quantifié par le nombre d'aRGs exprimant Cycline D1, n'est pas diminué dans les embryons CTL + Palbo comparés aux embryons CTL d'une portée non traitée. Cette donnée nous informe que soit la dose administrée n'est pas suffisante, soit le fait de comparer entre eux des embryons de portées différentes (traité vs non traité) induit un biais. En effet, nous savons que la corticogénèse est un processus dynamique, ainsi deux

portées différentes n'ont pas exactement le même stade et donc le même nombre de cellules dans la VZ. Pour s'affranchir de ce biais, notre deuxième stratégie sera d'utiliser le Palbociclib sur des cultures de tranches de cerveaux d'embryons issus d'une même portée (Baffet et al., 2015).

Les données de la littérature montrent cependant que le raccourcissement de la phase G1 est plutôt associé à une augmentation/accumulation des bIPs (Artegiani et al., 2011; Lange et al., 2009a; Lim and Kaldis, 2012; Pilaz et al., 2009). Ces données suggèrent que la réduction des bIPs que nous observons dans le mutant *Cdc25b^{nesKO}* n'est pas due à la modification de la G1, mais plutôt à l'augmentation de la durée de la phase G2, ou le raccourcissement de la phase M. Le rallongement de la phase G2 a été associé à une augmentation de la différenciation (Lin and Lee, 2016; Peco et al., 2012; Saade et al., 2013). Ce pourrait donc être la cause du phénotype que nous observons dans le cortex. Des outils pharmacologiques sont disponibles, tel que le PD166285 qui inhibe les régulateurs négatifs de CDK1 Wee1 et MyT1, et permettront de raccourcir la G2 dans les mutants pour voir si ce raccourcissement suffit à corriger le défaut de nombre de progéniteurs basaux. Enfin, Huttner et coll. notent que la durée de la mitose est plus courte dans les bIPs par rapport aux aRGs (Arai et al., 2011). Toutefois, le rallongement de la mitose dans les aRGs d'un mutant *Magoh* diminue les divisions générant des bIPs (Pilaz et al., 2016), suggérant que la mitose n'est pas non plus en cause dans notre phénotype, puisque dans nos mutants, la mitose est au contraire légèrement plus courte.

B.3 Hypothèse concernant le mécanisme d'action de *Cdc25b* durant la neurogenèse
Dans la moelle épinière et dans le cortex en développement, *Cdc25b* semble réguler la maturation des progéniteurs neuraux. Plusieurs mécanismes d'actions moléculaires peuvent aboutir à cette fonction.

B.3.1 Par les voie de signalisation

Une première hypothèse est que *Cdc25b* régule la neurogenèse via l'activité de voies de signalisation.

L'étude plus approfondie des mutants *Cdc25b^{nesKO}* pourrait nous apporter des réponses sur cette hypothèse. En effet, dans la région dorsale du tube neural, les neurones de la Classe B sont produits indépendamment des voies BMP et Wnt, contrairement aux neurones de la Classe A, plus dorsaux. En regardant si la perte de fonction de *Cdc25b* affecte la production des neurones de la Classe B *Lbx1⁺* (qui ne sont pas sous l'influence de BMP/Wnt), nous pourrions déterminer s'il agit via la modulation de ces voies de signalisation.

Nos données dans le cortex suggèrent que le rallongement de la phase G2 pourrait être responsable de la modification du ratio de BPs. Afin de déterminer les mécanismes moléculaires qui entrent en jeu durant cette phase, il faudrait réaliser un transcriptome à partir d'aRGs d'embryons CTL et *Cdc25b^{nesKO}*, triés en phase G2. Cette analyse permettrait de déterminer les gènes qui sont différentiellement exprimés suite à la perte de fonction de *Cdc25b* durant la phase G2.

Nous pouvons cependant proposer des hypothèses sur les mécanismes potentiels impliqués à partir de ce qui est connu dans la littérature.

Il a été décrit que l'activité des voies de signalisation, comme les voies Notch ou Wnt, est

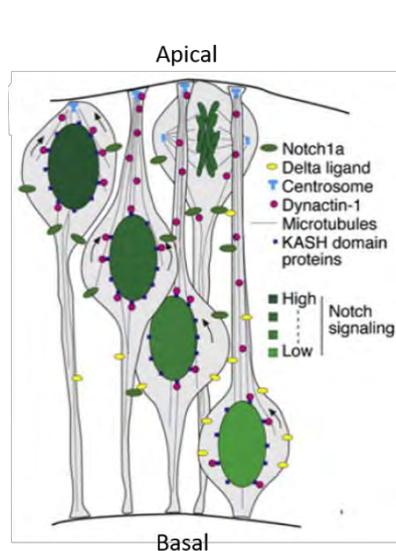


Figure 63 : La voie Notch est activée dans la zone ventriculaire de la rétine selon un gradient apico-basal. (Del Bene et al., 2008)

régulée au cours du cycle cellulaire et de l'INM. Dans la rétine de poisson zèbre, la présence forcée des noyaux des progéniteurs dans la partie basale du neuroépithélium (via la délétion de la protéine motrice dynactin1) augmente le nombre de divisions neurogéniques (Del Bene et al., 2008). A l'inverse, lorsque les noyaux passent plus de temps dans la partie apicale de la zone ventriculaire corticale, (suite à l'invalidation de la protéine motrice Kif1a), ils diminuent leurs divisions neurogéniques (Carabalona et al., 2016). Plusieurs études décrivent un gradient apico-basal d'activité de la voie Notch : le récepteur est plus exprimé par les cellules dont le noyau est en basal, alors que les noyaux en apical expriment le ligand Delta (**Fig.63**) (Del Bene et al., 2008; Murciano et al., 2002). Selon la position du noyau de la cellule, celle-ci va donc plus s'orienter vers un destin prolifératif ou neurogénique. Dans notre mutant $Cdc25b^{nesKO}$, le ralentissement de l'INM pendant la phase G2 fait que les noyaux restent moins longtemps dans la partie apicale du ventricule, ce qui pourrait

diminuer leur contact avec le récepteur Notch et donc diminuer les divisions différenciatives, c'est-à-dire produisant des bIPs et des neurones. Des données récentes de l'équipe soutiennent cette hypothèse. Le gain-de-fonction de CDC25B dans le tube neural de poulet induit un détachement rapide du noyau du progéniteur de la surface du ventricule (Bonnet et al., 2018). Ainsi, le noyau serait moins longtemps en contact avec les signaux prolifératifs Notch, ce qui promouvrait le destin neurogénique.

La voie Wnt est également plus active pendant la phase G2 (Davidson et al., 2009), puisque la phosphorylation de LRP5/6 est induite par le complexe CDK14/Cycline Y en G2. Les effecteurs de la voie Wnt, Dvl, Axine et GSK3 sont localisés au centrosome, et participent entre autres à la nucléation, à l'assemblage et à l'orientation du fuseau mitotique (Stolz et al., 2015). Une hypothèse concernant le mécanisme moléculaire d'action de $Cdc25b$ est donc que le rallongement de la phase G2 augmente l'activité de la voie Wnt, ce qui augmenterait les divisions obliques, menant ainsi à l'augmentation du nombre de bRGs au détriment des bIPs.

La voie Shh pourrait également être en cause. De nombreuses études montrent que Shh promeut la prolifération et l'expansion des progéniteurs basaux sans affecter le nombre d'aRGs (Hasenpusch-Theil et al., 2018; Komada et al., 2008b; Shikata et al., 2011; Wang et al., 2011, 2016b; Yabut et al., 2015). De plus, si l'activation constitutive de la voie Shh augmente la prolifération et donc comme attendu le nombre de bIPs, en réalité leur production par les aRGs est diminuée (Wang et al., 2016b). De plus, les auteurs observent une augmentation des

divisions obliques (de 15 à 42%) et non apicales, et de la production des bRGs. On peut noter que dans l'étude de Wong et al. (2015), la production des bIPs par les aRGs est également diminuée, toutefois les auteurs observent une augmentation de nombre de bIPs dans la SVZ, qu'ils attribuent à une augmentation de leur auto-renouvellement. Nous avons aussi observé une tendance à l'augmentation de la prolifération des bIPs à E14,5, bien qu'elle ne soit pas significative. CDC25B étant une cible transcriptionnelle indirecte de Shh (Bénazéraf et al., 2006), il est tentant de penser que CDC25B soit également en amont de Shh, dans une boucle de rétrocontrôle. Explorer cette hypothèse nécessitera des expériences d'épistasies.

Il est connu que l'expression de Pax6 est plus élevée au cours de la phase G2 (Hsieh and Yang, 2009). Le maintien de l'expression de Pax6 dans les aRGs Tis21⁺ (c'est-à-dire qui produisent des bIPs et des neurones) mène à une diminution de la production des bIPs au dépend de celle des bRGs (Wong et al., 2015). Ce déséquilibre du ratio des bPs est associé à une altération du plan de clivage, avec une augmentation des divisions obliques de 9% à 17%. L'étude de Lopes and Casares (2015) dans la rétine en développement de drosophile, montre que Cdc25/string est une cible transcriptionnelle de Pax6/Eyeless, et coordonne la prolifération avec la différenciation par une boucle de rétrocontrôle. Dans le cortex en développement, Cdc25b pourrait de la même façon réguler la production des bPs via une boucle de rétrocontrôle avec Pax6. Dans ce cas, on devrait voir une augmentation de l'expression de Pax6 dans la zone ventriculaire des embryons Cdc25b^{nesKO}. Nous n'observons pas d'augmentation de nombre de cellules Pax6⁺, mais sachant que les aRGs peuvent être distingués par une expression Pax6-fort / Pax6-faible, il faudrait analyser plus en détail le niveau d'expression de Pax6 dans les aRGs des embryons mutants.

B.3.2 Par la régulation du centrosome

Comme je l'ai décrit dans l'introduction (*cf* Chapitre 1 – Partie D.1.1), le centrosome régule l'orientation du plan de clivage, la symétrie de la taille des deux pôles du fuseau et de la répartition des composants cellulaires dans les cellules filles. Tous ces paramètres régulent le destin cellulaire. Plusieurs études *in vitro* ont montré que CDC25B, de par sa localisation au centrosome, est impliquée dans son cycle de maturation (Boutros and Ducommun, 2008; Boutros et al., 2007b, 2013). La surexpression de CDC25B promeut sa formation et sa stabilisation. De plus, la protéine CDC25B ainsi que ses régulateurs CHK1 et WEE1 et son substrat CDK1 sont répartis de manière asymétrique aux deux centrosomes (Boutros and Ducommun, 2008). Nous ne connaissons pas la localisation subcellulaire de CDC25B dans les progéniteurs neuraux. Toutefois, on peut imaginer qu'une répartition asymétrique de CDC25B au centrosome des aRGs, ou son absence, puisse déréguler l'orientation des divisions dans nos mutants Cdc25b. La protéine du centrosome Kizuna a été récemment identifiée comme étant un nouveau substrat de CDC25B (Thomas et al., 2014). CDC25B déphosphoryle et déstabilise Kizuna, ce qui entraîne des défauts mitotiques importants (multiplication du fuseau mitotique, mauvais alignement des chromosomes). Toutefois, des expériences de l'équipe réalisées dans le tube neural de poulet suggèrent que la fonction neurogénique de

CDC25B ne passe pas par cette protéine. Néanmoins nous devons explorer l'interaction fonctionnelle de Kizuna et de CDC25B dans le cortex.

Dans le cortex de souris, la surexpression de Cdc25b a été associée à des défauts du fuseau mitotique. Dans des souris microcéphaliques, la perte de fonction de Mcph1^{-/-}, induit un switch précoce des divisions symétriques prolifératives vers des divisions asymétriques neurogéniques. En parallèle, l'invalidation de Mcph1 diminue la localisation de CHK1 au centrosome, ce qui active précocement Cdc25b et donc CDK1. L'entrée prématurée en mitose est découplée de la maturation du centrosome, ce qui affecte la mise en place du fuseau et l'alignement des chromosomes. La répression *in vitro* de Cdc25b dans ce contexte corrige les défauts au niveau du plan de division. (Gruber et al., 2011). De plus, nos propres analyses suggèrent que le plan de division est altéré dans les mutants Cdc25b^{nesKO}. Il serait donc intéressant de voir si la perte de fonction de Cdc25b dans le contexte Mcph1^{-/-}, en croisant nos souris Cdc25b^{nesKO} avec les souris Mcph1^{-/-}, est suffisante pour corriger le phénotype de microcéphalie.

B.3.3 Par d'autres substrats

Dans la moelle épinière, une partie de la fonction neurogénique de CDC25B est indépendante de son interaction avec CDK (Bonnet et al., 2018b). Sa fonction phosphatase est cependant nécessaire, ce qui suggère que dans le tube neural CDC25B régule la neurogenèse en déphosphorylant (directement ou non) de nouveaux substrats. Dans le cortex, bien que la fonction cycle de CDC25B soit nécessaire pour réguler le ratio de BPs, on ne peut pas exclure que CDC25B interagisse également avec d'autres substrats.

Les possibilités d'interacteurs sont nombreuses : des composants de voies de signalisation comme LRP6 dans la voie Wnt, des facteurs de transcription comme Ngn2 ou Ascl1 dont le niveau de phosphorylation est corrélé à leur activité (Ali et al., 2011; Hindley et al., 2012). Dans le but d'identifier de nouveaux partenaires, l'équipe a récemment réalisé un interactome à partir d'une banque de peptides issus du cerveau d'embryon de souris à E14,5, en utilisant comme appât la forme CDC25B^{ΔCDKAP}. L'analyse préliminaire montre une grande diversité fonctionnelle parmi les gènes candidats. On retrouve par exemple des composants du cytosquelette, du nucléosome ou des régulateurs de la chromatine, connus pour être impliqués dans des défauts de neurogenèse. Une analyse fonctionnelle approfondie va être nécessaire pour décrypter leur implication dans la fonction neurogénique de CDC25B.

C. Éléments pouvant atténuer le phénotype dans les embryons Cdc25b^{nesKO}

En dépit de la significativité de nos résultats avec les mutants Cdc25b^{nesKO}, il est possible que différents facteurs puissent atténuer l'amplitude du phénotype que nous observons sur la quantité de BPs.

C.1 Variabilité du fond génétique

On peut d'abord noter une variabilité dans l'amplitude du phénotype entre les embryons mutants, qui peut réduire sa significativité. Une partie de cette variabilité inter-embryons est due à la mixité du fond génétique. En effet, chaque embryon est un individu unique qui

possède une combinatoire de mutations, pouvant plus ou moins affecter la pénétrance du phénotype induit par l'inactivation de *Cdc25b*. On sait aussi que chez la souris, il est difficile d'obtenir des portées d'embryons ayant exactement le même stade développemental, et qu'au sein d'une même portée, le stade peut être différent d'un embryon à l'autre. Or la corticogénèse est un processus dont la temporalité est extrêmement dynamique, des différences de quelques heures pouvant significativement affecter le nombre de cellules dans le tissu. Pour s'affranchir de cette variabilité, propre au modèle génétique souris, nous avons analysé un grand nombre d'embryons par condition et par analyse. Nous avons également développé, en collaboration avec des mathématiciens, un modèle mixte qui prend en compte cette variabilité et l'exclut.

C.2 Compensation génétique

La relative faiblesse du phénotype peut également être expliquée par des mécanismes de compensation génétique, par les deux autres membres des phosphatases CDC25s, *Cdc25a* et *Cdc25c*, qui sont également exprimés dans le tube neural et le cortex de souris (**Fig.64**).

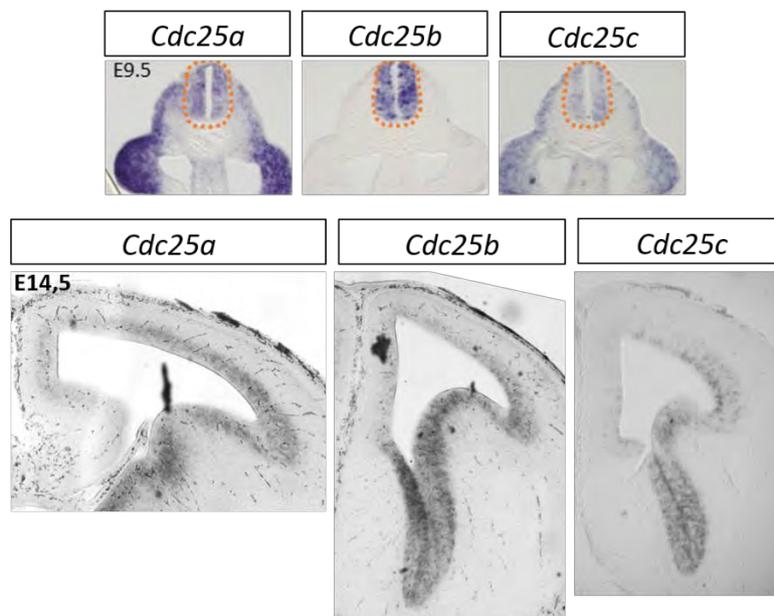


Figure 64 : Hybridation in situ de chaque phosphatase Cdc25 dans le tube neural murin (coupes transversales au niveau brachial à E9,5) et dans le cortex cérébral (coupes frontales à E14,5)

En effet, il existe une redondance fonctionnelle entre les gènes d'une même famille. Les phosphatases CDC25s n'échappent pas à cette règle, notamment au niveau de leur fonction cycle cellulaire.

La perte de fonction de CDC25B ou de CDC25A résulte en un retard de transition en mitose mais n'arrête pas le cycle, contrairement à l'inhibition des deux gènes à la fois, montrant leur coopération fonctionnelle (Boutros et al., 2006). Des cellules MEFs isolées de souris Knockout pour CDC25B et/ou CDC25C ne présentent pas d'anomalie dans la progression du cycle cellulaire (Ferguson et al., 2005). La présence de CDC25A est suffisante à elle seule pour

répondre aux dommages à l'ADN et permettre des divisions cellulaires normales. Ces données démontrent la plasticité génomique et la redondance fonctionnelle unique des régulateurs du cycle. Ces gènes ont évolué à partir d'un gène ancestral commun pour remplir des fonctions plus spécifiques, mais restent capables d'accomplir des fonctions génériques partagées par tous les membres de la famille. En effet, dans un système eucaryote plus ancien, *S.pombe*, le gène CDC25 est capable d'activer tous les complexes Cycline-CDK requis pour la progression du cycle cellulaire et porte ainsi la fonction de toutes les CDC25s des Vertébrés. (Boutros et al., 2007a). Néanmoins, la présence de trois phosphatases distinctes chez les Vertébrés suggère que les CDC25s ont acquis des spécificités fonctionnelles au cours de l'évolution.

CDC25 A et C sont également exprimés dans les tissus nerveux, ainsi que dans d'autres tissus en développement chez la souris. Cette expression ubiquitaire semble indiquer un rôle général dans la prolifération, mais on ne peut pas exclure que ces phosphatases puissent également avoir des fonctions plus spécifiques dans la neurogenèse, et donc compenser la perte de fonction de CDC25B. De plus, contrairement à la moelle épinière, le patron d'expression de Cdc25a et Cdc25c dans le cortex est spatialement similaire à celui de Cdc25b : leur expression suit la dynamique temporelle de la corticogenèse (**Fig.61**). Leur participation dans la corticogenèse est peut-être plus importante que dans la neurogenèse spinale.

Cette hypothèse est soutenue par le fait que d'autres modèles d'inactivation des phosphatases CDC25B et/ou C par Knockout chez la souris ont déjà décrit. Cependant, les auteurs n'ont pas décrit de défauts majeurs dans le développement de ces souris, qui sont viables.

Dans le cortex, il serait intéressant de réaliser par électroporation *in utero*, une perte de fonction de Cdc25c seul ou en complément de Cdc25b avec des ARNi dirigés contre *Cdc25b* et *Cdc25c*, et voir si le phénotype que nous observons en perte de fonction de Cdc25b seule est aggravé.

C.3 Efficacité de la lignée *Nestin-Cre* et comparaison avec la lignée *Emx1-Cre*

Une autre hypothèse expliquant le faible phénotype des mutants *Cdc25b^{nesKO}* concerne l'efficacité de recombinaison de la Cre recombinase placée sous le contrôle du gène Nestin.

Nous savons que dans la moelle, *Cdc25b* est bien invalidé avec la lignée Nestin-Cre dès le stade E10 puisqu'il n'y a plus du tout de transcrit. Dans le cortex, l'utilisation de la lignée *Rosa-Tomato* montre que le gène commence à être délété à partir de E10,5. Toutefois on ne connaît pas le niveau d'efficacité de la recombinaison dans ce tissu. L'étude de Liang et al. (2012b) ont montré que la lignée *Nestin-Cre* induit une recombinaison faible ou mosaïque dans les progéniteurs, et qu'il faut les stades tardifs (après E16,5) et post-natal pour que le gène soit complètement invalidé.

Afin d'explorer cette hypothèse, nous avons croisé nos souris *Cdc25b^{fl/fl}* avec une lignée *Emx1-Cre*, décrite pour induire une recombinaison totale plus tôt et plus complète, à partir du stade E10,5 dans le télencéphale dorsal (Gorski et al., 2002; Liang et al., 2012b). Nous avons comparé

le phénotype observé dans les mutants $Cdc25b^{nesKO}$ à celui observé dans les mutants $Cdc25b^{emx1KO}$. La **figure 62** résume l'évolution du nombre de cellules au cours du temps, dans les embryons $Cdc25b^{nesKO}$ et $Cdc25b^{emx1KO}$ comparés à leurs contrôles respectifs.

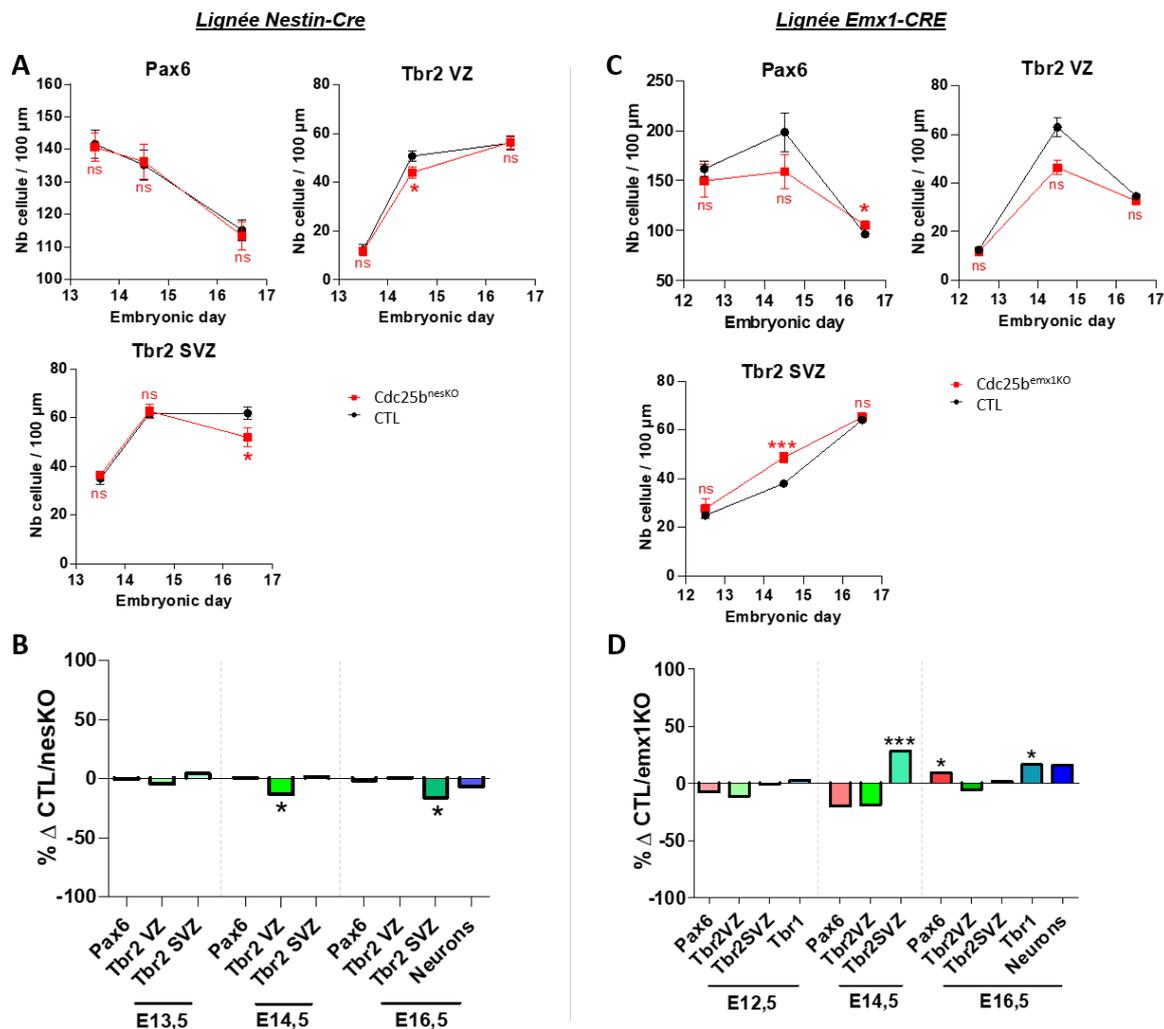


Figure 65 : Progression temporelle du phénotype observé en croissant les souris $Cdc25b^{fl/fl}$ avec la lignée *Nestin-Cre* ou la lignée *Emx1-Cre*. (A,C) Nombre moyen de cellules Pax6, Tbr2 dans la VZ, Tbr2 dans la SVZ pour 100 µm, à E13,5 – E14,5 et E16,5 pour les embryons CTL vs $Cdc25b^{nesKO}$ (A) et à E12,5 – E14,5 et E16,5 pour les embryons CTL vs $Cdc25b^{emx1KO}$ (C). (B,D) Pourcentage de différence du nombre de cellules Pax6, Tbr2 VZ, Tbr2 SVZ, Tbr1 ou Neurones totaux, entre les CTL et les mutants aux différents stades. Statistiques avec modèle mixte.

La perte de fonction de $Cdc25b$ par la lignée *Nestin-Cre* n'induit le déséquilibre des BPs qu'à partir du stade E14,5 et durant 24h seulement, puisqu'à E16,5 le nombre de bIPs dans la zone ventriculaire des embryons mutants est de nouveau similaire aux embryons CTL. Pourtant, $Cdc25b$ est exprimé dans les aRGs dès le stade E10,5. Son invalidation avec la lignée *Nestin-Cre* induit donc un phénotype dans une fenêtre temporelle précise.

L'analyse des mutants $Cdc25b^{emx1KO}$ montre une tendance à la diminution des progéniteurs à E12,5, soit plus tôt dans le développement que dans les mutants $Cdc25b^{nesKO}$. On observe une

augmentation des bIPs et des aRGs, respectivement 2j et 4j plus tard, qui est potentiellement dû à une augmentation de la prolifération. Dans l'étude de Hasenpusch-Theil et al.(2018), les auteurs observent également un raccourcissement du cycle cellulaire et une diminution du nombre de bIPs à E11,5 dans un mutant Gli3 et l'effet inverse 24h plus tard. De la même façon, en réponse à la diminution de production des bIPs par les aRGs (suite au KO de Gli3R), les bIPs dans la SVZ augmentent transitoirement leur prolifération (Wang et al., 2011). D'après Freret-Hodara et al.(2017), le cortex est un système robuste, qui peut détecter des défauts de son développement (comme par exemple une mort neuronale anormale) et peut contre balancer cet effet en augmentant la prolifération des progéniteurs.

Les données obtenues avec ces deux lignées suggèrent que la lignée *Emx1-Cre* induit un phénotype – une diminution des progéniteurs aRGs et bIPs – plus tôt et plus fortement qu'avec la lignée *Nestin-Cre*. Ces résultats préliminaires restent à confirmer avec plus d'embryons, notamment à E12,5. Ce phénotype fort semble être compensé par une augmentation de la prolifération à E14,5, stade auquel on commence à voir une diminution de la production des bIPs dans les mutants *Cdc25b^{nesKO}* (**Fig.62**). Cela suggère un décalage temporel du phénotype entre les deux lignées, qui résulterait de la différence de leur efficacité de recombinaison. Afin de déterminer dans nos expériences à quel moment le transcrit *Cdc25b* n'est plus du tout présent dans le cortex, nous devons réaliser des hybridations *in situ* dans les embryons *Cdc25b^{nesKO}* et *Cdc25b^{emx1KO}* à différents stades. De plus suivant cette hypothèse, nous devrions observer une augmentation de la prolifération des bIPs dans les embryons *Cdc25b^{nesKO}* à des stades plus tardifs comme E15,5 ou E16,6.

D. Importance de l'interaction de CDC25B/CDK1 dans la régulation de la neurogenèse

Au cours de ma thèse, j'ai exploré la fonction de *Cdc25b* dans deux tissus du SNC chez la souris : la moelle épinière et le cortex cérébral en développement. Dans le tube neural de poulet, l'interaction de CDC25B avec CDK1 est en partie non nécessaire à la régulation de la neurogenèse. Dans le cortex, nos données montrent que cette interaction est nécessaire pour réguler le ratio de BPs. Comment expliquer cette différence mécanistique entre la moelle épinière et le cortex ?

Bien que ces deux tissus appartiennent au système nerveux central, ils sont mis en place à différents moments du développement, n'ont pas la même complexité cellulaire et auront chez l'adulte des fonctions bien différentes. Il existe donc des différences moléculaires subtiles, intrinsèques et épigénétiques entre les progéniteurs neuraux des différentes régions du SNC. Les progéniteurs peuvent répondre différemment aux signaux moléculaires. Par exemple, les progéniteurs du mésencéphale répondent à l'inactivation de la GTPase RhoA par une augmentation de la prolifération, alors que ceux de la moelle épinière prolifèrent moins (Paridaen and Huttner, 2014). Au sein même du télencéphale, les différentes zones ne répondent pas de la même manière : dans les souris mutantes *Shh^{-/-} Gli3^{+/-}*, les progéniteurs basaux du cortex (télencéphale dorsal) prolifèrent moins et sortent à un taux plus élevé le cycle cellulaire, alors que dans l'éminence ganglionnaire latérale (télencéphale ventral), les progéniteurs prolifèrent plus et restent dans le cycle (Shikata et al., 2011).

Toutefois, cette différence de mécanistique d'action de CDC25B (CDK1 dépendant/indépendant) pourrait être due également à la différence d'espèce (cf A.1), présence de la phosphatase CDC25C), et non à une différence tissulaire.

Pour explorer cette question, nous pourrions utiliser le cerveau de poulet et la moelle épinière de souris comme outils de comparaison. Premièrement, il faudrait déterminer dans le tube neural murin, si l'interaction de Cdc25b avec CDK1 est nécessaire au phénotype que nous observons. Deuxièmement, nous pourrions étudier la fonction de CDC25B dans le cerveau de poulet, en réalisant des pertes ou des gains-de-fonction. Cela va-t-il moduler le nombre de cellules Tbr2⁺ comme dans le cortex murin ? Ou de neurones comme dans la moelle épinière de poulet ? Et quel est le rôle de la phase G2 dans ce contexte ?

E. Aspects évolutifs

L'ensemble de nos données sur la moelle épinière et le cortex suggèrent que CDC25B promeut la maturation des progéniteurs. Dans le tube neural, CDC25B promeut la transition de progéniteurs vers neurones (PP > PN > NN). Dans le cortex, CDC25B promeut les divisions générant des bIP/N au dépend des bRGs. La transition bRG > bIP/N est-elle une maturation d'un point de vue évolutif ? En effet, l'augmentation du nombre de bRGs est associée avec l'expansion du nombre de neurones et l'évolution du cortex.

Il faut garder à l'esprit qu'un bRG est un progéniteur ayant une morphologie gliale, exprime Pax6 et GFAP, réalise des divisions asymétriques et possède un fort potentiel prolifératif. Ces progéniteurs sont donc, malgré leur catégorisation de BP (due à leur localisation), plus proches, dans leurs caractéristiques, des aRGs.

Le fait que CDC25B promeuve les bIPs et les neurones – des cellules au potentiel prolifératif restreint – au dépend des bRGs, signifierait que CDC25B agit sur la différenciation cellulaire, avec un rapprochement des cellules vers la sortie du cycle, et une restriction progressive de la prolifération.

Pour explorer cette hypothèse, un bon modèle pour étudier le potentiel différenciatif de CDC25B serait le cortex de furet. Ce mammifère possède un cortex gyrencéphalique, dont la zone latérale est connue pour être riche en bRGs, et qui possède également un plus grand nombre de bIPs prolifératifs (qui font plusieurs cycles de divisions bIP/bIP avant de produire des neurones). Cdc25b est-il différenciellement exprimé dans les différentes zones du cortex de furet ? Et quelles seraient les conséquences de la perte de fonction de Cdc25b sur la production des bIPs neurogéniques vs prolifératifs dans cette espèce ? Regarder le patron d'expression de Cdc25b dans le cortex de furet, et faire des expériences de perte et de gain de fonction dans ce modèle pourrait nous apporter des réponses.

Conclusion

Ce projet de thèse a permis de mettre en évidence le rôle jusqu'à maintenant inconnu d'un régulateur de la transition G2/M, la phosphatase CDC25B, dans la régulation de la neurogenèse spinale et corticale chez les Mammifères.

En comparant les données obtenus dans les différents modèles – le tube neural de poulet, de souris et le cortex cérébral murin à différents stades et avec différentes stratégies d'inactivation de Cdc25b, j'ai observé que, selon le contexte, l'inactivation de Cdc25b ne conduit pas exactement au même phénotype. La neurogenèse est un processus dynamique, au cours duquel différents types de cellules sont produits, qui présente des degrés de complexité différents entre la moelle épinière et le cortex. De nombreuses données de la littérature soutiennent l'idée que modifier le comportement des cellules progénitrices à différents stades de leur maturation aura des conséquences différentes sur la production neuronale. Nos données suggèrent que Cdc25b a un rôle générique dans la maturation des progéniteurs neuraux, et que selon le contexte (temporel et spatial), son inactivation va produire des effets différents sur le devenir de ces progéniteurs, qui pourraient être portés par différentes fonctions cellulaires. Nous espérons ainsi que la diversité des approches que nous développons, nous permettra de révéler toutes les facettes de sa fonction cellulaire et moléculaire.

Plus généralement, ce projet a contribué améliorer les connaissances dans les mécanismes de régulation de la formation du système nerveux central. Cette étude permettra aussi de mieux comprendre comment la régulation de la dynamique du cycle cellulaire – processus commun à tous les tissus– est couplée à l'acquisition d'un destin cellulaire.

Matériel et Méthodes

Lignées génétiques murines

Les différentes lignées murines utilisées au cours de ce projet ont un fond génétique mixte, issu du croisement de 129S1/SvImJ et de C57BL/6J. Ces fonds sont adaptés pour l'étude du système nerveux car ils ne possèdent pas de mutations pouvant interférer avec le système étudié.

Lignées perte de fonction conditionnelle de CDC25B

Notre équipe a fait réaliser par l'institut Clinique de la souris (ICS, Illkirch, France), une souris portant un génome modifié à partir d'une construction dans laquelle les exons 4 à 7 du gène *Cdc25b* sont encadrés par des sites LoxP. Les différentes étapes de la construction sont présentées en Annexe 1 (Mansouri, 2001). En présence d'une Cre recombinase, les exons floxés seront excisés et la protéine *Cdc25b* traduite ne sera plus fonctionnelle.

Pour obtenir des individus invalidés conditionnellement pour le gène *Cdc25b*, ces souris sont croisées avec des souris exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du gène soit :

- Nestin, qui s'exprime dans l'ensemble des cellules souches du système nerveux (Tronche et al., 1999; Zimmerman et al., 1994)
- *Emx1*, qui s'exprime spécifiquement dans les progéniteurs du télencéphale dorsal (Gorski et al., 2002)

Les croisements réalisés sont les suivants :

$$\text{♀ } (Cdc25b^{+/-}; nesCre) \times \text{♂ } (Cdc25b^{fl/fl})$$

$$\text{♀ } (Cdc25b^{+/-}; emx1Cre) \times \text{♂ } (Cdc25b^{fl/fl})$$

Nous obtenons la descendance dans les proportions suivantes :

Tableau 1: Génotypes des embryons issus des croisements $(Cdc25b^{+/-}; nesCre) \times (Cdc25b^{fl/fl})$ et $(Cdc25b^{+/-}; emx1Cre) \times (Cdc25b^{fl/fl})$

Génotype	Pourcentage	Condition
$Cdc25b^{+/fl}; Cre$	25%	CTL
$Cdc25b^{-/fl}$	25%	CTL
$Cdc25b^{+/fl}$	25%	CTL
$Cdc25b^{-/fl}; Cre$	25%	$Cdc25b^{cKO}$

Pour chaque analyse, nous avons contrôlé l'absence d'effet de la présence de la Cre recombinase. Pour cela nous avons comparé les embryons contrôles possédant la Cre ($Cdc25b^{+/fl}; Cre$) à ceux ne possédant la Cre ($Cdc25b^{-/fl}$ et $Cdc25b^{+/fl}$). Nous n'avons pas détecté de différences significatives entre les deux types de contrôles que nous avons donc regroupés pour les comparer aux embryons mutants.

Lignée *Tis21-GFP*

Cette lignée Knock-In (*Tis21*^{-tm2(Gfp)^{Wbh}}) a été réalisée par le laboratoire de Wieland Huttner. Par recombinaison homologue, la séquence codante de l'exon 1 de *Tis21* a été remplacée par la séquence codant pour la GFP et possédant un signal de localisation nucléaire. Les souris homozygotes ne présentent pas de phénotype apparent, notamment au niveau du développement du système nerveux après analyse macroscopique (Haubensak et al., 2004).

Nous avons croisé ces souris avec notre lignée *CDC25*^{fl/fl} afin de réaliser les croisements suivants :

$$\text{♀ } (Cdc25b^{+/-} ; nesCre) \times \text{♂ } (Cdc25b^{fl/fl} ; Tis21-GFP/Tis21-GFP)$$

Nous obtenons ainsi la descendance dans les proportions (25% *Cdc25b*^{nesKO} – 75% CTL), et tous les embryons possèdent une copie de la séquence *Tis21-GFP*.

Lignée *Rosa-Tomato*

Cette lignée transgénique possède un rapporteur fluorescent Tomato placé en 3' d'une cassette Stop flanquée de deux sites flox. Lorsque cette lignée est croisée avec des souris possédant une séquence transgénique exprimant une Cre recombinase, l'observation d'une fluorescence révèle le moment et le domaine d'activité de la Cre recombinase.

Nous avons croisé ces souris avec notre lignée *Nestin-Cre* afin de réaliser les croisements suivants :

$$\text{♀ } (Cdc25b^{+/-} ; nesCre) \times \text{♂ } (Rosa-Tomato ; Rosa-Tomato)$$

Nous obtenons la descendance dans les proportions (50% *nesCre* ; *Rosa-Tomato* ; 50% *Rosa-Tomato*), ainsi la moitié des embryons exprime la fluorescence Tomato.

Détermination du génotype des embryons

Le génotype des embryons est obtenu par PCR à partir d'ADN génomique extrait des queues des embryons. L'ADN est amplifié en utilisant deux types d'amorces : trois oligonucléotides 359F, 364R, 358R pour amplifier *Cdc25b*, et 2 oligonucléotides CreF et CreR pour amplifier la séquence Cre. La taille des bandes obtenues par PCR est visualisée par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2%. Pour la PCR Cre, nous obtenons sur le gel un fragment d'une taille de 269 pb si l'embryon possède la recombinase, ou une absence de fragment dans le cas contraire. Pour la PCR *Cdc25b*, nous obtenons trois types de fragments : allèle floxé (fl) d'une taille de 229 pb, l'allèle sauvage (+) d'une taille de 173 pb ou l'allèle excisé (-) une taille de 306 pb.

Immunofluorescence

Les échantillons sont fixés dans une solution de formaldéhyde à 4% en PBS sur la nuit à 4°C, lavés en PBS. Pour l'étude de la moelle épinière, la partie thoracique du tube neural, environnant le membre supérieur, est incluse en agarose à bas point de fusion (5% en PBS). Le tube neural est coupé avec un vibratome Leica en sections transversales flottantes d'une épaisseur de 60 µm. Pour l'étude sur le cortex, les cerveaux sont inclus en paraffine à l'aide un robot d'inclusion (STP 120 Spin Tissue Processor). Les cerveaux sont coupés avec un

microtome (HM 355 Microtom) en sections frontales de 6 à 14 μm , et directement montées sur des lames histologiques adhésives. Les sections sont réhydratées dans des bains successifs d'Histoclear II (2 fois), 100% éthanol (2 fois), 95% éthanol, 70% éthanol, 50% éthanol et d'eau désionisée pendant 5 minutes chacun. Les sections sont ensuite chauffées dans du Citrate 1% H_2O à environ 100°C pendant 45 minutes.

La suite du protocole est similaire pour les sections flottantes (vibratome) et montées (paraffine). Les sections sont perméabilisées avec une solution de blocage pendant au minimum 1h, Bovine Serum Albumine (BSA) 3% + Horse Serum (HS) 1% en PBS 0,5% Triton (TR). Cette étape permet de perméabiliser les coupes et de bloquer les sites non spécifiques de toutes interactions indésirables avec les anticorps. Les sections sont ensuite incubées avec les anticorps primaires sur la nuit à 4°C. Les coupes sont ensuite lavées en PBS 0.1% Triton et incubées avec les anticorps secondaires pendant 2h à température ambiante. Pour le marquage BrdU, les coupes sont au préalable dénaturées avec du HCl 2N puis lavées $\text{Na}_4\text{B}_4\text{O}_7$ 0.1 M, avant d'être incubées avec les anticorps primaires. Les coupes sont ensuite conservées et imagées dans un milieu de montage Mowiol 4-88.

Tableau 2: Liste des anticorps primaires utilisés pour les immunofluorescence.

Antigène détecté	Isotype	Marque	Dilution
Pax7	Souris	Hybridoma bank	1 : 6
Pax2	Lapin	Covance	1 : 200
Tlx3	Cochon-d'Inde	C.Birchmeier Lab	1 : 100
Caspase 3 activée	Lapin	BD Biosciences	1 : 100
H3P	Lapin	Upstate Biotechnology	1 : 1000
DAPI	n/a	Life Technologies	1 : 1000
Pax6	Lapin	Covance	1 : 300
Pax6	Lapin	MBL	1 : 200
Tbr2	Rat	eBioscience	1 : 50
Satb2	Souris	Abcam	1 : 100
Tbr1	Lapin	Abcam	1 : 100
GFP	Poulet	Abcam	1 : 1000
RFP	Chèvre	SICGEN	1 : 100
BrdU	Souris	G3G4	1 : 400
γtubuline	Souris	Exbio	1 : 1000
Cycline D1	Lapin	ThermoFisher	1 : 200
pRb Ser780	Lapin	CST	1 : 100

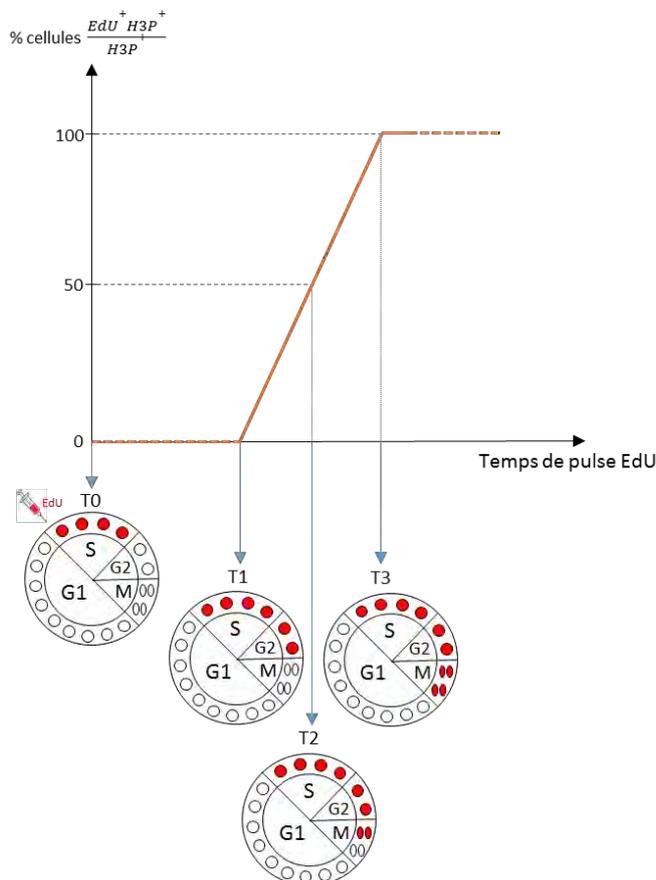
Hybridation in situ

Les hybridations in situ ont été réalisées à l'aide d'un robot automatisé InsituPro (INTAVIS AG), ou à la main suivant le même protocole. Les embryons sont au préalable fixés 48h dans une solution de PBS 4% PFA, à 4°C et coupés au vibratome (Leica VT1000S) en tranches de 60 μm

d'épaisseur. Les coupes sont traitées 5 min à la protéinase K puis post-fixées en 4%PFA, 0.1% glutaraldéhyde. Après une étape de pré-hybridation, les sondes ARN marquées à la digoxigénine sont incubées toute la nuit avec les coupes à 65°C. Les ARN-DiG sont ensuite révélés par immunomarquage avec un anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline. L'activité de la phosphatase alcaline est révélée par une solution de NTMT 0,45% NBT 0,35% BCIP, à obscurité jusqu'à que le signal soit développé.

Mesure des paramètres du cycle cellulaire

La longueur de la phase G2 est déterminée par le paradigme du pourcentage de mitose marquée (PLM) (Quastler and Sherman, 1959). Les femelles gestantes sont injectées en



intrapéritonéal avec 100 μ L de 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU, Click-iT EdU Alexa Fluor 647 Imaging Kit, Invitrogen) à 1mg/mL. Les embryons sont récoltés 120, 180, 240 ou 300 minutes après l'administration d'EdU. Le marquage EdU est révélé par une réaction chimique qui peut être visualisée par fluorescence à une longueur d'onde de 647 nm. Le pourcentage de cellules co-marquées $H3P^+EdU^+$ par rapport au nombre total de cellules $H3P^+$ est quantifié au cours des différents temps d'exposition à l'EdU. La progression de ce pourcentage est proportionnelle à la durée de la phase G2 et prend la forme d'une courbe à tendance sigmoïdale. La durée moyenne de la phase G2 T_{G2} correspond à la valeur en abscisse pour $Y = 50\%$:

$$f(TG2) = 50\% \frac{EdU + H3P +}{H3P +}$$

Figure 66: Estimation de la longueur de la phase G2 par la méthode du paradigme du pourcentage de mitose marquée. Les progéniteurs en phase S répliquent leur ADN et incorporent l'EdU. Ceux qui ont le temps de traverser la phase G2 et d'entrer en mitose après TX sont EdU^+H3P^+ . (Adapté de Lukasiewicz et al, 2005)

Pour déterminer le taux de prolifération cellulaire, les femelles gestantes ont été injectées en intrapéritonéal avec 1 mg/mL d'EdU. Les embryons sont récoltés 60 minutes plus tard.

La longueur totale du cycle cellulaire et de la phase S sont déterminées par la méthode décrite dans (Martynoga et al., 2005). Les femelles gestantes reçoivent en intrapéritonéal une

injection de 100 μ L d'EdU 10 mg/mL, suivi d'une injection de 100 μ L de 5-bromo-2'-désoxyuridine (BrdU, Sigma) à 10 mg/mL 90 minutes plus tard. Les embryons sont collectés 30 minutes plus tard. Les durées T_c and T_s sont calculées à partir des comptages de cellules EdU^+BrdU^- et EdU^+BrdU^+ .

Pour dater la production des neurones nouveau-nés (expérience de « birth-dating »), les femelles gestantes reçoivent une injection intrapéritonéale d'EdU à 5 mg/mL à E14,5 ou E16,5. Les embryons sont récoltés à la naissance (stade P0) et les cellules EdU^+ sont quantifiées.

Analyses par cytométrie de flux

Les hémisphères corticaux sont récoltés en PBS-1% FCS et les cellules sont mécaniquement dissociées à travers un tamis en nylon de 40- μ m nylon (Clearline). Les cellules sont resuspendues dans 1,2 mL de PBS froid et fixées en ajoutant progressivement sur vortex 3 mL d'éthanol 100% froid, pour obtenir une concentration finale de 70%. La procédure d'incubation avec les anticorps primaires et secondaires est la même que décrite dans la partie « Immunofluorescence ». Les cellules sont centrifugées entre chaque lavage à 2200 rpm pendant 10 min. Pour finir, les cellules sont resuspendues dans 500 μ L de PI/RNase (X) pendant 30 min à l'obscurité. L'acquisition est réalisée sur un CytotflexS avec un minimum de 1000 cellules post-fenêtrage avec le logiciel Cytexpert. Les débris et les doublets sont exclus à l'aide de paramètres morphométriques (FSC/SSC) et par mesure de la durée d'émission du fluorochrome PI, , respectivement. Pour établir le seuil d'expression positive de Pax6, Tbr2 et de la GFP, les échantillons contrôles sont incubés avec les anticorps secondaires et la solution de PI/RNase uniquement. Le contenu en ADN des aRGs est estimé en analysant l'intensité de l'émission de PI dans les cellules $Pax6^+Tbr2^-$.

Constructions ADN et électroporation in utéro

Les expériences d'électroporation in utero sont réalisées avec des femelles sauvages (fond mixte 129S1/SvImJ – 57BL/6J) gestantes à E13,5. Les embryons sont récoltés 28h plus tard. Pour le gain de fonction de la forme sauvage de CDC25B, nous avons utilisé un vecteur exprimant l'isoforme humaine hCDC25B3. Pour le gain de fonction de la forme mutée Δ CDK, nous avons utilisé hCDC25B3DCDK, dans laquelle le site RX_8Y de fixation à CDK n'est plus fonctionnel. Les différents isoformes sont placés sous le contrôle d'un élément cis-régulateur murin appelé pccRE, qui reproduit l'expression cycle-dépendante de CDC25B (Körner et al., 2001). Un vecteur contrôle contient le gène β Gal en aval de pccRE. Les vecteurs CDC25B et contrôle sont injectés à une concentration de 1,5 μ g/ μ L et sont co-électroporés avec un vecteur pCIG-GFP injecté à une concentration de 1 μ g/ μ L. L'électroporation est réalisée avec des électrodes de 3 mm, et nous appliquons cinq impulsions électriques de 35 V d'une durée de 50 ms, avec un intervalle de temps de 950 ms.

Avant l'opération, les femelles reçoivent une injection en sous-cutanée de 100 μ L de morphine à 2.5 mg/kg. Les souris sont anesthésiées sous isoflurane à 4% (air comprimé 1%, oxygène 1%) selon un dispositif d'anesthésie par voie pulmonaire adapté pour la souris. Après l'opération,

les souris reçoivent une injection en sous-cutanée de 100µL de métacam à 2 mg/ml. La toxicité de l'analgésique et de l'anesthésiant sur la longueur de la phase G2 a été évaluée par la méthode PLM et n'a pas montré d'effet.

Imagerie et analyses statistiques

Les photos des différents marquages par IF sur coupes embryonnaires ont été réalisées au microscope confocal Leica TCS SP8. Les images ont été prises par tranches optiques de 5 µm à un objectif de x40. Pour chaque expérience, au moins trois portées indépendantes et trois coupes différentes par embryons ont été analysées. Le nombre de cellules est quantifié à l'aide du logiciel ImageJ. Les données brutes des comptages sont traitées sur le logiciel Microsoft Excel. Les données quantitatives sont exprimées sous la forme de moyenne \pm s.e.m des coupes par embryons. Les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel Graph Pad Prism 5 ou R Studio. La significativité est évaluée en utilisant le t-test non-paramétrique de Mann-Whitney (MW, p-value : * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, n.s. non significatif), ou le modèle mixte (MM) suivi d'un test ANOVA (MM, p-value : * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, n.s. non significatif) (Bonnet et al., 2018a). Le modèle mixte (mixed effet model) est un modèle permettant d'analyser une Variable (le nombre de progéniteurs, de neurones, etc...) en prenant en compte à la fois l'effet fixe, ici le Genotype des embryons (contrôle ou CDC25B^{nesKO}) et les effets aléatoires, c'est-à-dire la variabilité induite par l'âge de la portée (Portee) et par le fond génétique de l'embryon niché dans la portée (Portee/Embryon). Les effets aléatoires sont exclus avec le logiciel R et la bibliothèque *nlme*, selon le script :

```
library(nlme)
Resultat.lme <- lme(Variable ~ Genotype , random=~1|Portee/Embryon, data = DATA,
method="REML")
```

Pour analyser l'effet de l'effet Genotype sur la Variable, nous utilisons ensuite un test statistique ANOVA (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, n.s. non significatif)

```
anova(Resultat.lme)
```

Mesure de l'orientation des divisions

Les marquages sont réalisés sur des coupes paraffines de 14 µm. Les centrosomes sont révélés par immunohistochimie avec un anticorps γ tubuline. Les noyaux en division avec H3P et la chromatine avec du DAPI. L'ensemble des noyaux d'une coupe sont imagés au microscope confocal Leica SP8 avec un Z optique de 0.5 µm. Les séries d'images sont importées dans le logiciel IMARIS qui permet une vision 3D des noyaux. Ceci permet de positionner exactement les centrosomes par rapport aux fuseaux mitotiques et par rapport à la bordure du ventricule. Chaque division est alors photographiée puis importée dans le logiciel Image J pour la mesure de l'angle entre l'axe des centrosomes et de la bordure du ventricule.

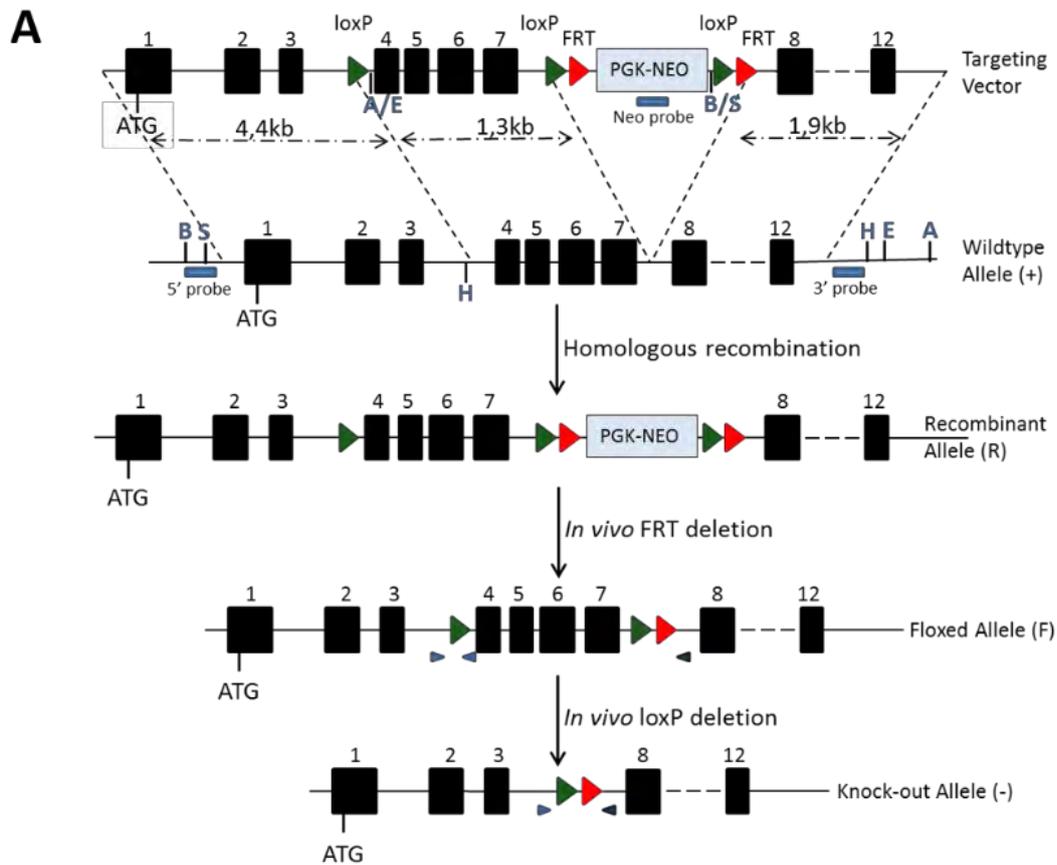
Traitement au Palbociclib par gavage

Une solution de Palbociclib (PD-0332991, HCl) à 75 mg/kg en 0,5% méthylcellulose est administré par gavage aux souris gestante à E13,5 (Hasenpusch-Theil et al., 2018). Les embryons sont prélevés 24h plus tard et fixés pour analyse.

Annexes

Annexe 1

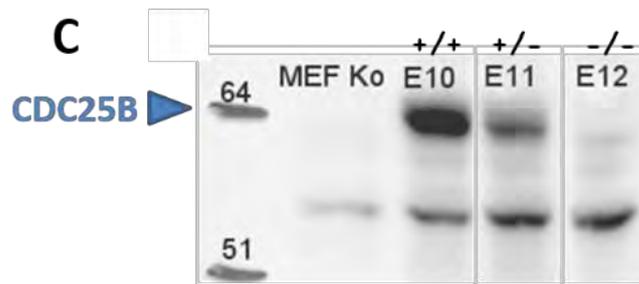
Suppression ciblée de Cdc25b dans la souris. (A) Une cassette PGK-NEO entourée de sites FRT (Flippase Recognition Target) est intégrée entre les exons 7 et 8. Par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires (cellules ES), cette construction est intégrée à un des allèles sauvages (+) du gène CDC25B et permet d'obtenir un allèle recombiné (R). Dans la cassette PGK-NEO, la néomycine, un antibiotique aminoside exprimé sous le contrôle du promoteur ubiquitaire de la PGK permet de sélectionner les cellules transfectées, par test de résistance bactérienne. L'injection dans ces cellules de la recombinase flipase (FLP) permet ensuite d'exciser la cassette PGK-NEO et d'obtenir un allèle floxé (F). **(B)** Test de la fertilité des souris mutante pour Cdc25b. Nombre de femelle Cdc25b +/- et -/- mise en croisement et ayant eu une portée d'embryon. **(C)** Western blot contre CDC25B à partir de cellules MEFs issues de souris CDC25B +/+, +/- et -/-. La protéine est complètement absente dans les individus mutants. **(D)** Hybridation in situ *Cdc25b* dans des embryons +/- et -/- à E9, et coupes transversales à trois le long de l'axe antéro-postérieur. Le transcrit *Cdc25b* n'est plus du tout détecté dans l'embryon mutant.



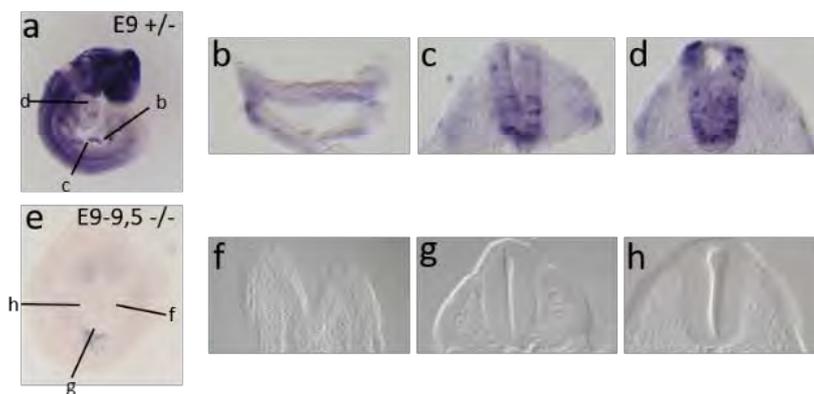
B

Genotype	+/-	-/-
N. Female	11	8
N. Litter	10	0

C



D



Annexe 2

CDC25B controls the basal progenitor ratio through a modification of G2 phase length

Mélanie Roussat¹, Christophe Audouard¹, Francois Medevielle¹, Thomas Jungas¹, Alice Davy¹, Fabienne Pituello¹, Sophie Bel-Vialar^{1*}

1 Centre de Biologie du Développement (CBD), Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse, CNRS, UPS, France.

* Corresponding author

Abbreviated title: CDC25B and cortical neurogenesis

Corresponding authors: Sophie Bel-Vialar, Centre de Biologie du Développement, Centre de Biologie Intégrative, Université de Toulouse, CNRS-UPS (UMR5547) ; 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

E-mail addresses: sophie.vialar@univ-tlse3.fr

Fax: (33)5 61 55 65 07, Phone: (33)5 61 55 67 39

Keywords: neural stem cells, neurogenesis, proliferation, differentiation, cell cycle, CDC25 phosphatases, neocortex, vertebrate embryo

Introduction

The cerebral cortex performs highly complex neural functions and give humans their cognitive capabilities. During cortical development, neural stem cells (NPCs) progressively change their properties to give rise to several progenitor types that will collaborate to produce the correct number of neurons at the right time and place. It is hence important that proliferative and differentiation rate of these progenitors be tightly regulated during the course of neurogenesis. Indeed, modification of these parameters can lead to dramatic cortical defect in human such as microcephaly. Moreover, they are also linked to cortical expansion during evolution (Namba and Huttner 2017).

In mouse, neurogenesis starts from E10.5 and last during a week revue (Beattie and Hippenmeyer 2017) (Govindan and Jabaudon 2017) (Kawaguchi 2019). NPCs initially divide symmetrically to self-renew and expand the stem cell pool. Then, they give rise to apical dividing progenitors and self-consume. This apical zone is at the origin of all the cortical progenitors that will sequentially produce deep layer neurons and superficial layer neurons. There are two mains types of progenitors in the rodent cortex: apical radial glial cells (aRGs), and basal intermediate progenitors (bIPs), expressing respectively the transcription factor PAX6 and TBR2. aRGs have apical and basal processes and divide at the apical side of the ventricular zone. They first divide symmetrically to amplify the progenitor pool and then shift to an asymmetric self-renewing division, producing an aRGs s and either a neuron or a basal progenitor (Govindan and Jabaudon 2017) (Kawaguchi 2019). bIPs are exclusively born from aRGs. They do not have apical or basal processes and divide in the subventricular zone to give rise mostly to neurons even if few of them perform a round of symmetric divisions before performing a terminal neurogenic division (Haubensak et al. 2004) (Attardo et al. 2008). Another type of basal progenitor, basal radial glia (bRG, also called outer radial glia), has emerged during evolution and is present in very small proportion in rodents in the SVZ and IZ. Like aRGs, bRGs possess a basal process that similarly function as a guide for neuron migration, they express PAX6 and have the capability to realise several rounds of symmetric amplifying divisions (Ostrem, Di Lullo and Kriegstein 2017). However, they do not contact the apical side and express specific transcription factors such as HopX (Vaid et al. 2018). This transit amplification is a feature of human as compared to rodent neural development and likely contribute to the expansion of the primate neocortex (Namba and Huttner 2017). All these

progenitors will produce different cohorts of neurons and depending of the proportion of progenitor types, neuronal proportions in the future adult cortex will be consequently modified. Temporal switches from NPCs to aRGs, aRGs to bIPs and bRGs are thus determinant parameters to control the future size and functionality of the neocortex (Wilsch-Bräuninger, Florio and Huttner 2015) (Kawaguchi 2019).

Increasing data suggest that controlling cell cycle kinetics and in particular cell cycle phase duration, is of major importance for cell fate decisions (Agius et al. 2015). Signalling pathways such as FGF or hedgehog influence proliferative properties of neural progenitors by controlling cell cycle parameters. For example, fibroblast growth factor (FGF) promotes proliferative divisions by decreasing G1 phase duration (Lahti et al. 2011). In the amphibian retina, hedgehog signalling transform slow dividing stem cells into fast cycling transient amplifying progenitors displaying short G1 and G2 phases (Locker et al. 2006). In another hand, several studies directly make the link between cell cycle phase duration and progenitor fate in the developing cortex. First, it has been shown that G1 lengthening is associated with a change in the ratio between aRGs and bIPs, G1 length being longer in bIPs (Arai et al. 2011). Then, reducing G1 length by overexpressing either cyclinD1, CyclinE or the heterodimer CDK4/cyclinD1, inhibits neuronal differentiation and increase the progenitor pool (Lange, Huttner and Calegari 2009) (Pilaz et al. 2009). Conversely, lengthening G1 by blocking the CDK4/cyclinD1 function displays the opposite effect. These data set G1 lengthening as an important positive regulator of neuronal differentiation. Additional data reveal that proliferating and neurogenic progenitors display different S phase duration, the latter having a shorter S phase (Arai et al. 2011). Mitose lengthening has also been linked to an increase in neurogenic divisions (Pilaz et al. 2016). If modulating G1 length to regulate cell fate makes sense in regard of the fact that many proliferative signal and proneural genes are known to act on cells in G1, the role of G2 phase length during neurogenesis has been more elusive. Several line of evidence suggest that G2 length could influence cellular fate through the activity of the WNT signalling pathway (Davidson et al. 2009) (Davidson and Niehrs 2010). Indeed, the Wnt- β catenin activity picks in G2/M. In addition, several component of the WNT machinery are associated with the centrosome and regulates mitotic spindle apparatus. Moreover, WNT signalling regulates the orientation of cell division in *C. elegans* (Davidson and Niehrs 2010). We assessed the role of G2 length during neurogenesis few years ago by using

CDC25B to modify G2 length in the chick developing spinal cord (Benazeraf et al. 2006, Peco et al. 2012, Bonnet et al. 2018) .

CDC25B is a well-known G2/M regulator, belonging to the dual specificity CDC25 phosphatase family (Boutros, Dozier and Ducommun 2006) (Agius et al. 2015). There are three CDC25 members in the mouse and human and two in the chick. They act through removing inhibitory threonine and tyrosine phosphate from cyclin-dependent kinases. CDC25B main function is to activate CDK1-cyclinB complex at the G2-M transition thus promoting mitosis entry. It is also recruited to the mother centrosome and is involved in the centrosome duplication cycle as well as in microtubule nucleation (Boutros, Lobjois and Ducommun 2007b, Boutros and Ducommun 2008, Boutros et al. 2011, Boutros et al. 2013) . Invalidation of the three CDC25 has been performed in mice (Chen et al. 2001, Ferguson et al. 2005, Lee et al. 2009). CDC25A is the only member to display an essential function as CDC25A deficient embryos exhibit strong growth defects and die around E7.5. Mice lacking CDC25B, C or both are viable, develop normally and embryonic fibroblasts derived from these mice display normal proliferation rate. The only visible defect is female sterility in CDC25B deficient mice as CDC25B $-/-$ oocytes are unable to complete meiosis. Interestingly, CDC25B expression is activated at the onset of neurogenesis in the developing spinal cord and its expression correlates temporally and spatially with neuron production. Moreover, by performing gain and loss of function of CDC25B in chick and mouse spinal cord we have shown that it controls the G2 phase duration of neural progenitors and promotes neuron production (Bonnet et al. 2018). Gain of function of CDC25B together with the SOX2/TIS21 biomarker (Saade et al. 2013), allowing to quantify proliferative, asymmetric and symmetric neurogenic divisions, indicates that in the neural tube CDC25B acts as a maturing factor, favouring neurogenic division at the expenses of proliferative ones (Bonnet et al. 2018). Regarding the increased complexity of progenitor types in the cortex, one can hypothesise that G2 phase modulation through CDC25B function could be important for the maturation of progenitors. Two indirect links have already been drawn between cortex maturation and CDC25B modulation. First, in a murine model of microcephaly (Mcp1 $- / -$), brain size reduction is due to an early switch from proliferative divisions to neurogenic divisions, resulting in the depletion of the progenitor pool, and this phenotype is associated with an increase in CDC25B activity (Gruber et al. 2011). Second, the inactivation of the FoxM1 gene leads to corticogenesis defects due to an increase in

proliferative divisions producing basal progenitors and this defect is associated with a decrease in the expression of CDC25B (Wu et al. 2014).

The role of G2 phase lengthening and regulation for cortex formation has been thus largely unexplored. In this study, we use CDC25B as an entry point to investigate this question. We show that removing CDC25B function lead to a strong lengthening of the G2 phase which is compensated by a shortening of the G1 phase and M phase, resulting in a normal cell cycle length and proliferative index. This change in G1/G2 duration provokes a change in the destiny of apical progenitors leading to a change in the basal progenitor ratio in favor of bRGs progenitors.

Results

Cdc25b is expressed in Pax6+ aRGs progenitors

We previously showed that in the mouse neural tube embryo, *Cdc25b* is expressed in neural progenitors from E8.5 onward and switched off in postmitotic neurons (Bonnet et al. 2018). As described in the introduction, the developing cortex contains several types of progenitors that varies by localization, shape and mode of division. To determine if CDC25B is expressed in all cortical progenitors or in a subset of them, we performed *in situ* hybridization of *Cdc25b* on brain coronal sections at key stage of corticogenesis (**Fig1A**). At E11.5, when aRGs switch their mode of division to produce neurons, *Cdc25b* is expressed in the ventricular zone containing aRGs in a gradient manner: it is strongly expressed laterally where progenitors are producing neurons, but less medially, where progenitors are still proliferating. This gradient is still observed at E14.5, but at E16.5, CDC25B transcripts are homogeneously expressed in the ventricular zone all along the medio-lateral axis. To determine if it is also expressed in bIPs, we co-labelled *Tbr2*⁺ as a marker for bIPs with *Cdc25b* mRNA at E14.5 (**Fig1B**). This analysis revealed that *Cdc25b* is no longer detected in the SVZ, delimited by *Tbr2*⁺ immunostaining. Moreover, we analysed RNA-Seq data from (Florio et al. 2015) and found that *Cdc25b* is highly expressed in aRGs compared to basal progenitors (bIPs, bRGs) and no longer expressed in neurons (**Fig1C**). These analyses indicate that *Cdc25b* is predominantly expressed in aRGs and progressively downregulated in bIPs.

Cdc25b loss-of-function severely increases G2-phase without affecting total cell cycle duration

Given its expression in aRGs *Cdc25b* could regulate their proliferation or their differentiation into basal progenitors or neurons. To investigate such roles, we used the CRE/Lox system to generate a conditional loss-of-function of *Cdc25b*, specifically in neural progenitors using *NesCre;CDC25B fl/-* embryos (*CDC25B^{nesKO}*) (Bonnet et al. 2018) . In these embryos, deletion is complete in the cortex from E10.5 as seen by crossing these mice with a Td-Tomato mouse line Madisen (Madisen et al. 2010) (**Fig1D**).

We first analysed cell cycle parameters in aRGs progenitors of *Cdc25b^{nesKO}* embryo at E14,5 i.e. the middle stage of corticogenesis. As our objective was to evaluate the importance of G2 length during corticogenesis, we first measured G2-phase duration using the percentage of labeled mitoses (PLM) paradigm (Quastler and Sherman 1959). Embryos were harvested 2 hrs,

3 hrs, 4 hrs (**Fig2A**) or 5 hrs (not shown) after EdU administration and the percentage of P-H3⁺EdU⁺ co-labeled nuclei was quantified with increasing times of exposure to EdU (**Fig2B**). We quantified the percentage of P-H3⁺EdU⁺ co-labeled nuclei and found that it was consistently lower in aRGs progenitors from *Cdc25b*^{nesKO} embryos. As the progression of this percentage is proportional to G2-phase duration, we could extract an average G2-phase length from curves. *Cdc25b* loss-of-function in aRGs dramatically increases their G2-phase length, ranging from 2h hours in control to 3h40 in *Cdc25b*^{nesKO}. This lengthening is already initiated at E12.5 and last at least until E16.5 (**FigS1**). In addition, we observed a strong delay in apical migration of cycling progenitor stained with EdU (Fig1A), consistent with previous result showing that part of the cyclin kinase CDK1 function is to regulate the apical movement during INM (Baffet, Hu and Vallee 2015). We then determined if this G2-phase length slowdown in progenitors affects their proliferation rate and/or cell cycle length. To assess aRGs proliferation rate, we collected embryos after 1h EdU administration and quantified EdU⁺ cells among aRGs (VZ, Tbr2⁻ cells, **Fig2D**). This percentage reflects the proportion of aRGs in S-phase and we did not observed any difference between control and *Cdc25b*^{nesKO} embryos (Fig2E).

As the number of proliferating cell was not affected, we seek to determine if G2 lengthening was causing a general slowdown of the total cell length in aRGs. We performed double EdU and BrdU labelling to estimate total cell cycle (Tc) and S phase duration as described in (Martynoga et al. 2005) (**Fig2F**). As shown in figure 2G and 2H, total cell cycle length is not significantly modified in cortical progenitors of *CDC25*^{nesko} embryos. We deduced from that result that a shortening of G1 phase duration may compensate for the strong lengthening of the G2 phase. To confirm that assumption, we directly assessed G1 phase length by either counting the number of cells expressing CCND1 (specifically expressed during in G1 phase) among aRGs (TBR2⁻ cells in the VZ) or quantifying the percentage of aRGs cells being in G1 in *CDC25B*^{nesko} versus CTL PAX6⁺ cells by FACS. We observed a clear reduction of the number of CCND1 in *CDC25B*^{nesko} aRGs (**Fig2J**, $58.7 \pm 2.5 / 130 \mu\text{m}$ wide area in CTL versus 48.7 ± 3.8 in *CDC25B*^{nesko}) and of the percentage of aRGs being in G1 phase (**Fig2K**, 72.98 ± 1.2 % versus 68.3 ± 1.95 % in *CDC25B*^{nesko}) indicating that the G1 phase is shorter in *CDC25B*^{nesko} APs. Finally, we quantified the number of apical mitosis (H3P positive cells) and found a significant reduction of H3P positive cells ($21.6 \pm 0.9 / 400 \mu\text{m}$ wide area versus 18 ± 1.03 in *CDC25B*^{nesko}) (**Fig2C**). As total cell length and proliferative index are not modified, this reduction indicate a

shortening of mitosis duration in CDC25B^{nesko} aRGs. In conclusion, removing CDC25B function in CDC25B^{nesko} mice lead to a strong lengthening of the G2 phase that is compensated by a shortening of the G1 phase and M phase, resulting in a normal cell cycle length and proliferative index.

Cdc25b regulates the basal progenitors ratio

We next determined if cell cycle defects observed in CDC25B^{nesko} aRGs were associated with a defect in progenitor production. We quantified the three types of progenitors at E14,5, and E16,5 – i.e. two stages of strong neurons and basal progenitors production. The aRGs number is not affected nor at E14.5 neither at E16.5 in Cdc25b^{nesKO} embryos (**Fig3B,F**). At E14,5 the bIP number is decreased in the VZ, from 65.98±2.7/ 130 µm wide area in CTL to 57.28±3.2 in CDC25B^{nesko} (**Fig3C**). Interestingly, 48h later, this decrease is no longer detected in the VZ but observable in the SVZ (**Fig3G**, 69.7±2.8 / 113 µm wide area in CTL versus 58.56±4.3 in CDC25B^{nesko}, -16%). To eliminate the possibility that this reduction is due to apoptosis, we quantified activated-Caspase3+ cells at E16,5 and did not observe any differences between control and Cdc25b^{nesKO} embryos (**FigS2**). In addition, we quantified proliferation in bIPs at E14.5 and found that the proliferative and mitotic indexes are normal, precluding that the reduced bIP number is due to a proliferation defect in these cells (**FigS3**). Finally, we quantified PAX6+ cells in the IZ at both stage, as these cells are bRGs progenitors. Pax6+ cells are increased at E16,5, going from 10.06±0.9 in CTL to 13.9±1.4 in Cdc25b^{nesKO} (+39 %, **Fig.3.H**). We can conclude from these results that *Cdc25b* loss-of-function in aRGs affects the fate of their progeny, leading to an unbalanced basal progenitor production at E14,5 and E16,5.

To determine if the change of progenitor ratio have nevertheless a consequence on neuronal production - as the different progenitor types have different neurogenic capabilities- we quantified neurons of the upper-layer and deeper-layer neurons using Satb2+ and Tbr1+ co-labelling at E16,5 or performing birth dating experiment by staining progenitors at E14,5 and E16,5 and analyzing their destiny at birth (P0) (**FigS4**). Although we observe a tendency to produce less neurons at E16,5, we did not observe any difference in the number of neurons between control and mutant embryos (**FigS4**). We also measured cortical hemispheres size and cortical plate thickness at postnatal stage (P0) and did not observed any defect in Cdc25b^{nesKO} embryos (**FigS5**). These results indicate that the change in basal progenitor ratio observed in Cdc25b^{nesKO} has no major impact on the global cortical neuron number.

CDC25B do not change the neurogenic potential or the angle of division of cortical progenitors

We have shown that in spinal progenitors, CDC25B promote neurogenesis through a change of the mode of division from proliferating to differentiating mode. In the cortex, the number of aRGs being unchanged in *Cdc25b^{nesKO}*, the diminution of bIPs number may involve a change of fate in which aRGs giving rise to aRGs + now give rise to aRGs + bRGs or aRGs + neurons. In that case, the balance between proliferative versus neurogenic division should not change in aRGs. To assess this point, we crossed *Cdc25b^{nesKO}* mice with a Tis21-GFP knock-in mouse, to distinguish neuronal committed from self-expanding aRGs and bIPs (Haubensak et al. 2004) (Attardo et al. 2008). As shown in **FigS6**, we did not detect any change in TIS21-GFP cell number among aRGs or bIPs in our mutants suggesting that CDC25B do not control the division mode in the cortex but rather change the destiny of neurogenic aRGs progenitors.

One possibility regarding the change of destiny in aRGs is that *Cdc25b* changes their division angle. Indeed, even if this mechanism is still controversial, it has been proposed that the production of bRGs would be favoured when the division plane is oblique, while divisions generating bIPs and neurons are associated with horizontal plane (Shitamukai, Konno and Matsuzaki 2011) (Lancaster and Knoblich 2012) (Delaunay et al. 2017). We therefore measure the mitotic spindle plane of apical progenitors in CTL versus *Cdc25b^{nesKO}* cortices (**FigS7**). We detect a decrease in horizontal divisions in mutants as in CTL embryos, 58% of cells have an angle between 0 and 10°, compared to 49% in *Cdc25b^{nesKO}* embryos. Interestingly, this is accompanied by a slight increase of oblique divisions (40% of CTL mitoses vs. 48% of *Cdc25b^{nesKO}* mitoses have a division angle between 10 and 45°, and 2% vs. 3% have an angle between 45 and 80°, respectively in CTL vs mutant embryos). These results suggest that the loss of *Cdc25b* could change the angle of division of the aRGs and favor oblique divisions thereby leading to an increase in bRGs production.

Changes in cell cycle parameters causes the cortical progenitor imbalance in *CDC25B^{nesko}*

A change in cell cycle parameters and in particular shortening of G1 length has been associated with a change in the progenitor's ratio. In another hand, cell cycle regulators such as CCND1 or CDC25B has been shown to trigger neurogenesis independently from their action on the cell cycle. As CDC25B both affect G1/G2 length and the progenitor number in cortical

progenitors, the next step was to determine the causal link between these two events. To answer this question we decided to compare CDC25B action with the one of a mutated form of CDC25B, CDC25BdelCDK, that is no longer able to interact with CDK1 (Bonnet et al. 2018), using in utero electroporation at E13,5 and analyzing electroporated cell fate 28h later. When compared to a control GFP+ vector, Cdc25b gain-of-function increases TBR2+ cells without changing the number of APs (deduced from VZ Tbr2- cells) or neuron (deduced from SVZ / IZ Tbr2- cells), indicating that it is sufficient to produce bIPs from aRGs (**Fig4**). We then tested CDC25BdelCDK capability to phenocopy the WT form and found that overexpression of this mutated form do not modify neither the number of Tbr2+ cells nor the number or APs or neurons (**Fig4**). This experiment indicates that 1) CDC25B is sufficient to produce bIPs 2) it acts through its interaction with CDK suggesting that this phenotype is directly linked to the change of G1/G2 phase duration.

Discussion

In this study, we aimed to analyze the effect of G2 phase modulation on corticogenesis through the study of CDC25B phosphatase function. CDC25BnesKo embryos display a strong defect of the G2 length in aRGs but the total cell length is not affected due to a compensation by G1 and M phase duration. This cell cycle manipulation lead to a reduction of the number of basal progenitors by 15%. Conversely, GOF of CDC25B led to an increase of TBR2 in the SVZ at this same period. In both context, the number of aRGS is unchanged. This alteration of the bIPs number could be interpreted in two ways: First, it could be due to a deregulation of the TBR2/neuron transition. In the absence of CDC25B function, TBR2 cells would give rise to neuron prematurely whereas they would accumulate instead of differentiating into neurons in GOF. The second possibility is that the reduction of TBR2 cells would be caused by a change of apical progenitor fate. Both hypothesis fit with the fact that the aRGs number is unchanged following CDC25B LOF or GOF. In the first case, only TBR2 cells fate would be impaired, in the second, aRGS would change their division from aRGs → aRGs + bIP to aRGs → aRGs + neuron or bRG. Several line of evidence render the first scenario unlikely. First, CDC25B is expressed in aRGS and not in bIPs; second, we do not see any increase of the neuron number in CDC25BnesKo embryos; third, we observed an increase of bRGS production in the mutant, suggesting that indeed, the fate of aRGs is changed. Altogether, these data point to the second scenario in which a change of aRGS fate lead to an imbalance of basal progenitors. Reduction of bIPs with an increase of bRGs has been observed in mutants of the shh signaling pathway. In Gli3 KO, the number of TBR2 cells is reduced and G1 length is shortened (Hasenpusch-Theil et al. 2018). As CDC25B is a target of shh signaling in the developing neural tube (Benazeraf et al. 2006), it is tempting to think that it is also downstream of shh signaling in the cortex. Careful epistasis analysis we be necessary to confirm that.

In a previous study, we showed that CDC25B promote neurogenesis in the developing spinal cord. In this context, CDC25B favors neurogenic divisions at the expense of proliferative ones. Interestingly, part of this phenotype is independent of its function on the cell cycle (Bonnet et al. 2018). Here we show that in the cortex, the defect of BPs ratio we observe is due to the cell cycle function of CDC25B as CDC25BdelCDK is not able anymore to produce TBR2 cells. This could be due to the lengthening of the G2 phase or the reduction of G1 length. Several studies have already explored the role of G1 duration during corticogenesis (Calegari and

Huttner 2003) (Calegari et al. 2005) (Lange et al. 2009) (Dehay and Kennedy 2007, Pilaz et al. 2009, Salomoni and Calegari 2010), (Lukaszewicz and Anderson 2011). G1 length is increased in neurogenic progenitors compared to proliferative ones. Shortening G1 increase proliferative divisions and inhibits neurogenesis by increasing the production and expansion of bIPs (Lange et al. 2009) pilaz (Pilaz et al. 2009). This phenotype is quite different of what we observed in CDC25B^{nesKO} mutants, precluding that the defect in the BP ratio are exclusively due to G1 shortening. Rather, we think that G2 lengthening is what causes this progenitor defect. Recent data show that PAX6 levels picks in G2 phase and that sustained PAX6 expression change the bIP/bRGs ratio (Mi et al. 2013, Mi et al. 2018) (Wong et al. 2015). This is in accordance with our result showing the same change in CDC25B^{nesko}. The increase of bRGS number could be due to this accumulation of PAX6. Another possibility is that changing G2 phase length modify WNT signaling as it has been shown in *xenopus* and *drosophila* (Marygold and Vincent 2003) (Davidson et al. 2009, Davidson and Niehrs 2010). Several WNT pathway components localize at the centrosome and regulates the mitotic spindle apparatus. WNT also regulates the orientation of cell division. In our experiments, we show that removing CDC25B slightly increase the number of oblique division and it has been proposed that oblique division favor the production of bRGs (Shitamukai et al. 2011). One scenario we can propose, is that increasing G2 length, by increasing WNT activity, increase the number of oblique division of aRGS, triggering production of bRGs instead of bIPs.

The neuron number is not affected in our mutant. This could be due either to the fact that we increase the number of bRGs and as these progenitors perform several rounds of division if compared to bIPs, they could produce more neurons and compensate for the lack of Tbr2 progenitors. Another possibility is that the system compensate the loss of bIPs by increasing proliferation of progenitors (Betty et al. 2016). Even if we did not detect any important defect on the proliferation rate of mutant progenitors at E13.5 and E14.5, it is possible that such a compensation mechanism be put in place at E15.5 or E16.5.

Extensive studies have analyzed CDC25B function in cellular system and none of them report a function of CDC25B in regulating G1 phase length (Boutros et al. 2006, Boutros, Lobjois and Ducommun 2007a). Rather, it is well known that induced alteration of one of the cell cycle phase is often compensated by modifying the length of another phase. Especially, a compensatory feedback between G1/S and G2/M progression has been described. This

feedback involves a negative regulation of dE2F1 by cdk1 and cdk2 (Reis and Edgar 2004). Moreover, string, the drosophila homolog of CDC25B, exerts a negative feedback on dE2F through the activating dephosphorylation of cdk1 (Reis and Edgar 2004). In our context, the G1 phase shortening that we observed in CDC25B^{nes^{KO}} embryos could be due to an upregulation of E2F expression consequent to a reduction of cdk1 activity. As E2F positively regulates cyclin E expression, this would trigger precocious S phase entry and G1 phase shortening. Further investigations will be necessary to test this hypothesis.

MATERIAL AND METHODS

Mice

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. Cdc25b +/- ; Nestin-Cre and Cdc25b flox/flox lines has been described previously (Tronche et al. 1999) (Bonnet et al. 2018). These lines were crossed to obtain conditional mutant embryo Cdc25 flox/-; nestin-Cre (Cdc25b^{nesKO}) and control embryos Cdc25b flox/-, Cdc25b flox/+ and Cdc25b flox/+; nestin-Cre (Cdc25b^{ctl}). Embryonic (E) day 0.5 was assumed to start at midday of the day of the vaginal plug discovery.

In situ hybridization and immunohistochemistry

In situ hybridization were performed on 60µm vibratome sections of mouse brain embryos as described (Bonnet et al. 2018). For immunohistochemistry, embryos were fixed in 4% paraformaldehyde at 4°C overnight, washed in PBS and embedded in paraffin using an STP 120 Spin Tissue Processor. Brains were sliced in 6 to 14 µm transversal sections using a HM 355 Microtom. Section are directly mounted on coated histological slides. Sections were rehydrated by successive baths of histoclear (2 times), 100% ethanol (2 times), 95% ethanol, 70% ethanol, 50% ethanol and deionized H₂O for 5 minutes each. Sections were heated in 1% Citrate in H₂O at around 100°C for 45 minutes, permeabilized with PBS-0,5% Tween + 3% Bovine Serum Albumin + 1% Horse Serum and incubated with primary antibody overnight at 4°C. The following primary antibodies were used: P-H3 (Upstate Biotechnology, 1:1000, rabbit), BrdU (G3G4, 1:400, mouse), active caspase 3 (BD Biosciences, 1:100, rabbit), GFP (abcam, 1:1000, chick), CyclinD1 (ThermoFisher, 1:200, rabbit), pRbSer780 (CST, 1:100, rabbit), Satb2 (Abcam, 1:100, mouse), Tbr1 (abcam, 1:100, rabbit), Pax6 (Covance, 1:300, rabbit), Pax6 (MBL; 1:200, rabbit), Tbr2 (eBioscience, 1:50, rat), RFP (SICGEN, 1:100, goat). Sections were then washed in PBS and incubated with the secondary antibodies for 2h at room temperature. For counterstaining, DAPI (1:1000, Life Technologies) was used. For BrdU-immunocytochemistry, sections were denaturing with 2N HCl and then washed with 0.1 M Na₄B₄O₇ before incubation with the primary antibodies.

Cell proliferation, cell cycle and birth dating analysis / EdU/BrdU experiments

G2-phase length was determined using the percentage of labeled mitoses (PLM) paradigm (Quastler and Sherman 1959). Pregnant mice were intraperitoneally injected with 100 μ L of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU, Click-iT EdU Alexa Fluor 647 Imaging Kit, Invitrogen) at 1mg/mL. Embryos were harvested 120, 180, 240 or 300 minutes after EdU administration and the percentage of P-H3⁺EdU⁺ co-labeled nuclei was quantified with increasing times of exposure to EdU. The progression of this percentage is proportional to G2-phase duration.

To determine cell proliferation, pregnant mice were injected intraperitoneally with 1 mg/mL of EdU. Embryos were harvested 60 minutes later. Total cell cycle length and S-phase length were determined as described ([Martynoga et al., 2005](#)). Pregnant mice were intraperitoneally injected with 100 μ L of EdU 10 mg/mL intraperitoneally, followed by 100 μ L of 5-bromo-2'-désoxyuridine (BrdU, Sigma) at 10 mg/mL 90 minutes later. Embryos were collected 30 minutes later. Tc and Ts were calculated from counts of EdU⁺BrdU⁻ and EdU⁺BrdU⁺ cells.

To determine the generation of neurons by pulse-chase experiments (birth dating), pregnant mice were intraperitoneally injected with EdU at E14,5 or E16,5. Embryos were harvested at birth (P0)

Flow cytometry analysis

Cortical hemispheres were collected in PBS-1% FCS and cells mechanically dissociated through a 40- μ m nylon mesh (Clearline). Cells were resuspended in 1.2 ml ice-cold PBS and fixed by slowly adding 3 ml cold 100% ethanol while vortexing to obtain a 70% final concentration. The incubation procedure with primary and secondary antibodies was as described for immunofluorescence, with centrifugation at 2200 rpm for 10 min at each step. Finally, cells were resuspended in 500 μ L PI/RNase solution (X) for 30 min in the dark. Acquisition was performed using cytoflexS with a minimum of 1000 cells with the Cytexpert software. Debris and doublets were excluded using morphometric parameters (FSC/SSC) and pulse area parameters from PI emission, respectively. To set the threshold of Pax6, Tbr2 and GFP-positive cells, control samples were cells incubated with secondary antibody and PI only. aRG progenitor DNA content was estimated by analyzing PI emission intensity of Pax6-positive cells only.

Drug administration

Palbociclib-HCl (PD-0332991) was administered by oral gavage at 75 mg/kg body weight in PBS 0,5% methylcellulose in E13,5 pregnant mice. Embryos were harvested 24h later.

DNA constructs and in utero electroporation

In utero electroporation experiments were performed on E13,5 pregnant mice. Embryos were harvested 28h later. Gain-of-function experiments were performed using a vector expressing the various human CDC25B isoforms (hCDC25B3, hCDC25B3DCDK, hCDC25B3DP DCDK) under the control of a cis regulatory element of the mouse Cdc25b called pccRE. A control vector was generated with the β Gal gene downstream of the pccRE.

Before surgery, mice were subcutaneously injected with 100 μ L of morphine at 2.5 mg/kg. Mice were anesthetized with 4 % isoflurane. After surgery, mice were subcutaneously injected with 100 μ L of 2 mg/ml métacam. Analgesic and anesthetic toxicity on G2-phase length was evaluated with the PMN paradigm and did not show any effect.

Imaging and statistical analysis

Slices were analyzed using a SP8 Leica confocal microscope. For each experiment, at least three independent litters and three different slides per embryo were analyzed. Quantitative data are expressed as mean \pm s.e.m. Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism 5 or RStudio software. Significance was assessed by performing Mann-Whitney (MW) t-test, or using the mixed effect model (MEM) followed by an ANOVA test as described (Bonnet et al. 2018). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n.s. non significant.

REFERENCES

- Agius, E., S. Bel-Vialar, F. Bonnet & F. Pituello (2015) Cell cycle and cell fate in the developing nervous system: the role of CDC25B phosphatase. *Cell Tissue Res*, 359, 201-13.
- Arai, Y., J. N. Pulvers, C. Haffner, B. Schilling, I. Nusslein, F. Calegari & W. B. Huttner (2011) Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nat Commun*, 2, 154.
- Attardo, A., F. Calegari, W. Haubensak, M. Wilsch-Brauninger & W. B. Huttner (2008) Live imaging at the onset of cortical neurogenesis reveals differential appearance of the neuronal phenotype in apical versus basal progenitor progeny. *PLoS ONE*, 3, e2388.
- Baffet, A. D., D. J. Hu & R. B. Vallee (2015) Cdk1 Activates Pre-mitotic Nuclear Envelope Dynein Recruitment and Apical Nuclear Migration in Neural Stem Cells. *Dev Cell*, 33, 703-16.
- Beattie, R. & S. Hippenmeyer (2017) Mechanisms of radial glia progenitor cell lineage progression. *FEBS Lett*, 591, 3993-4008.
- Benazeraf, B., Q. Chen, E. Peco, V. Lobjois, F. Medevielle, B. Ducommun & F. Pituello (2006) Identification of an unexpected link between the Shh pathway and a G2/M regulator, the phosphatase CDC25B. *Dev Biol*, 294, 133-47.
- Betty, F.-H., C. Yi, G. Amélie, V. Lisa, A. Yoko, T. Jonathan & P. Alessandra. **2016**. Enhanced Abventricular Proliferation Compensates
- Cell Death in the Embryonic Cerebral Cortex. 1-18. Cerebral Cortex: Oxford.
- Bonnet, F., A. Molina, M. Roussat, M. Azais, S. Vialar, J. Gautrais, F. Pituello & E. Agius (2018) Neurogenic decisions require a cell cycle independent function of the CDC25B phosphatase. *Elife*, 7.
- Boutros, R., C. Dozier & B. Ducommun (2006) The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr Opin Cell Biol*, 18, 185-91.
- Boutros, R. & B. Ducommun (2008) Asymmetric localization of the CDC25B phosphatase to the mother centrosome during interphase. *Cell Cycle*, 7, 401-6.
- Boutros, R., V. Lobjois & B. Ducommun (2007a) CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer*, 7, 495-507.
- (2007b) CDC25B involvement in the centrosome duplication cycle and in microtubule nucleation. *Cancer Res*, 67, 11557-64.
- Boutros, R., C. Lorenzo, O. Mondesert, A. Jauneau, V. Oakes, C. Dozier, B. Gabrielli & B. Ducommun (2011) CDC25B associates with a centrin 2-containing complex and is involved in maintaining centrosome integrity. *Biol Cell*, 103, 55-68.
- Boutros, R., O. Mondesert, C. Lorenzo, P. Astuti, G. McArthur, M. Chircop, B. Ducommun & B. Gabrielli (2013) CDC25B overexpression stabilises centrin 2 and promotes the formation of excess centriolar foci. *PLoS ONE*, 8, e67822.
- Calegari, F., W. Haubensak, C. Haffner & W. B. Huttner (2005) Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development. *J Neurosci*, 25, 6533-8.
- Calegari, F. & W. B. Huttner (2003) An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. *J Cell Sci*, 116, 4947-55.
- Chen, M. S., J. Hurov, L. S. White, T. Woodford-Thomas & H. Piwnica-Worms (2001) Absence of apparent phenotype in mice lacking Cdc25C protein phosphatase. *Mol Cell Biol*, 21, 3853-61.
- Davidson, G. & C. Niehrs (2010) Emerging links between CDK cell cycle regulators and Wnt signaling. *Trends Cell Biol*, 20, 453-60.
- Davidson, G., J. Shen, Y. L. Huang, Y. Su, E. Karaulanov, K. Bartscherer, C. Hassler, P. Stannek, M. Boutros & C. Niehrs (2009) Cell cycle control of wnt receptor activation. *Dev Cell*, 17, 788-99.

- Dehay, C. & H. Kennedy (2007) Cell-cycle control and cortical development. *Nat Rev Neurosci*, 8, 438-50.
- Delaunay, D., A. Kawaguchi, C. Dehay & F. Matsuzaki (2017) Division modes and physical asymmetry in cerebral cortex progenitors. *Curr Opin Neurobiol*, 42, 75-83.
- Ferguson, A. M., L. S. White, P. J. Donovan & H. Piwnica-Worms (2005) Normal cell cycle and checkpoint responses in mice and cells lacking Cdc25B and Cdc25C protein phosphatases. *Mol Cell Biol*, 25, 2853-60.
- Florio, M., M. Albert, E. Taverna, T. Namba, H. Brandl, E. Lewitus, C. Haffner, A. Sykes, F. K. Wong, J. Peters, E. Guhr, S. Klemroth, K. Prüfer, J. Kelso, R. Naumann, I. Nüsslein, A. Dahl, R. Lachmann, S. Pääbo & W. B. Huttner (2015) Human-specific gene ARHGAP11B promotes basal progenitor amplification and neocortex expansion. *Science*, 347, 1465-70.
- Govindan, S. & D. Jabaudon (2017) Coupling progenitor and neuronal diversity in the developing neocortex. *FEBS Lett*, 591, 3960-3977.
- Gruber, R., Z. Zhou, M. Sukchev, T. Joerss, P. O. Frappart & Z. Q. Wang (2011) MCPH1 regulates the neuroprogenitor division mode by coupling the centrosomal cycle with mitotic entry through the Chk1-Cdc25 pathway. *Nat Cell Biol*, 13, 1325-34.
- Hasenpusch-Theil, K., S. West, A. Kelman, Z. Kozic, S. Horrocks, A. P. McMahon, D. J. Price, J. O. Mason & T. Theil (2018) Gli3 controls the onset of cortical neurogenesis by regulating the radial glial cell cycle through. *Development*, 145.
- Haubensak, W., A. Attardo, W. Denk & W. B. Huttner (2004) Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 3196-201.
- Kawaguchi, A. (2019) Temporal patterning of neocortical progenitor cells: How do they know the right time? *Neurosci Res*, 138, 3-11.
- Lahti, L., J. Saarimäki-Vire, H. Rita & J. Partanen (2011) FGF signaling gradient maintains symmetrical proliferative divisions of midbrain neuronal progenitors. *Dev Biol*, 349, 270-82.
- Lancaster, M. A. & J. A. Knoblich (2012) Spindle orientation in mammalian cerebral cortical development. *Curr Opin Neurobiol*, 22, 737-46.
- Lange, C., W. B. Huttner & F. Calegari (2009) Cdk4/cyclinD1 overexpression in neural stem cells shortens G1, delays neurogenesis, and promotes the generation and expansion of basal progenitors. *Cell Stem Cell*, 5, 320-31.
- Lee, G., L. S. White, K. E. Hurov, T. S. Stappenbeck & H. Piwnica-Worms (2009) Response of small intestinal epithelial cells to acute disruption of cell division through CDC25 deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 4701-6.
- Locker, M., M. Agathocleous, M. A. Amato, K. Parain, W. A. Harris & M. Perron (2006) Hedgehog signaling and the retina: insights into the mechanisms controlling the proliferative properties of neural precursors. *Genes Dev*, 20, 3036-48.
- Lukaszewicz, A. I. & D. J. Anderson (2011) Cyclin D1 promotes neurogenesis in the developing spinal cord in a cell cycle-independent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 11632-7.
- Madisen, L., T. A. Zwingman, S. M. Sunkin, S. W. Oh, H. A. Zariwala, H. Gu, L. L. Ng, R. D. Palmiter, M. J. Hawrylycz, A. R. Jones, E. S. Lein & H. Zeng (2010) A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci*, 13, 133-40.
- Martynoga, B., H. Morrison, D. J. Price & J. O. Mason (2005) Foxg1 is required for specification of ventral telencephalon and region-specific regulation of dorsal telencephalic precursor proliferation and apoptosis. *Dev Biol*, 283, 113-27.
- Marygold, S. J. & J. P. Vincent (2003) Armadillo levels are reduced during mitosis in *Drosophila*. *Mech Dev*, 120, 157-65.
- Mi, D., C. B. Carr, P. A. Georgala, Y. T. Huang, M. N. Manuel, E. Jeanes, E. Niisato, S. N. Sansom, F. J. Livesey, T. Theil, K. Hasenpusch-Theil, T. I. Simpson, J. O. Mason & D. J. Price (2013) Pax6 exerts regional control of cortical progenitor proliferation via direct repression of Cdk6 and hypophosphorylation of pRb. *Neuron*, 78, 269-84.

- Mi, D., M. Manuel, Y. T. Huang, J. O. Mason & D. J. Price (2018) Pax6 Lengthens G1 Phase and Decreases Oscillating Cdk6 Levels in Murine Embryonic Cortical Progenitors. *Front Cell Neurosci*, 12, 419.
- Namba, T. & W. B. Huttner (2017) Neural progenitor cells and their role in the development and evolutionary expansion of the neocortex. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 6.
- Ostrem, B., E. Di Lullo & A. Kriegstein (2017) oRGs and mitotic somal translocation - a role in development and disease. *Curr Opin Neurobiol*, 42, 61-67.
- Peco, E., T. Escude, E. Agius, V. Sabado, F. Medevielle, B. Ducommun & F. Pituello (2012) The CDC25B phosphatase shortens the G2 phase of neural progenitors and promotes efficient neuron production. *Development*, 139, 1095-104.
- Pilaz, L. J., J. J. McMahon, E. E. Miller, A. L. Lennox, A. Suzuki, E. Salmon & D. L. Silver (2016) Prolonged Mitosis of Neural Progenitors Alters Cell Fate in the Developing Brain. *Neuron*, 89, 83-99.
- Pilaz, L. J., D. Patti, G. Marcy, E. Ollier, S. Pfister, R. J. Douglas, M. Betizeau, E. Gautier, V. Cortay, N. Doerflinger, H. Kennedy & C. Dehay (2009) Forced G1-phase reduction alters mode of division, neuron number, and laminar phenotype in the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 21924-9.
- Quastler, H. & F. G. Sherman (1959) Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exp Cell Res*, 17, 420-38.
- Reis, T. & B. A. Edgar (2004) Negative regulation of dE2F1 by cyclin-dependent kinases controls cell cycle timing. *Cell*, 117, 253-64.
- Saade, M., I. Gutierrez-Vallejo, G. Le Dreau, M. A. Rabadan, D. G. Miguez, J. Buceta & E. Marti (2013) Sonic hedgehog signaling switches the mode of division in the developing nervous system. *Cell Rep*, 4, 492-503.
- Salomoni, P. & F. Calegari (2010) Cell cycle control of mammalian neural stem cells: putting a speed limit on G1. *Trends Cell Biol*, 20, 233-43.
- Shitamukai, A., D. Konno & F. Matsuzaki (2011) Oblique radial glial divisions in the developing mouse neocortex induce self-renewing progenitors outside the germinal zone that resemble primate outer subventricular zone progenitors. *J Neurosci*, 31, 3683-95.
- Tronche, F., C. Kellendonk, O. Kretz, P. Gass, K. Anlag, P. C. Orban, R. Bock, R. Klein & G. Schütz (1999) Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet*, 23, 99-103.
- Vaid, S., J. G. Camp, L. Hersemann, C. Eugster Oegema, A. K. Heninger, S. Winkler, H. Brandl, M. Sarov, B. Treutlein, W. B. Huttner & T. Namba (2018) A novel population of Hopx-dependent basal radial glial cells in the developing mouse neocortex. *Development*, 145.
- Wilsch-Bräuninger, M., M. Florio & W. B. Huttner (2016) Neocortex expansion in development and evolution - from cell biology to single genes. *Curr Opin Neurobiol*, 39, 122-32.
- Wong, F. K., J. F. Fei, F. Mora-Bermúdez, E. Taverna, C. Haffner, J. Fu, K. Anastassiadis, A. F. Stewart & W. B. Huttner (2015) Sustained Pax6 Expression Generates Primate-like Basal Radial Glia in Developing Mouse Neocortex. *PLoS Biol*, 13, e1002217.
- Wu, X., X. Gu, X. Han, A. Du, Y. Jiang, X. Zhang, Y. Wang, G. Cao & C. Zhao (2014) A novel function for Foxm1 in interkinetic nuclear migration in the developing telencephalon and anxiety-related behavior. *J Neurosci*, 34, 1510-22.

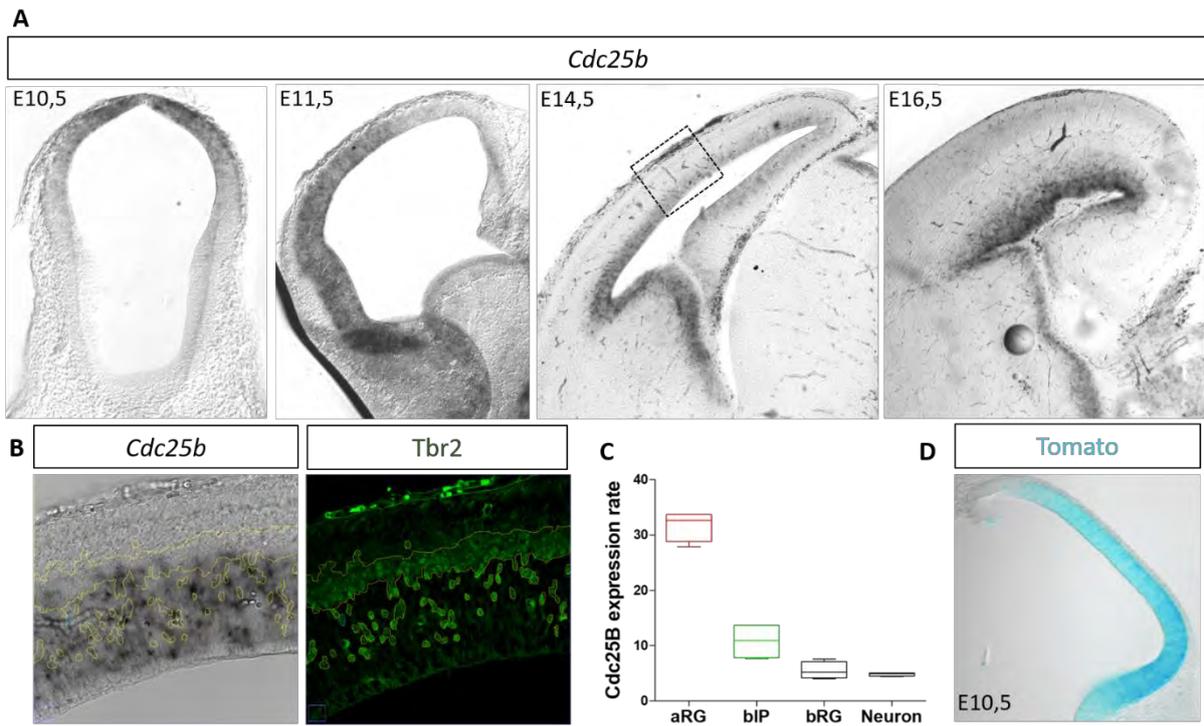
Figure 1

Figure 2

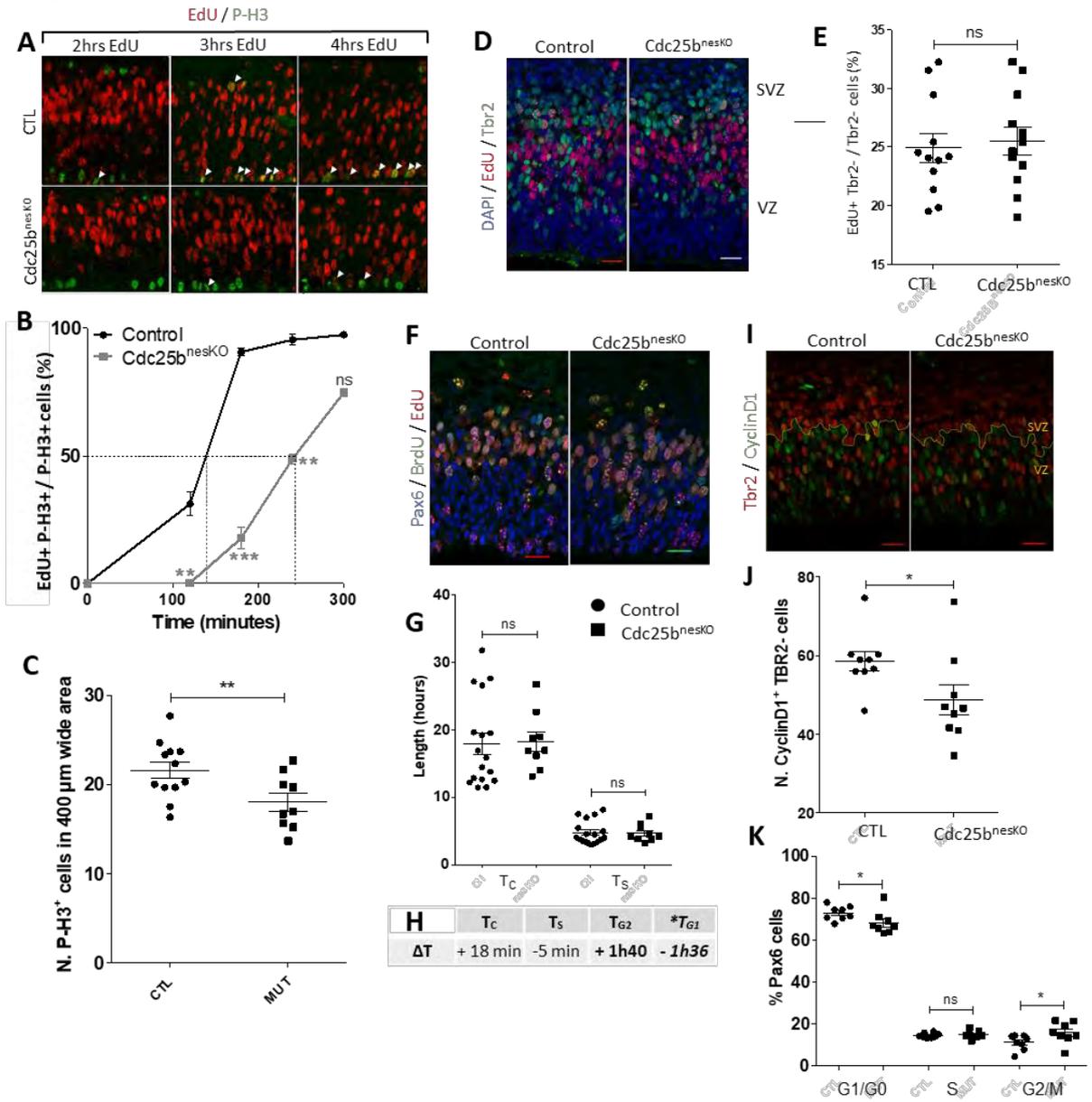


Figure 3

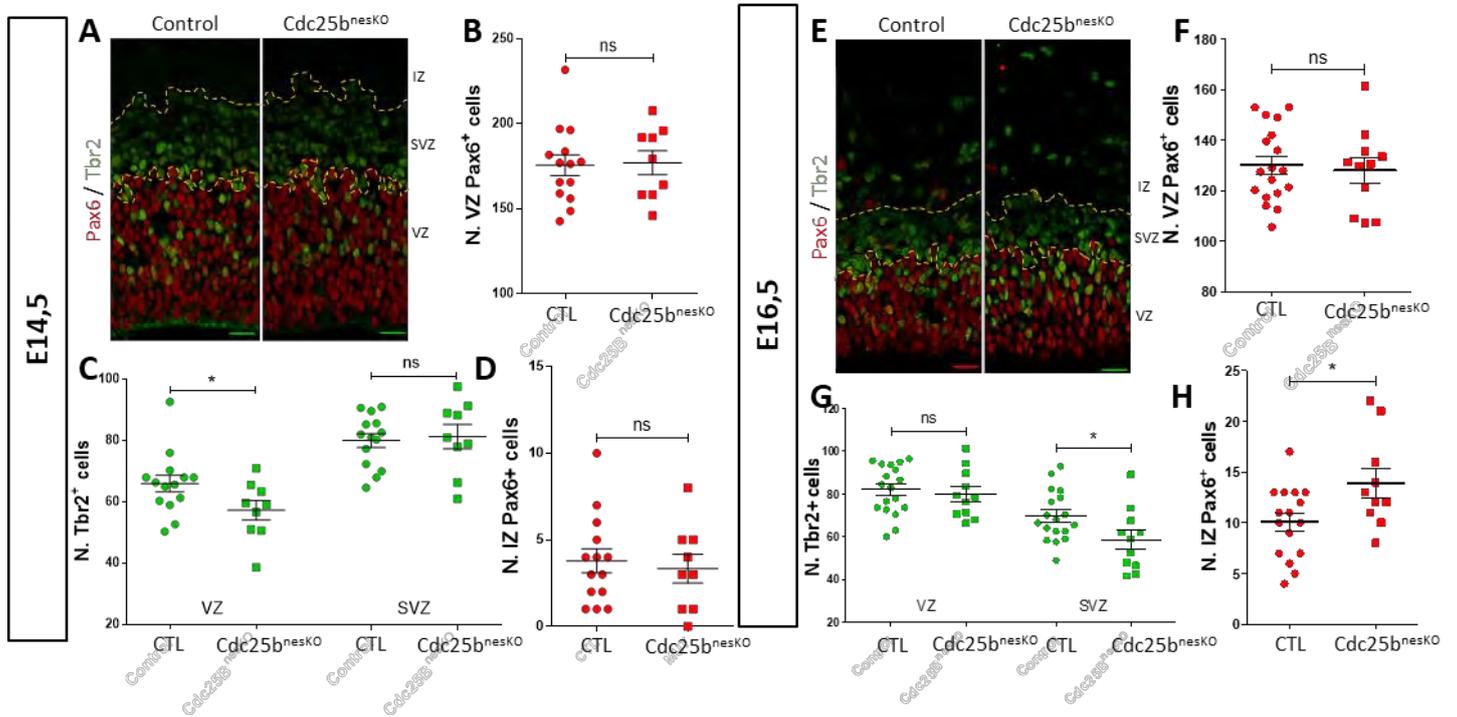


Figure 4

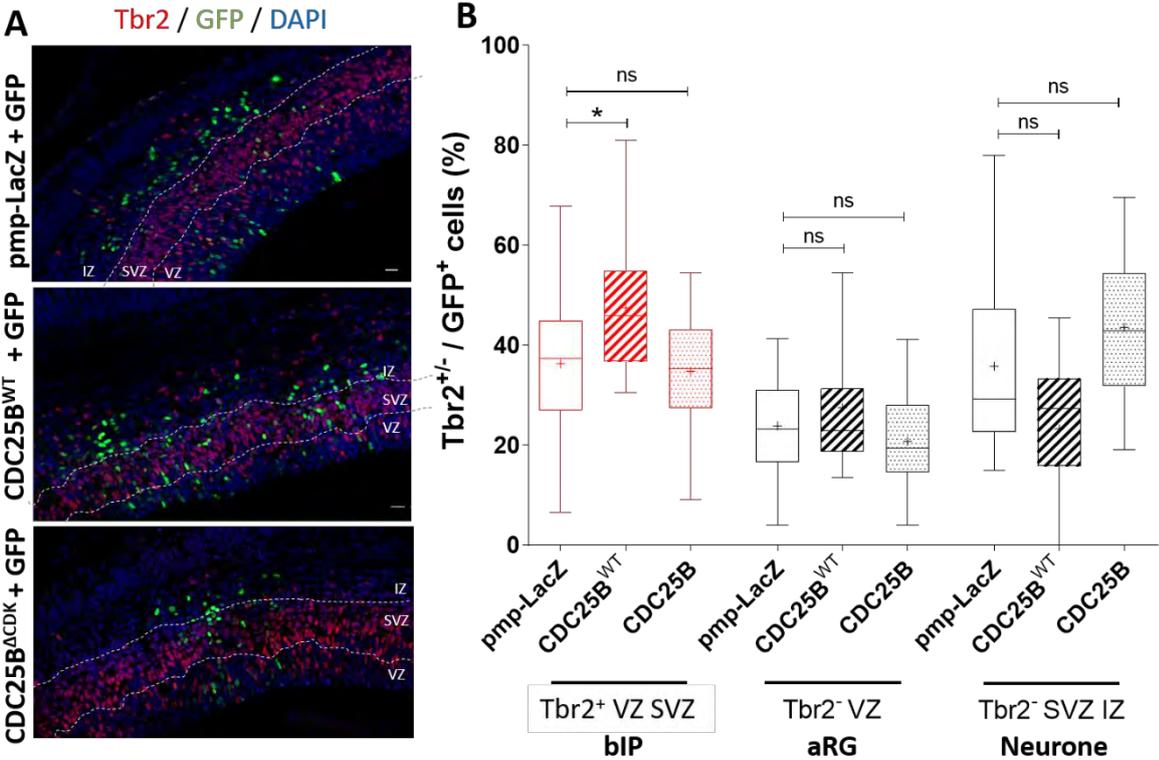
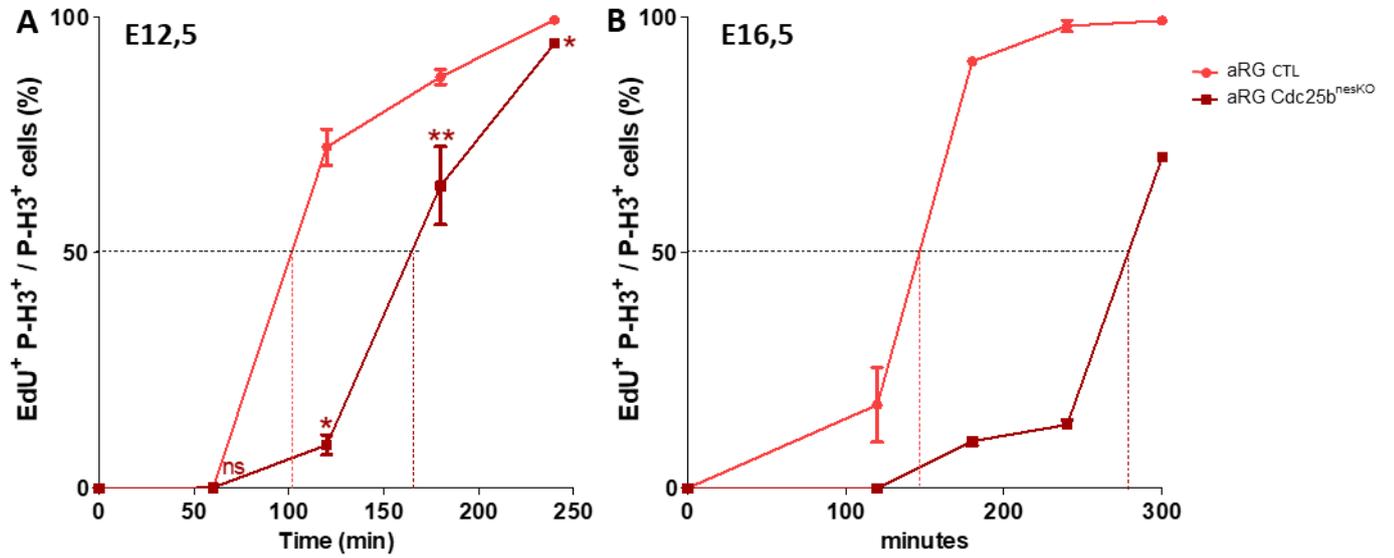


Figure S1



C	ΔT_{G2}	E12,5	E14,5	E16,5
aRG	+1h03	+1h40	+2h12	
bIP	+1h10	+0h40	+2h01	

Figure S2

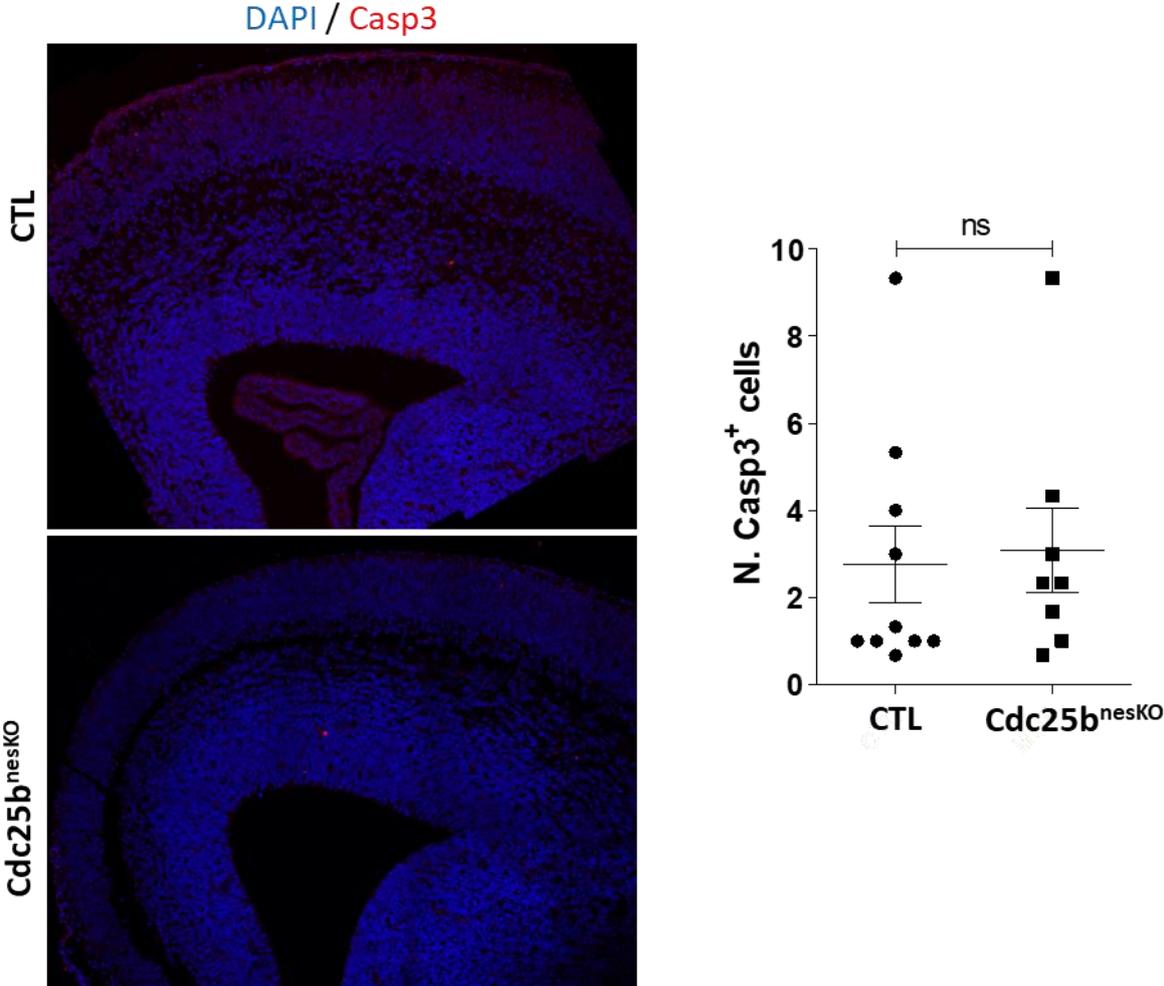


Figure S3

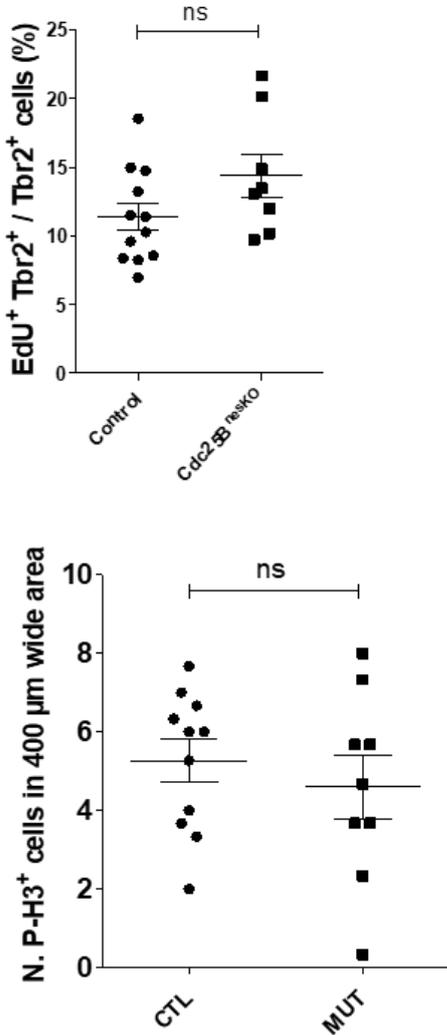


Figure S4

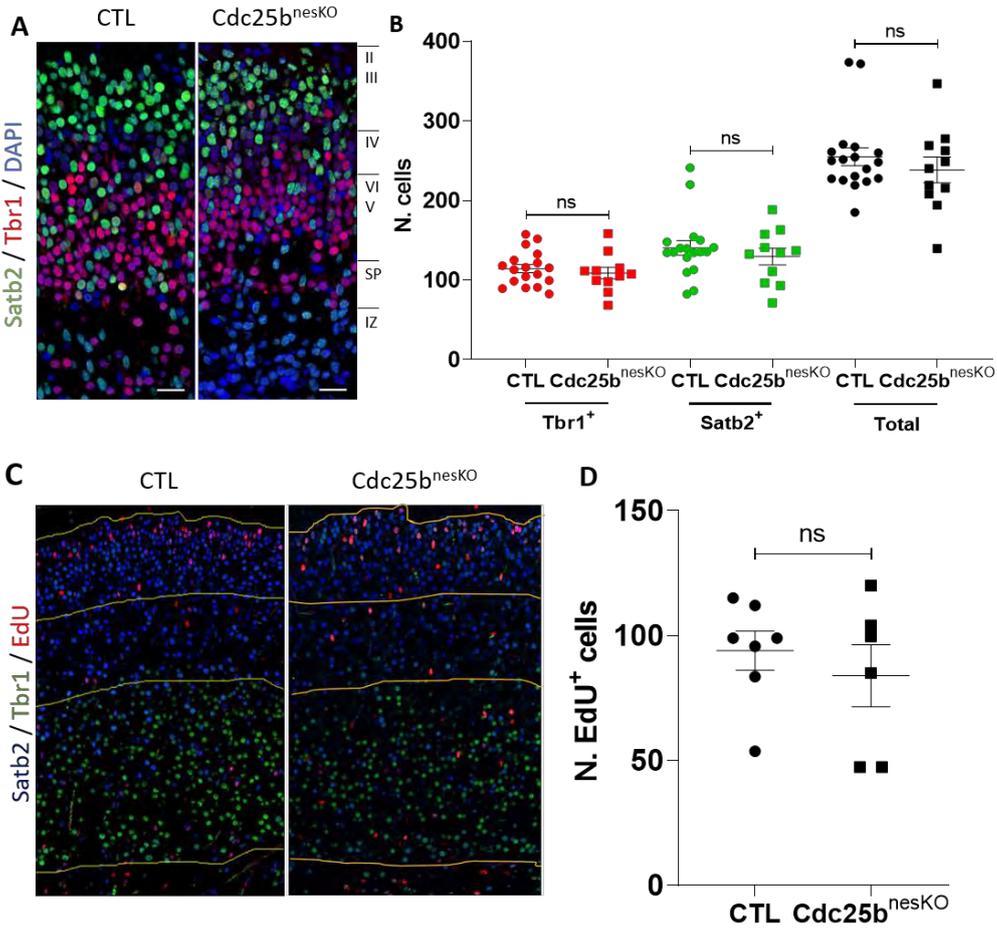


Figure S5

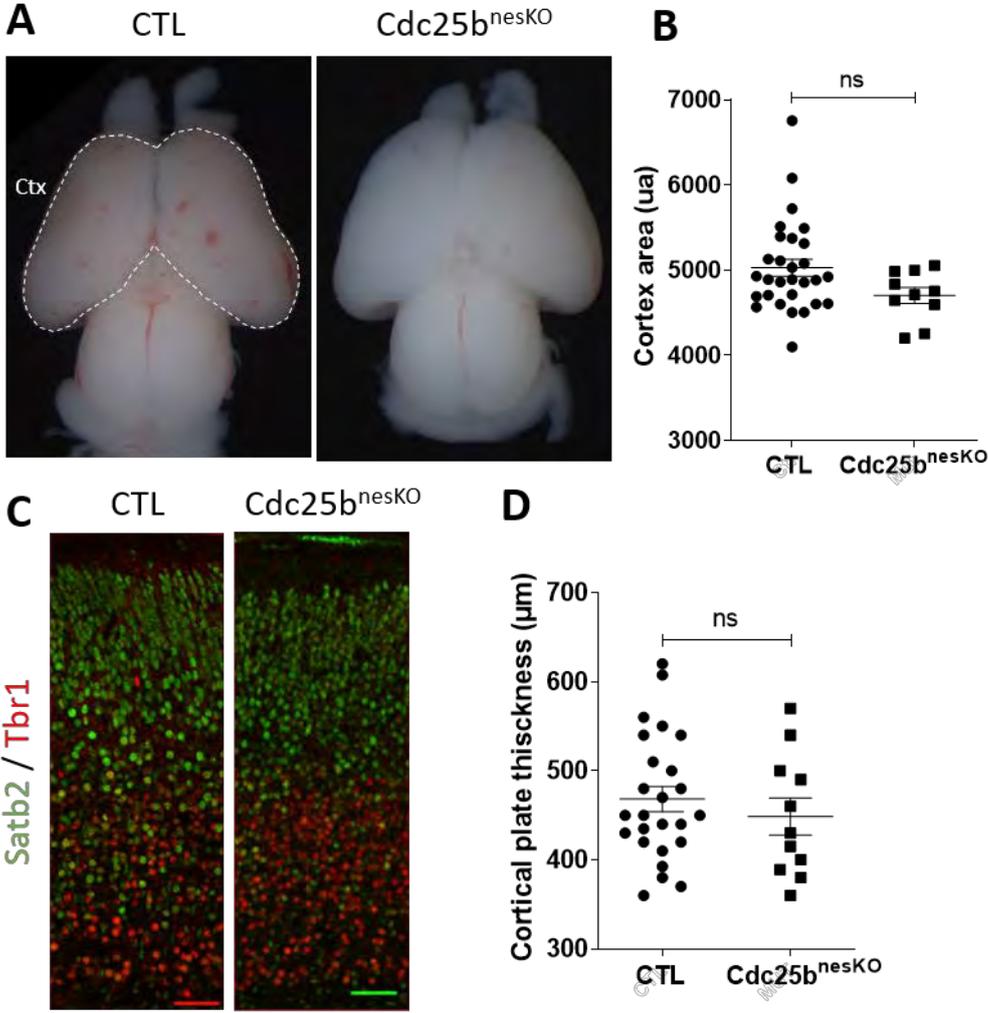


Figure S6

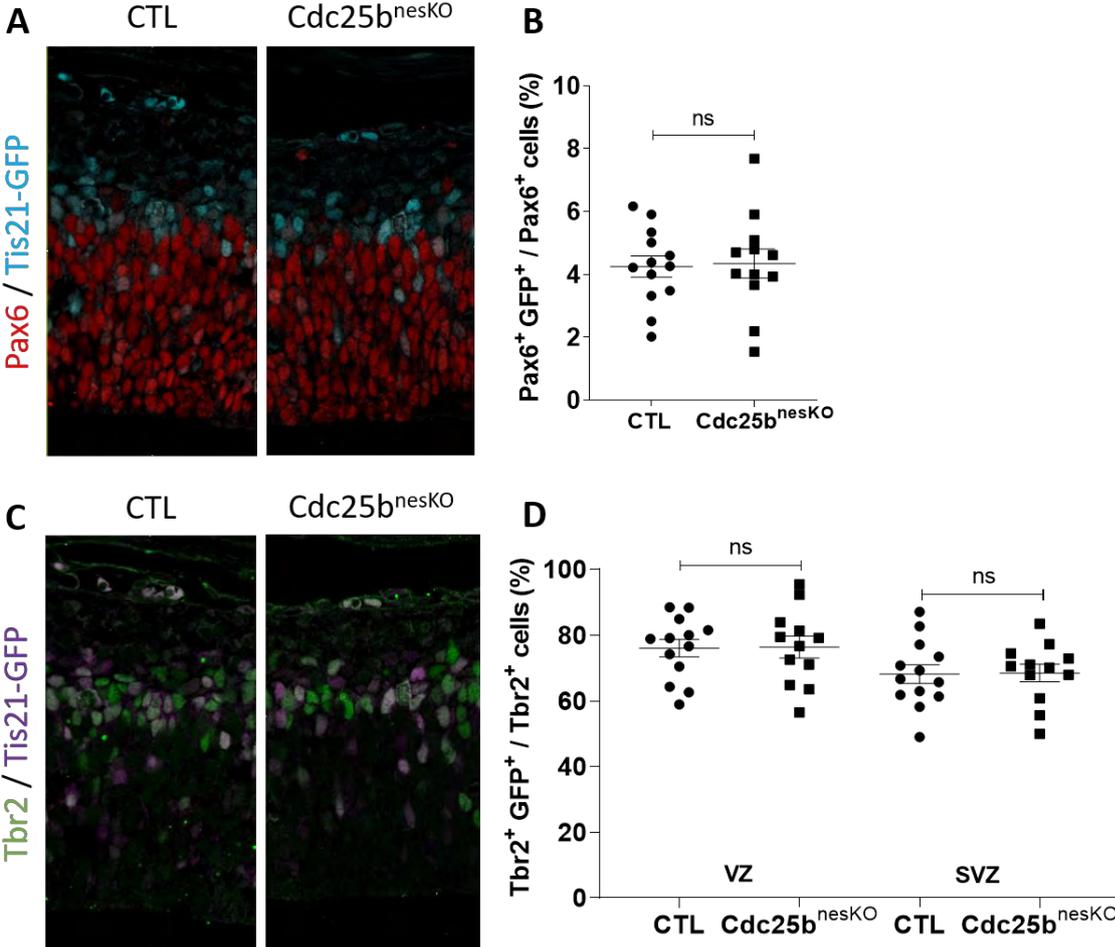


Figure S7

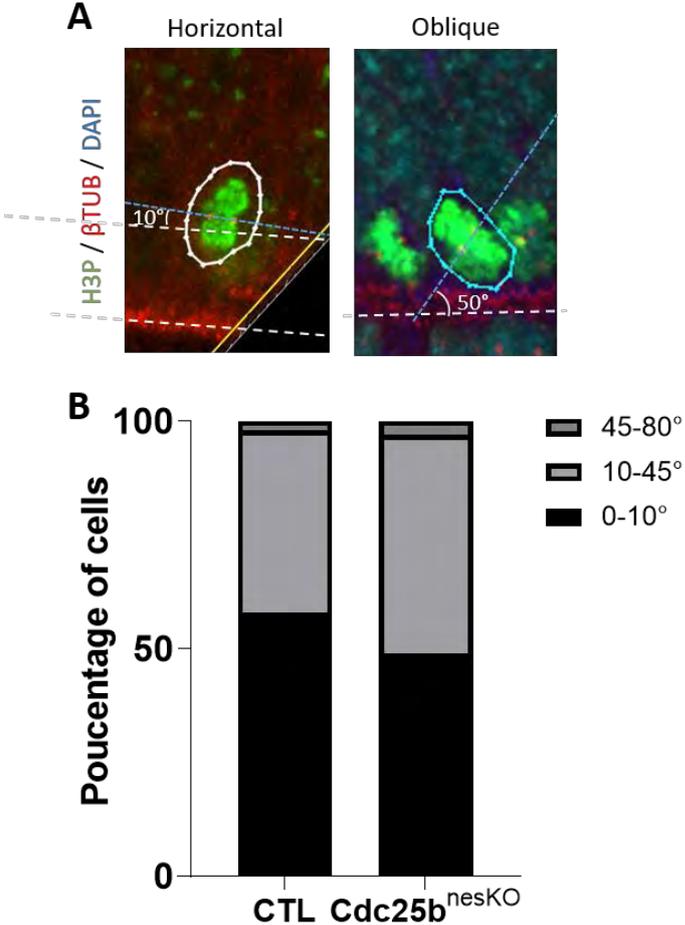


Figure Legends

Figure 1. Cdc25b is specifically expressed in Pax6+ aRG cells. A, Cdc25b in situ hybridization on mouse embryo coronal sections from E10,5 to E16.5. B, Zoom on the dashed area at E14,5: co-staining of Cdc25b (in situ hybridization) and Tbr2 expression (immunofluorescence). C, RNA-Seq quantification of Cdc25b expression in aRG, bIP, bRG cells and cortical neurons (Florio et al.2015). D, Cortical slice of a E10.5 embryo after crossing the Nestin-Cre line with a Rosa-Tomato line.

Figure 2. Cdc25b loss-of-function increases G2-phase duration without affecting total cell cycle length. A, P-H3 labelling after 2, 3 and 4 hours of EdU pulse in CTL and Cdc25b^{nesKO} embryos. B, Quantification of the proportion of apical (aRG) and basal (bIP) EdU⁺/P-H3⁺ cells (A, arrows). T_{G2} corresponds to the time when 50% of P-H3⁺ cells are EdU⁺ (indicated by the dotted lines). T-test Mann-Whitney. C, Quantification of P-H3⁺ cells at the apical side of CTL and Cdc25b^{nesKO} cortices. D, EdU/Tbr2 double labelling to determine the proportion of S-phase progenitor. E, Quantification of EdU⁺ cells among VZ Tbr2⁻ (aRGs) cells in CTL and Cdc25b^{nesKO} embryos. F, EdU/BrdU double labelling experiments to determine total cell cycle length (T_C) and S-phase duration (T_S) of VZ Pax6⁺ cells, which were calculated from counting EdU⁺BrdU⁻ and EdU⁺BrdU⁺ cells as described ([Martynoga et al., 2005](#)). G, Dot plots represent the average length of measured T_C, T_S and deduced T_{G1} in aRGs of CTL and Cdc25b^{nesKO} embryos. H, Differences of T_C, T_S, T_{G2} and *deduced T_{G1} average length in aRGs of CTL and Cdc25b^{nesKO} embryos. I, CyclinD1/Tbr2 double labelling to determine the proportion of progenitors in G1-phase. J, Quantification of CyclinD1⁺ cells among VZ Tbr2⁻ (aRGs) cells in CTL and Cdc25b^{nesKO} embryos. Scale bar represents 20 μm. Mixed model: * p-value < 0,05. VZ = ventricular zone, SVZ = sub ventricular zone, IZ = intermediate zone. K, Flow cytometry analysis of the proportion of Pax6⁺ cells in each phase of the cell cycle in CTL and Cdc25b^{nesKO} embryos. Mann-Whitney t-test. Each point is the mean value of 3 sections/ embryo.

Figure 3. Cdc25b regulates basal progenitor ratio. A, Pax6 and Tbr2 immunofluorescence in E14,5 coronal brain section, in CTL and Cdc25b^{nesKO} embryos. B-D, Dot plots represent the number of VZ Pax6⁺ cells (B), VZ and SVZ Tbr2⁺ cells (C) and IZ Pax6⁺ cells (D) at E14,5 in CTL and Cdc25b^{nesKO} embryos. E, Pax6 and Tbr2 immunofluorescence in E16,5 coronal brain sections, in CTL and Cdc25b^{nesKO} embryos. F-H, Dot plots represent the number of VZ Pax6⁺ cells (F), VZ and SVZ Tbr2⁺ cells (G) and IZ Pax6⁺ cells (H) at E16,5 in CTL and Cdc25b^{nesKO} embryos. Mixed model. VZ = ventricular zone, SVZ = sub ventricular zone, IZ = intermediate zone. Scale bar represents 20 μm. Each point is the mean value of 3 sections/ embryo.

Figure 4. Cdc25b CTLs the basal progenitor ratio through CDK function **A**, Tbr2 immunofluorescence in E14,5 coronal brain sections after in utero co-electroporation of a pmp-LacZ (CTL), pmp-Cdc25b^{WT} or pmp-Cdc25b^{WTdelCDK} with a PCIG-GFP vector at E13,5. **B**, Dot plots represents the percentage of GFP⁺ cells which are Tbr2⁺, VZ Tbr2⁻ or SVZ / IZ Tbr2⁻ per section of pmp-LacZ , pmp-Cdc25b^{WT} or pmp-Cdc25b^{WTdelCDK} electroporated embryo. T-test Mann-Whitney. VZ = ventricular zone, SVZ = sub ventricular zone, IZ = intermediate zone. Scale bar represents 20 μ m. Each point represent the quantification for one embryo.

Supplemental figures

Figure S1: Measurement of the G2 phase length at E12.5 and E16.5 in CTL and *Cdc25b^{nesko}* aRGs

(A-B) Quantification of the proportion of $\text{EdU}^+\text{P-H3}^+ / \text{P-H3}^+$ cortical apical progenitors at E12.5 (A) and E16.5 (B) in CTL and *Cdc25b^{nesko}* embryos. TG2 is the time at which 50% of the P-H3^+ cells are EdU^+ (indicated by the dashed lines) Mann-Whitney t-test. **(C)**. Differences of T_{G2} length in aRGs of CTL and *Cdc25b^{nesko}* embryos. Number of embryos analysed by points at E12.5 (CTL: 3 to 6 vs. *Cdc25b^{nesko}*: 2 to 5) - and E16.5 (CTL: 3 to 5 vs *Cdc25b^{nesko}*: 1 to 4).

Figure S2: *Cdc25b* loss-of-function does not trigger apoptosis in the dorsal telencephalon

(A-B) Caspase 3 activated immunostaining on frontal brain sections of CTL and *Cdc25b^{nesko}* embryos at E16.5 **(A)**. Number of Caspase3⁺ cells in CTL and *Cdc25b^{nesko}* embryos **(B)**. Mixed model statistics. Each point is the mean value of 3 hemispheres/ embryo.

Figure S3: The reduction of TBR2+ bIPs is not due to a decrease of the proliferation rate

(A) Scatter plot representing the percentage of $\text{EdU}^+\text{Tbr2}^+$ cells among Tbr2^+ cells in E14.5 CTL and *Cdc25b^{nesko}* embryos. **(B)** Number of $\text{P-H3}^+\text{Tbr2}^+$ cells among Tbr2^+ cells in 400 μm wide area of E14.5 CTL and *Cdc25b^{nesko}* embryos. Mixed model statistics. Each point is the mean value of 3 sections/ embryo.

Figure S4: The number of cortical neurons produced at E16.5 is not significantly modified in *Cdc25b^{nesko}* embryos. **(A-B)** Immunofluorescence of Satb2^+ and Tbr1^+ neurons on frontal brain sections of CTL and *Cdc25b^{nesko}* embryos at E16.5 **(A)**. Quantification of Satb2^+ neurons (in green) or Tbr1^+ neurons (in red), and the total number of $\text{Satb2}^+\text{Tbr1}^+$ neurons (in black) at E16.5, in 113 μm wide windows **(B)**. Mixed model statistics. **(C-D)** Immunostaining at P0 of, of $\text{Satb2}^+\text{Tbr1}^+$ neurons among EdU^+ cells after injection at stage E16.5, on frontal sections of CTL and *Cdc25b^{nesko}* embryos, **(C)**. number of neurons born at E16,5 **(D)**. Mixed model statistics. Each point represent one embryo.

Figure S5: The size of the cortex is not affected in *Cdc25b^{nesko}* embryos at the postnatal stage P0. **(A-B)** Measurement of the area of the cortex of CTL and *Cdc25b^{nesko}* embryos (white dotted line) at stage P0 **(A)** Quantification by embryos **(B)**. Mixed model statistics. ua = arbitrary unit. Ctx = cortex. **(C-D)** Immunolabeling of Satb2 and Tbr1 neurons on frontal sections of CTL and *Cdc25b^{nesko}* brains at stage P0 **(C)** for measuring the thickness of the cortical plate by embryo **(D)**. Mixed model statistics. Each point represent the measure for one embryo

Figure S6: The number of neurogenic division is unchanged in *Cdc25b^{nesko}* mutant cortices

(A, C) Immunolabeling of Pax6 (A), Tbr2 (C) and GFP on E13.5 cortex frontal sections in CTL and Cdc25b^{nesko} embryos. (B) Percentage of Pax6⁺ cells expressing Tis-21-GFP in CTL and Cdc25b^{nesko} embryos. Mixed model statistics. (D) Percentage of Tbr2⁺ cells expressing Tis-21-GFP in VZ or SVZ of CTL and Cdc25b^{nesko} embryos. Mixed model statistics. Cells were quantified in a window of 113 μm width. Each point is the mean value of 3 sections/ embryo.

Figure S7: Cdc25b loss of function seems to modify mitotic spindle orientation during apical divisions. (A) Immunolabeling of centrosomes with γ tubulin, nuclei splitting with H3P and chromatin labeling with DAPI. Typical representation of a so-called "horizontal" division and of an "oblique" division. The crossing of the blue line (which passes through the two centrosomes of the cell) and the white line (which marks the ventricle of the cortex) forms an angle of division, the degree of which defines the type of division. (B) Stacked bar graph showing the percentage of cells having a division angle between 0 and 10 $^{\circ}$ (horizontal), 10 and 45 $^{\circ}$ (oblique) or 45 and 80 $^{\circ}$ (oblique), for CTL and Cdc25b^{nesKO} conditions. Number of cells analyzed: CTL = 106, Cdc25b^{nesKO} = 93.

Annexe 3

Neurogenic decisions require a cell cycle independent function of the CD25B phosphatase.

Bonnet F#1, Molina A#1, Roussat M1, Azais M2, Bel-Vialar S1, Gautrais J2, Pituello F1, Agius E1.

1 Centre de Biologie du Développement, Centre de Biologie Intégrative, Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France.

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

Contributed equally¹ Centre de Biologie du Développement (CBD), Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse, CNRS, UPS, France.

* Corresponding author

Elife. 2018 Jul 3;7. pii: e32937. doi: 10.7554/eLife.32937.

KEYWORDS: CDC25 phosphatases; cell cycle; chicken; developmental biology; interkinetic nuclear movement; mouse; neural stem cells; neural tube; vertebrate embryo

PMID: 29969095

PMCID: [PMC6051746](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC6051746/)

DOI: [10.7554/eLife.32937](https://doi.org/10.7554/eLife.32937)



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

*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.

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>

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^{ACD18} 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^{fl/fl}* 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/fl}* embryos (*Cdc25b^{wt/ko}*, 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/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/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/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/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/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,

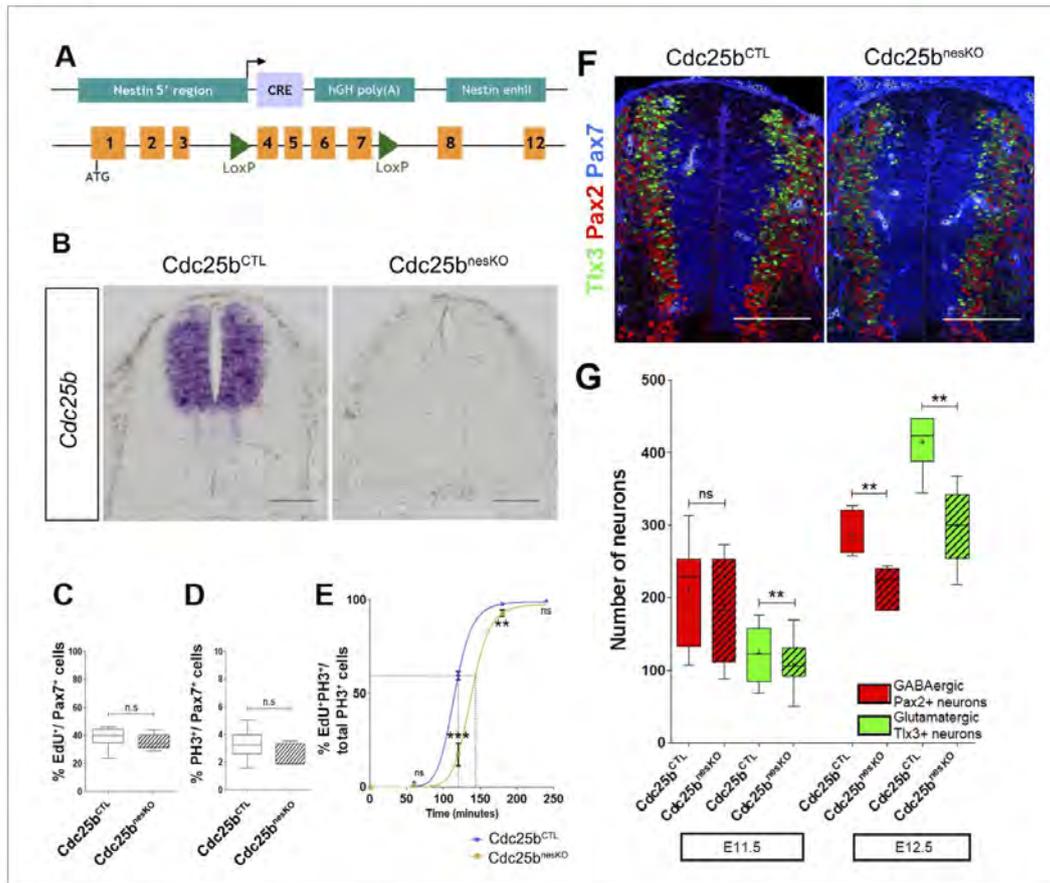


Figure 1. Cdc25b conditional genetic loss-of-function increases the G2-phase length and impairs dorsal spinal neurogenesis. (A) Scheme of the genetic construction for *Cdc25b* conditional loss-of-function. (B) *Cdc25b* *in situ* hybridization at E11.5 in control (*Cdc25b*^{CTL}) and conditional nesKO (*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 μ m.

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 dLA to dLB 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

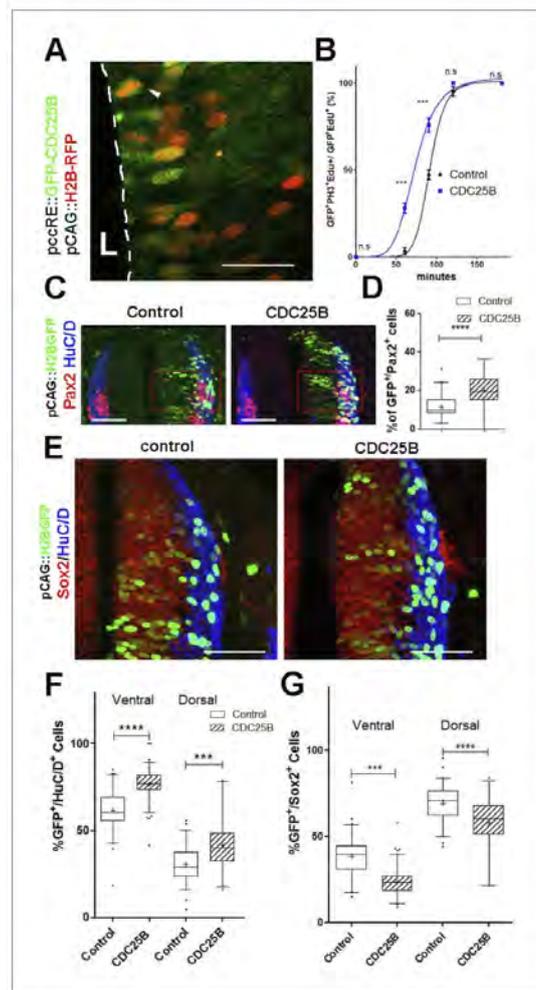


Figure 2. CDC25B speeds up neuronal production. (A) Cross section of E2.5 chick spinal cord 24 hr after electroporation of pCAG::H2B-RFP vector and pccRE::GFP-CDC25B vector, followed by an anti-GFP immunolocalisation. Note that the protein is expressed in the dorsal neuroepithelium in cells exhibiting 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

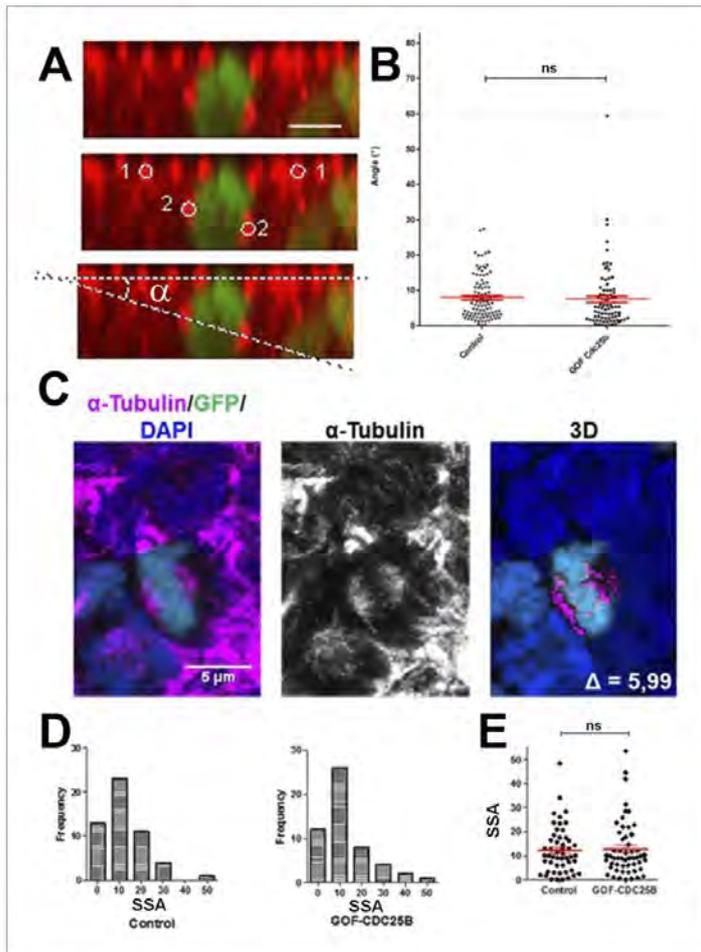


Figure 3. CDC25B gain-of-function does not affect mitotic spindle orientation or spindle-size asymmetry (SSA). **(A)** Representative Z plane image of an anaphase cell expressing H2B-GFP that decorates chromosomes (green) and immunostained with anti γ tubulin antibody to label centrosomes (red). Aligned 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. $\Delta = 5,99$ **(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 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

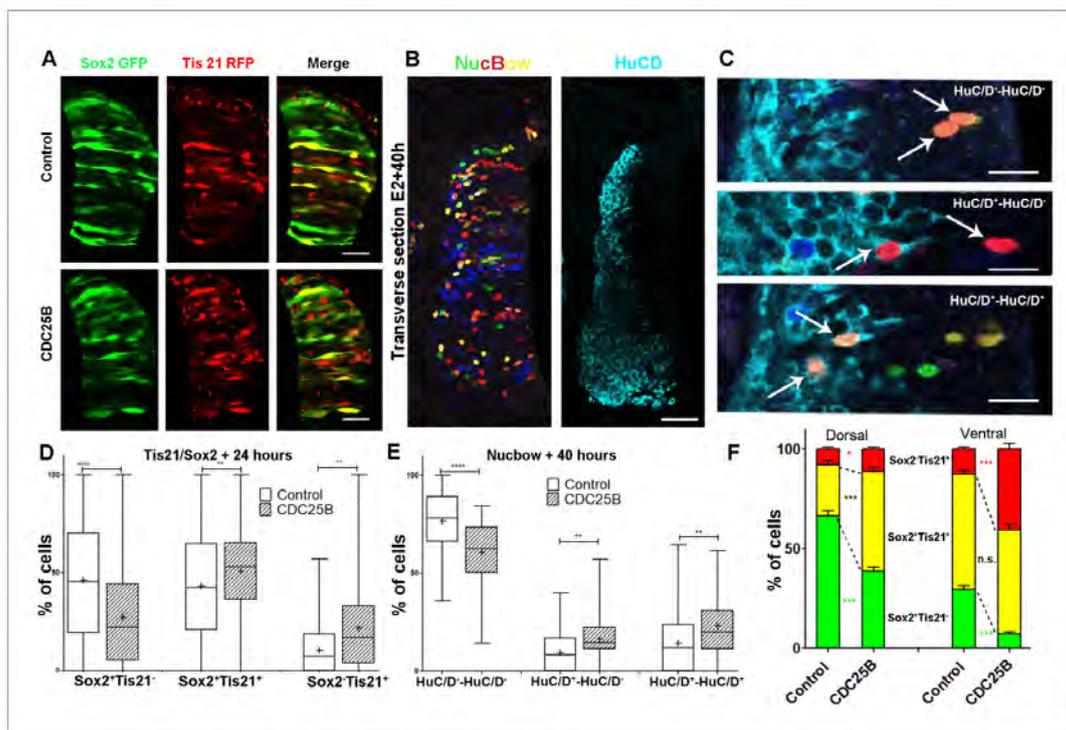


Figure 5. CDC25B gain-of-function promotes neurogenic divisions. (A) Representative cross-sections of HH17 chick spinal cord, 24 hr after electroporating Sox2::GFP and Tis21::RFP reporters, plus a control vector pccRE::lacZ, or a pccRE::CDC25B vector. Scale bars indicate 50 μ m. (B) Representative cross-sections 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>

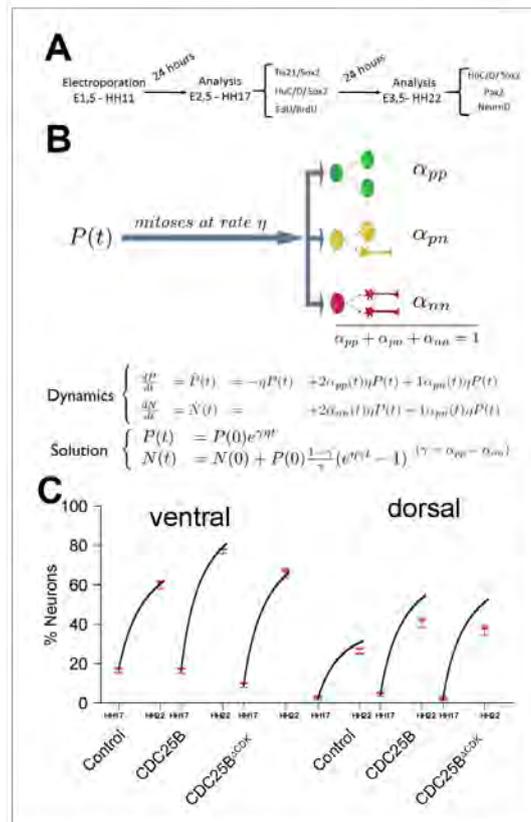


Figure 6. Mathematical model linking the mode of division to the fraction of neurons generated. (A) Scheme of the experimental time course. Neural tubes are electroporated at stage HH11, 24 hr (HH17) and 48 hr (HH22) post electroporation, cell cycle parameters, mode of division and progenitor/neuronal 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_{pm} 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 (Miguez, 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:

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

In this model, the evolution of the pool of progenitors is governed by α_{pp} and α_{pn} (because α_{nn} 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 (Miguez, 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:

$$\begin{cases} P(t) = P(0)e^{\gamma\eta t} \\ N(t) = N(0) + P(0)\frac{1-\gamma}{\gamma}(e^{\gamma\eta t} - 1) \end{cases} \quad (3)$$

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

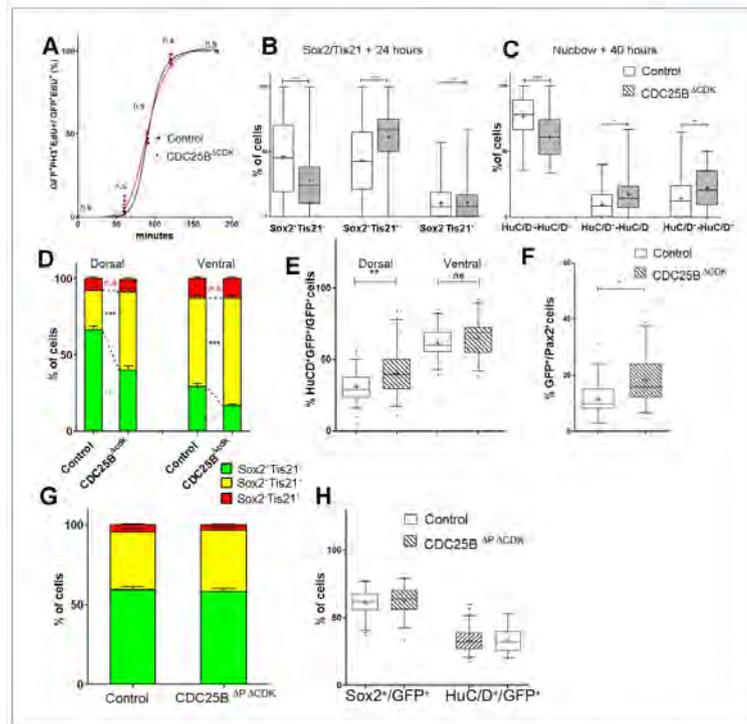


Figure 7. CDC25B gain-of-function promotes neurogenesis independently of CDK interaction. (A) Curves representing the percentage of electroporated GFP⁺EdU⁺PH3⁺ over the total GFP⁺EdU⁺ cells with increasing EdU exposure times: control (black), CDC25B^{ΔCDK} (red). Note that the curve for the CDC25B^{ΔCDK} 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^{ΔCDK} vectors in the entire spinal cord. Data represent the means ± SEM of 3 different experiments with 6 control and 6 CDC25B^{ΔCDK} 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^{ΔCDK} vectors in the entire spinal cord. Data represent the means ± SEM of 3 different experiments with 387 clones in 12 control embryos, and 692 clones in 10 CDC25B^{ΔCDK} 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^{ΔCDK} vectors, in the dorsal or ventral spinal cord. Data represent the means ± 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^{ΔCDK} gain-of-function. (E) Box plots (5/95 percentile) comparing the percentage of HuC/D⁺ cells within the electroporated population in control or CDC25B^{ΔCDK} 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^{ΔCDK} 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^{ΔCDK} 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^{ΔCDK} expressing vector in the dorsal half of the spinal cord. Data from three different experiments with 6 control embryos, and 9 CDC25B^{ΔCDK} 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^{ΔCDK} 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^{ΔCDK} embryos. The cross indicates the mean value.

DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.018>

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^{ΔCDK}, does not modify G2 phase length in neuroepithelial progenitors (Figure 7A, red curve). The effects of CDC25B^{ΔCDK} 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^{ΔCDK} decreases Sox2⁺Tis21⁻ progeny (from $46.1 \pm 2.1\%$ to $28 \pm 1.6\%$) and increases Sox2⁺Tis21⁺ progeny (from $43.4 \pm 1.9\%$ to $61.2 \pm 1.5\%$). The percentage of Sox2⁻Tis21⁺ progeny is not modified in that experimental context (from $10.5 \pm 0.8\%$ to $10.8 \pm 0.8\%$, Figure 7B). These data show that CDC25B^{ΔCDK} gain of function reduces proliferative divisions from $46.1 \pm 2.1\%$ to $28 \pm 1.6\%$ and increases neurogenic divisions from $53.8 \pm 2.1\%$ to $72 \pm 1.6\%$ (P-value < 0.0001). Analyzes using the Nucbow strategy, show a decrease in HuC/D⁻-HuC/D⁻ cells (from $76.5 \pm 2.6\%$ to $61 \pm 2.4\%$), an increase in HuC/D⁻-HuC/D⁺ cells (from $9.4 \pm 1.5\%$ to $17.1 \pm 2.5\%$) and in HuC/D⁺-HuC/D⁺ cells (from $14.1 \pm 2.3\%$ to $21.9 \pm 2.1\%$, Figure 7C) following CDC25B^{ΔCDK} expression. Therefore, CDC25B^{ΔCDK} 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_{ps} (hours)	T_{nn} (hours)	T_s (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

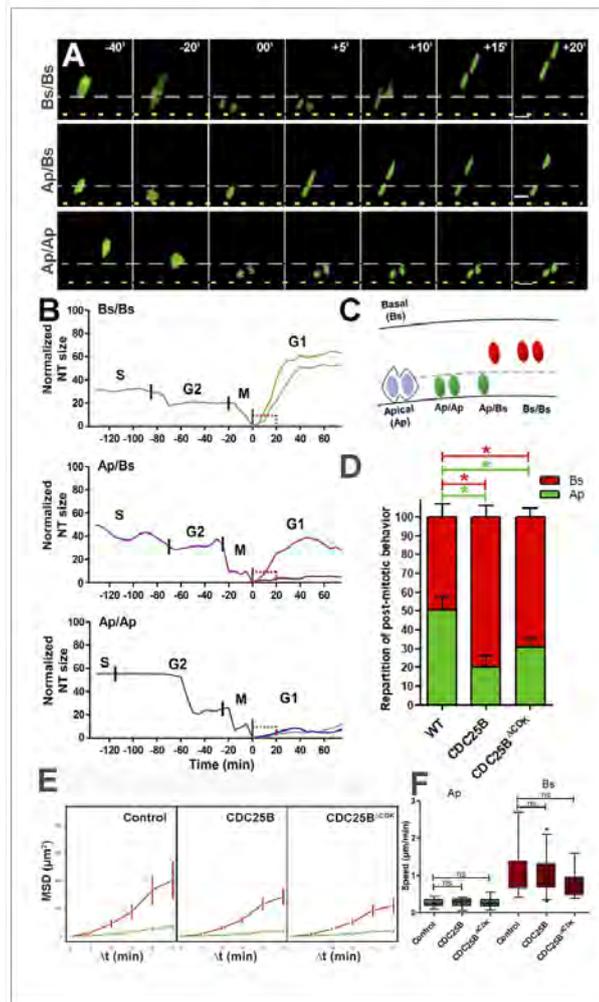


Figure 8. CDC25B affects G1 nuclei movement independently of CDK interaction. (A) Time-lapse series of the different daughter cell nuclear behaviors. Yellow dashed lines indicate the lumen; grey dashed lines represent 10% of the apico-basal length. Scale bars: 10 μm . (B) Quantitative tracking of nuclear 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 Imanis 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) (μm^2) vs time (Δt (min)) for Control, CDC25B and CDC25B^{ACDK}. (F) Bar graph of speed ($\mu\text{m}/\text{min}$) for Ap and Bs behaviors in Control, CDC25B and CDC25B^{ACDK}.

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:

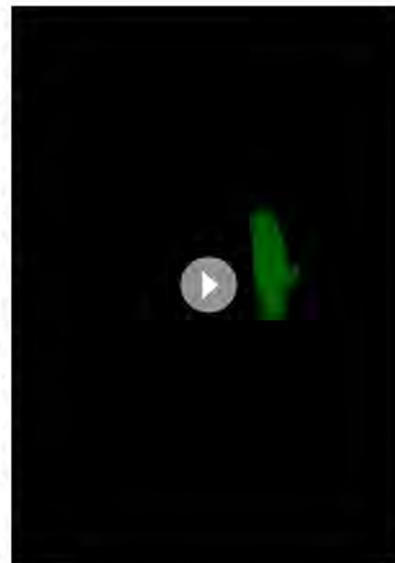
Figure supplement 1. Time-lapse series of neural progenitor cell electroporated with GFP-PCNA.

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.

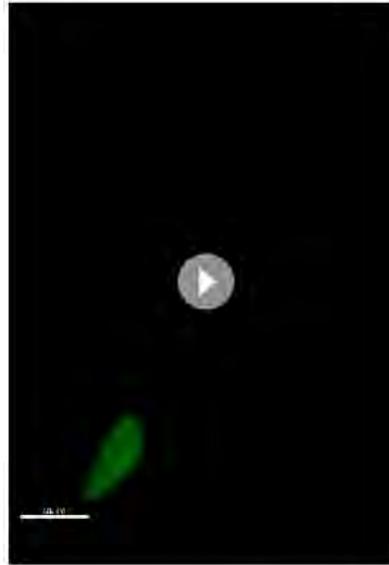
CDC25B is required for efficient neuron production in vertebrates

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.32937.018>



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>

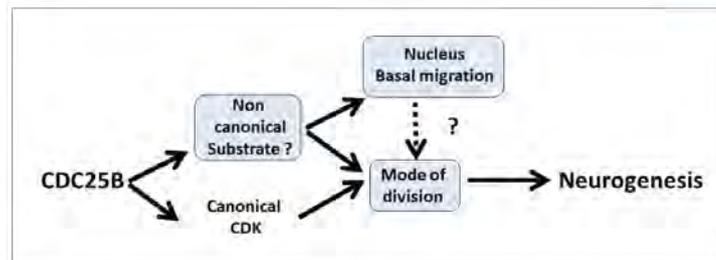


Figure 9. Schematic of CDC25B modes of action. CDC25B activity on an unknown substrate changes G1 nucleus basalward movement during Interkinetic Nuclear Migration (INM), and also acts on the mode of division leading to increased neurogenesis. It remains to be determined whether a link exists between 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^{ACDB} gain-of-functions (Figure 4C), 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^{ACDB} 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; Ollivera-Martínez 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*^{fl/-}) 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^{ACDB}, hCDC25B3^{APACDK}) under the control of a cis regulatory element of the mouse Cdc25B called pccRE. A control vector was generated with the β Gal gene downstream of the pccRE. All gain-of-function experiments were performed at 1.5 μ g/ μ l. For the Brainbow experiments, we used a pCX-Cre gift of X. Morin (Morin *et al.*, 2007), at 0.5 ng/ μ l; Nucbow a gift of J. Livet (Loulrier *et al.*, 2014) at 0.5 μ g/ μ l. The Sox2p-GFP, Tis21p-RFP, and NeuroD-luciferase constructs were obtained from E. Marti and used at 1 μ g/ μ l, 0.5 μ g/ μ l and 1 μ g/ μ l, respectively. pNLS EGFP-L2-PCNA was received from M.C. Cardoso (Leonhardt *et al.*, 2000) and used at 0.5 μ g/ μ l.

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 μ m 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: ACTCCTGTCGAAAGGGCTTCTGAAGAAGATGACGGATTTGTGGACATCCTGGAGAGTGATTTAAAGGATGACGAGAAGGTCCCCGCGGGCATGGAGAACCTCATTAGTGCCCCACTGGTCAAAAAGCTGGATAAGGAAGAGGAACAGGATCTCATGTTCAGCAAGTGCCAGAGGCTCTCCGCTCCCATCCATGCCATGCAGTGTGATCCGACCCATCCTCAAGAGGCTAGAGCGGCCCCAGGACCGGGATGTGCCTGTCCAGAGCAAGCGCAGGAAAAGTGTGACACCCCTGGAAGAGCAGCAGCTTGAAGAACCTAAGGCCCGTGCTTTTCGCTCAAAGTCGCTGTGTCATGAGATTGAGAATCCTGGATAGTGACCACCGTGGACTGATCGGAGATTACTTAAGGCCCTCCTGTCAGACCGTGGATGGCAAACACCAAGACCTTAAGTACATCTCACCAGAAATATGGTGGCCCTGTAAACAGGCAAGTTCAGCAACATCGTGGAGAAA TTTGTCATTGTGGACTGCAGATACCCCTATGAGTATGAAGGCGGGCATATCAAGATGCTGTGAACCTGCCCTGGAACGGGATGCTGAGACCTTTCT. 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 μ m 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 (Paco *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 Bénazéraf, 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 Mélanie 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, Mélanie 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.32937.037>

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
- Alkhtar 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, Zagodzón 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, Haubensak 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
- Caraballana 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, Marti E. 2005. Morphogens in motion: growth control of the neural tube. *Journal of Neurobiology* **64**:376–387. DOI: <https://doi.org/10.1002/jneub.20169>, PMID: 16041754
- Coronado D, Godet M, Bourillot PY, Taponnion Y, Bernat A, Petit M, Afanassieff M, Markossian S, Malashicheva A, Iacone R, Anastassiadis 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/nrnm1739>, 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. 1992. 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, Marti 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, Zinyk 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.a1>, 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
- Miguez 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, Julianti 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, Marti 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, Marti 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, Baladin 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, Goiaime 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
- Tsal 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, Dyas 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 (*Miguez, 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 (*Miguez, 2015*) and our model. In (*Miguez, 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 (*Miguez, 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:

$$\begin{cases} P(t) = P(0)e^{\gamma\eta t} \\ N(t) = N(0) + (1 - \gamma)\eta P(0) \left(\frac{1}{\gamma\eta} (e^{\eta\eta t} - e^{\eta\eta 0}) \right) \end{cases} \quad (13)$$

so that:

$$\begin{cases} P(t) = P(0)e^{\gamma\eta t} \\ N(t) = N(0) + P(0) \frac{1-\gamma}{\gamma} (e^{\eta\eta t} - 1) \end{cases} \quad (14)$$

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:

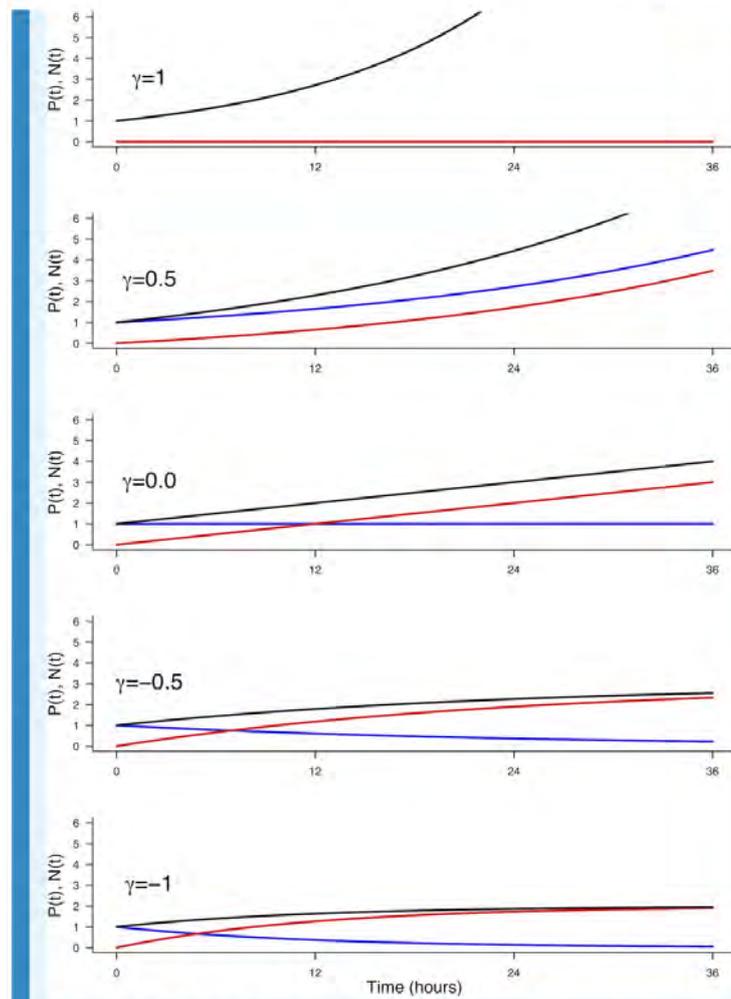
$$\begin{cases} P(t) = P(0)e^{\eta t} \\ N(t) = N(0) \end{cases} \quad (\text{for } \alpha_{pp} = 1, \alpha_{nn} = 0) \quad (16)$$

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 $2P(0)$:

$$\begin{cases} P(t) = P(0)e^{-\eta t} \\ N(t) = N(0) + P(0)(-2)(e^{-\eta t} - 1) \\ \quad = N(0) + 2P(0)(1 - e^{-\eta t}) \end{cases} \quad (\text{for } \alpha_{pp} = 0, \alpha_{nn} = 1) \quad (17)$$

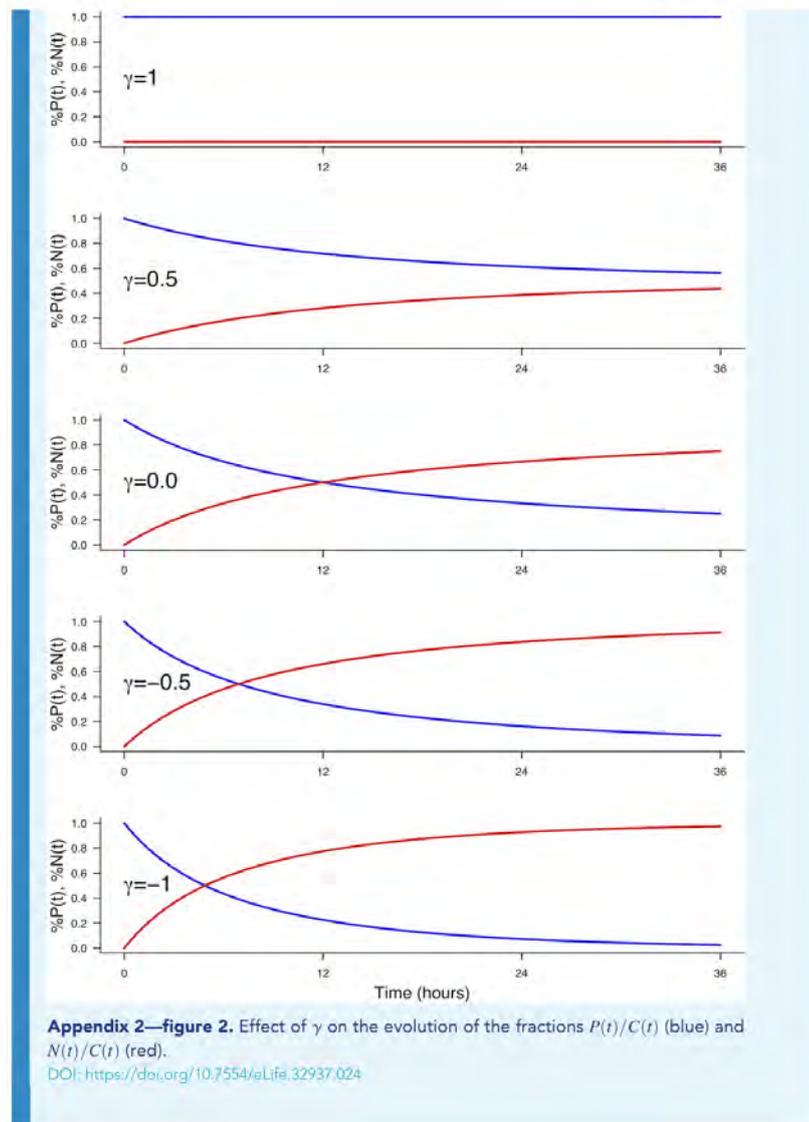
Regarding the total population $C(t) = P(t) + N(t)$ (**Appendix 2—Figure 1**), positive (or null) value of γ ($\alpha_{pp} \geq \alpha_{nn}$) allows an infinite growth of the total population $C(t)$ whereas the growth saturates as soon as $\gamma < 0$ ($\alpha_{pp} < \alpha_{nn}$). Since we made the 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 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 $P(0)$. 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:

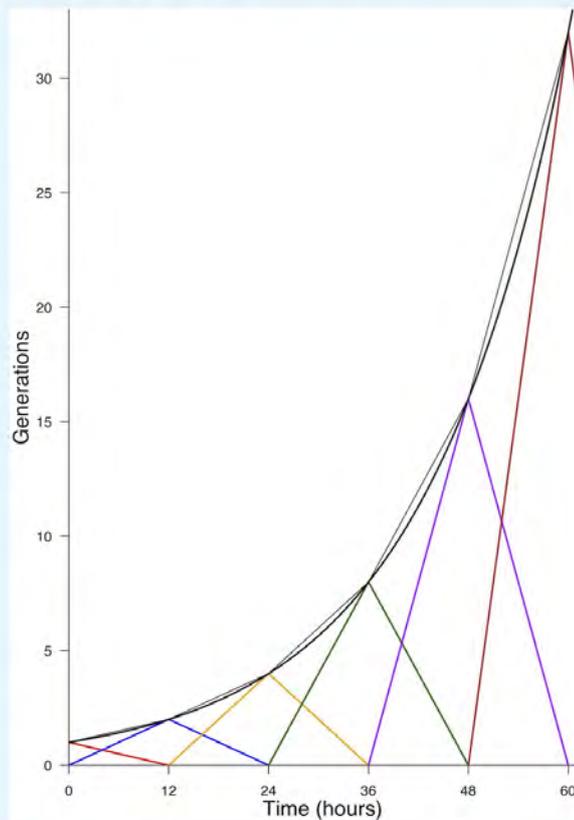
$$\begin{aligned} P_1(t) &= P_1(0) - (P_1(0)/\tau_m)t \\ &= P_1(0)(1 - t/\tau_m) \end{aligned} \quad (21)$$

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:

$$e^{\eta\tau_m} = P_2(\tau_m) = 2P_1(0) = 2P_1(0)e^{0} = 2P_1(0) \quad (22)$$

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 τ_{pp} , τ_{pn} , τ_{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 α_{pp} , α_{pn} , α_{nn} , we must conclude that:

$$\tau_{pp} = \frac{\tau_c}{\alpha_{pp}}, \quad \tau_{pn} = \frac{\tau_c}{\alpha_{pn}}, \quad \tau_{nn} = \frac{\tau_c}{\alpha_{nn}} \quad (27)$$

For $\tau_c = 12$ h, and a distribution (0.6, 0.3, 0.1), we would obtain:

$$\tau_{pp} = 20 \text{ h}, \quad \tau_{pn} = 40 \text{ h}, \quad \tau_{nn} = 120 \text{ h} \quad (28)$$

The main point is then: if the ratios between fractions of fate α_{pp} , α_{pn} , α_{nn} resulted only from differences in rates η_{pp} , η_{pn} , η_{nn} , the ratios between rates must be the same as the ratios between fractions:

$$\frac{\eta_{pp}}{\eta_{nn}} = \frac{\alpha_{pp}}{\alpha_{nn}}, \quad \frac{\eta_{pn}}{\eta_{nn}} = \frac{\alpha_{pn}}{\alpha_{nn}}, \quad \frac{\eta_{pp}}{\eta_{pn}} = \frac{\alpha_{pp}}{\alpha_{pn}} \quad (29)$$

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.

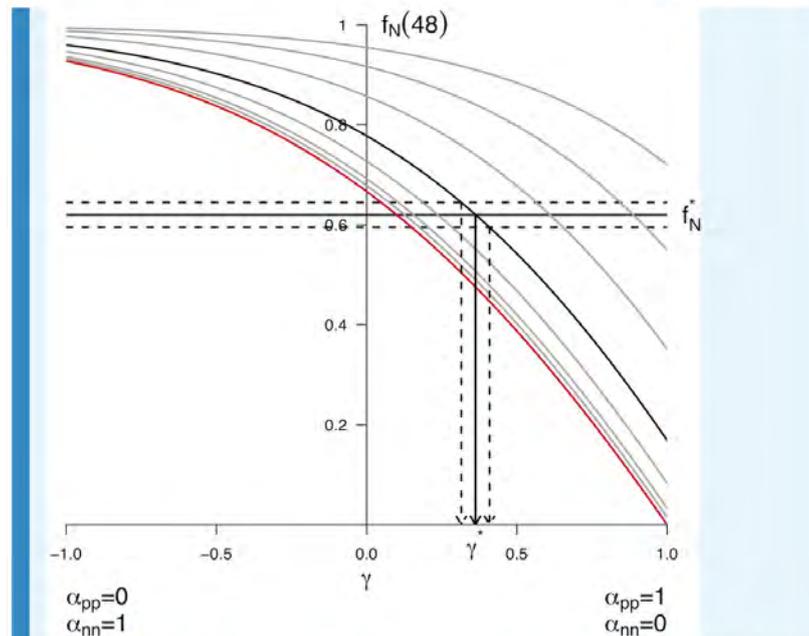
Considering $P(24) + N(24) = 1$ arbitrary total amount of cells at 24 hr, we can plug $N(24) = f_N(24)$ and $P(24) = 1 - f_N(24)$ into **Equation 14** and get:

$$\begin{cases} P(48) = (1 - f_N(24))e^{24\eta\gamma} \\ N(48) = f_N(24) + (1 - f_N(24))\frac{1-\gamma}{\gamma}(e^{24\eta\gamma} - 1) \end{cases} \quad (30)$$

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 :

$$f_N(48) = \frac{[f_N(24) + (1 - f_N(24))\frac{1-\gamma}{\gamma}(e^{24\eta\gamma} - 1)]}{[f_N(24) + (1 - f_N(24))\frac{1-\gamma}{\gamma}(e^{24\eta\gamma} - 1)] + [(1 - f_N(24))e^{24\eta\gamma}]} \quad (31)$$

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>

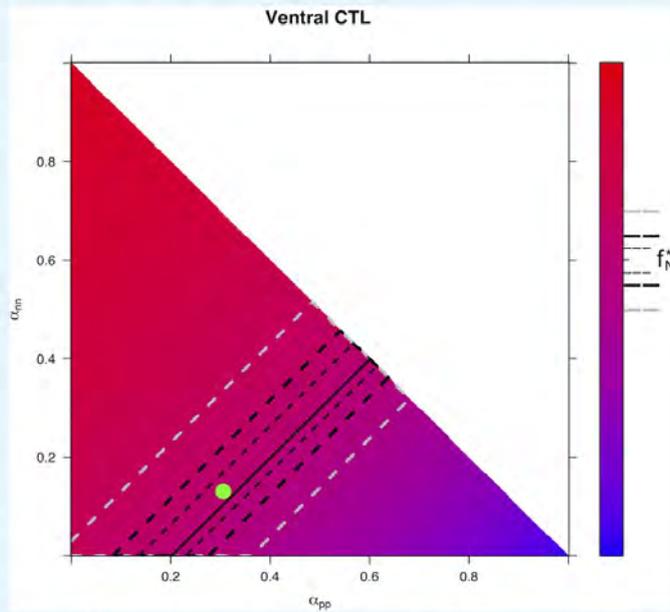
Now considering the full system with the three kinds of division, there is more than one unique triplet $(\alpha_{pp}, \alpha_{pn}, \alpha_{pm})$ that is compatible with the unique value of observed $(f_N(24), f_N(48))$. For instance, less nn-divisions can be compensated for by more pn-divisions, yielding 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

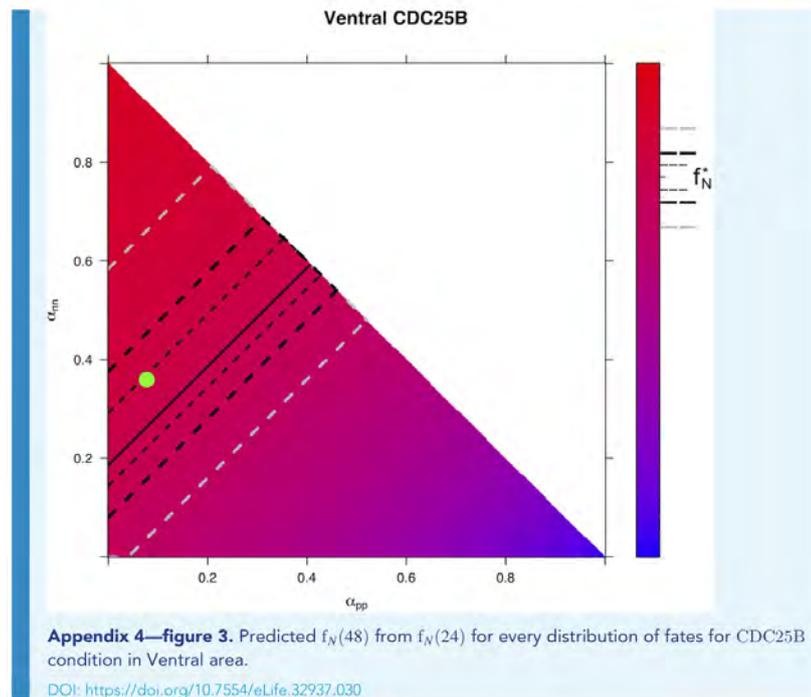
numerically the confidence regions for the distributions of fates that can yield $f_N^* \pm 2.5\%$, $f_N^* \pm 5\%$ and $f_N^* \pm 10\%$.

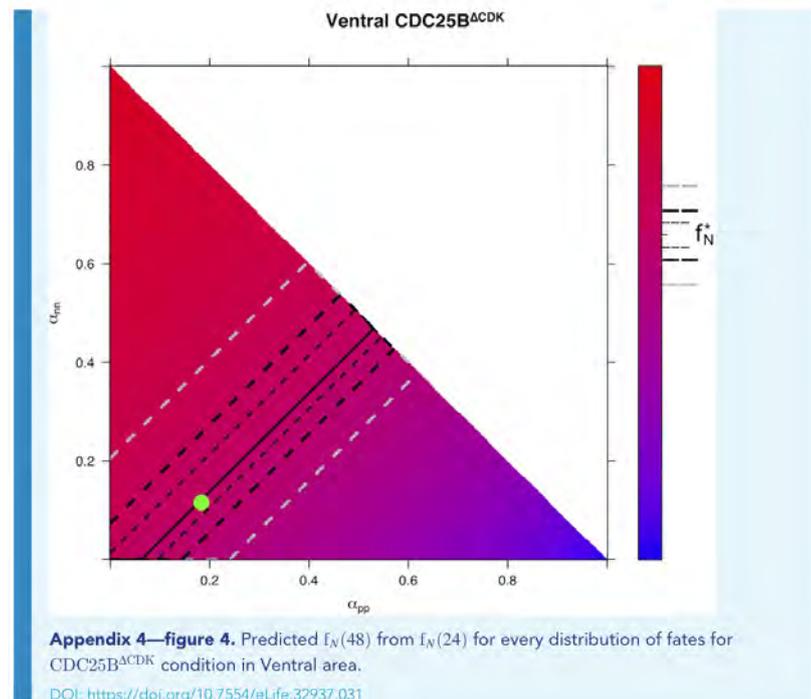
In the end, we also report the distribution of fates that was actually measured in each condition, and check in which confidence interval it is (Ventral zone: **Appendix 4—figure 2**, **Appendix 4—figure 3**, **Appendix 4—figure 4**, Dorsal zone: **Appendix 4—figure 5**, **Appendix 4—figure 6**, **Appendix 4—figure 7**).

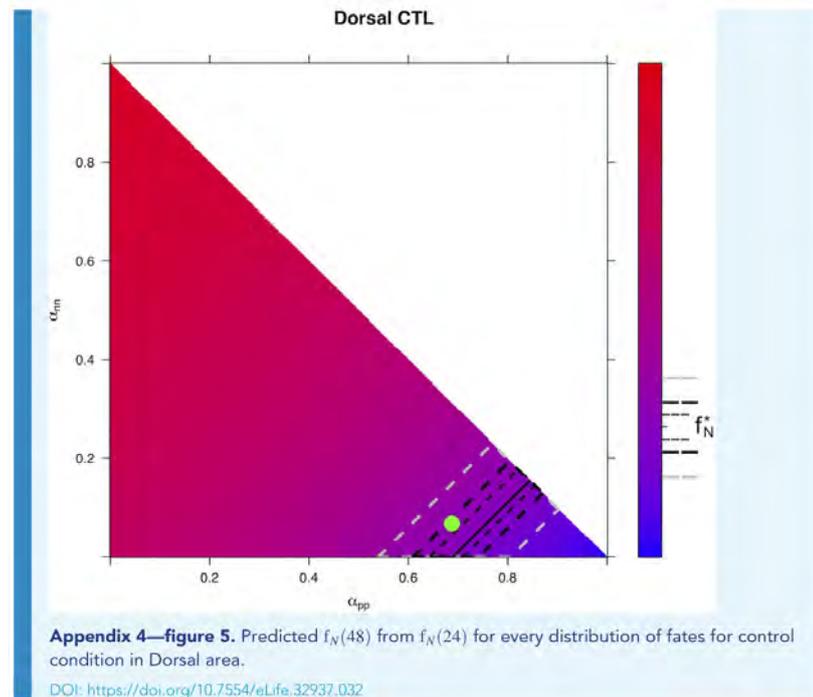


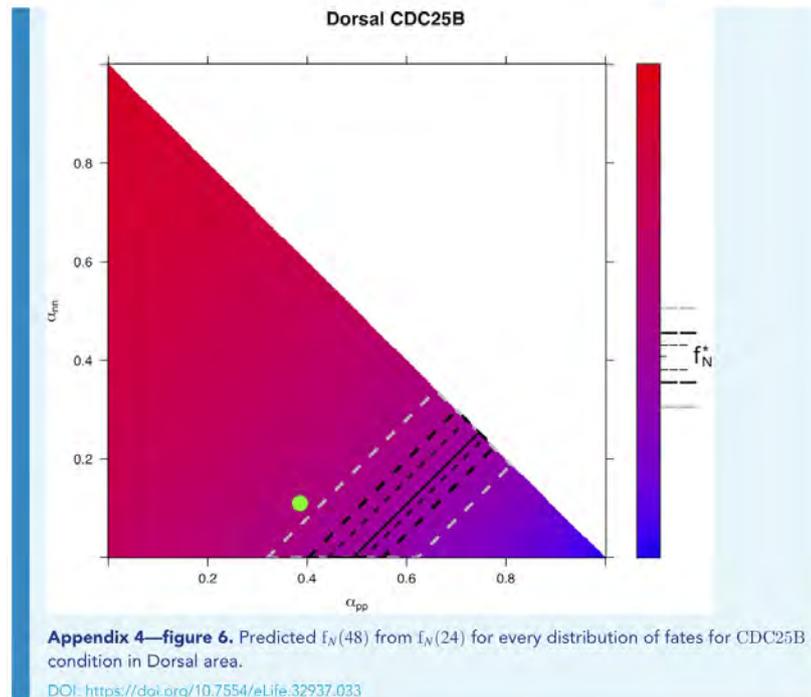
Appendix 4—figure 2. Predicted $f_N(48)$ from $f_N(24)$ for every distribution of fates for control condition in Ventral area. The color scale indicates $f_N(48)$. It is computed from the model, starting from the experimental value of $f_N(24)$ in the prevailing condition, and using all possible distributions of fates α_{pp} (x-axis), α_{nn} (y-axis) and $\alpha_{pm} = 1 - \alpha_{pp} - \alpha_{nn}$. The upper side of the triangle corresponds to $\alpha_{pm} = 0$. 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.

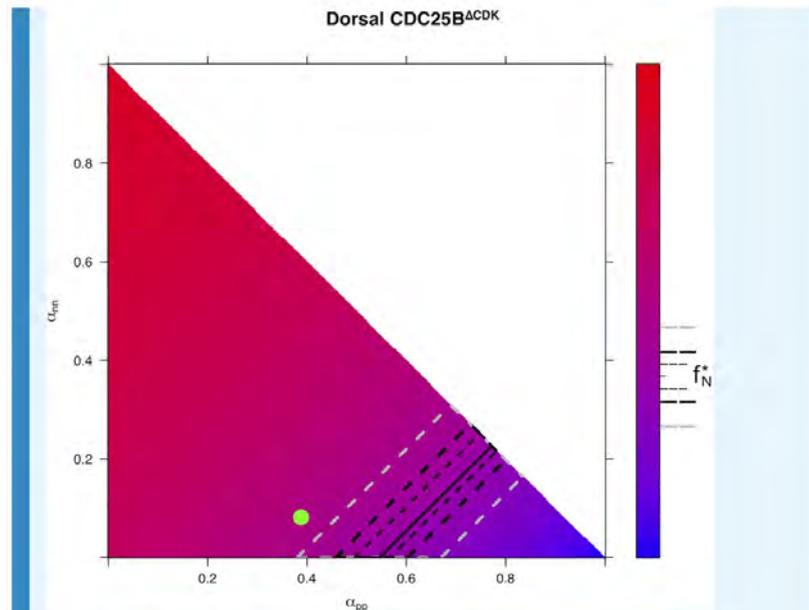
DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32937.029>











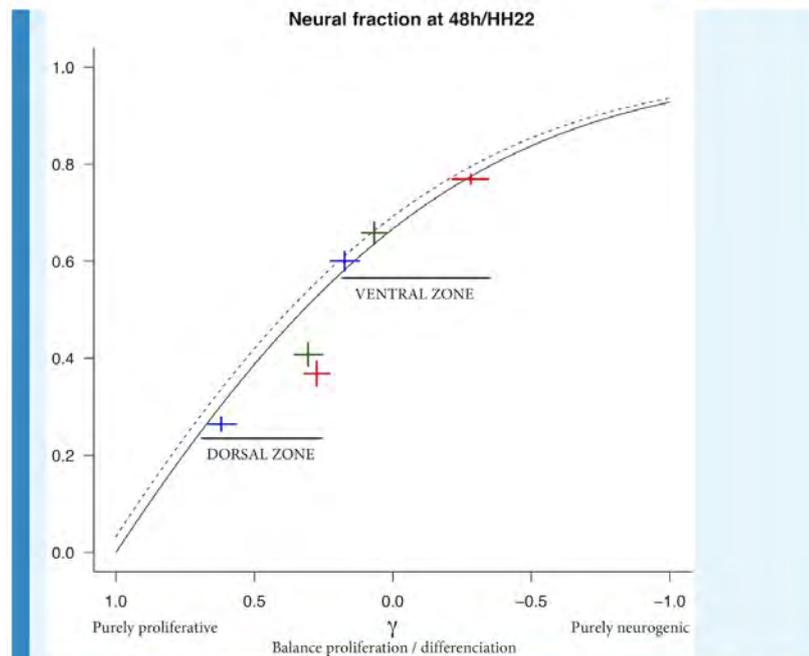
Appendix 4—figure 7. Predicted $f_N(48)$ from $f_N(24)$ for every distribution of fates for CDC25B^{ΔCDK} condition in Dorsal area.

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^{ΔCDK} experiments. Together, the observations indicate that CDC25B and CDC25B^{ΔCDK} 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>

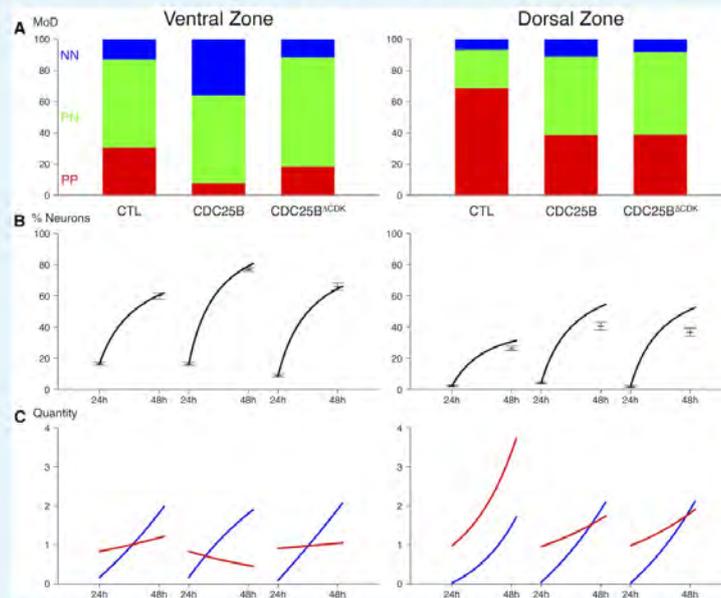
Such an increased proportion of neurons is actually compatible with two dynamical scenarios regarding how the absolute amounts of the two pools (progenitors, neurons) are modified by CDC25B gain-of-function: scenario (1) a speed-up of the neuron pool so that it increases faster under the gain-of-function 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—figure 9C**).

Under CDC25B gain-of-function in the dorsal neural tube (**Appendix 4—figure 9C-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—figure 9C-left).

Annexe 4

A long range distal enhancer controls temporal fine-tuning of PAX6 expression in neuronal precursors.

Lacomme M1, Medevielle F2, Bourbon HM2, Thierion E3, Kleinjan DJ4, Roussat M2, Pituello F2, Bel-Vialar S2.

1 Centre de Biologie du Développement (CBD), Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse, CNRS, UPS, France; Cellular Neurobiology Research Unit, Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), Montreal, Québec, Canada.

2 Centre de Biologie du Développement (CBD), Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse, CNRS, UPS, France.

3 Cancer Research UK Cambridge Institute, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom.

4 1UK Centre for Mammalian Synthetic Biology, University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom.

Dev Biol. 2018 Apr 15;436(2):94-107. doi: 10.1016/j.ydbio.2018.02.015. Epub 2018 Feb 25.

KEYWORDS: NEUROG2; Neural tube; PAX6; Retinoic acid; Transcriptional regulation

PMID:29486153

DOI:10.1016/j.ydbio.2018.02.015



A long range distal enhancer controls temporal fine-tuning of *PAX6* expression in neuronal precursors



Marine Lacomme^{a,b}, François Medevielle^a, Henri-Marc Bourbon^c, Elodie Thierion^c, Dirk-Jan Kleinjan^d, Mélanie Roussat^d, Fabienne Pituello^d, Sophie Bel-Vialar^{a,b}

^a Centre de Biologie du Développement (CBD), Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse, CNRS, UPS, France

^b Cellular Neurobiology Research Unit, Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), Montreal, Québec, Canada

^c Cancer Research UK Cambridge Institute, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom

^d IUK Centre for Mammalian Synthetic Biology, University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom

ARTICLE INFO

Keywords:
PAX6
 NEUROG2
 Retinoic acid
 Neural tube
 Transcriptional regulation

ABSTRACT

Proper embryonic development relies on a tight control of spatial and temporal gene expression profiles in a highly regulated manner. One good example is the ON/OFF switching of the transcription factor *PAX6* that governs important steps of neurogenesis. In the neural tube *PAX6* expression is initiated in neural progenitors through the positive action of retinoic acid signaling and downregulated in neuronal precursors by the bHLH transcription factor NEUROG2. How these two regulatory inputs are integrated at the molecular level to properly fine tune temporal *PAX6* expression is not known. In this study we identified and characterized a 940-bp long distal *cis*-regulatory module (CRM), located far away from the *PAX6* transcription unit and which conveys positive input from RA signaling pathway and indirect repressive signal(s) from NEUROG2. These opposing regulatory signals are integrated through HOMZ, a 94 bp core region within E940 which is evolutionarily conserved in distant organisms such as the zebrafish. We show that within HOMZ, NEUROG2 and RA exert their opposite temporal activities through a short 60 bp region containing a functional RA-responsive element (RARE). We propose a model in which retinoic acid receptors (RARs) and NEUROG2 repressive target(s) compete on the same DNA motif to fine tune temporal *PAX6* expression during the course of spinal neurogenesis.

1. Introduction

During development, formation of the different organs is driven by environmental and intrinsic regulatory signals that fine-tune gene expression both in time and space. This is particularly true during cell fate acquisition, as it often requires rapid and sharp modification of gene expression programs. This genetic control is achieved principally through the action of transcription factors (TFs) that act on genomic *cis* regulatory modules (CRMs), located in nearby non-coding regions or at larger distances from the regulated genes (Spitz and Furlong, 2012). Mutations in these non-coding genomic regions can induce subtle changes in protein levels in specific tissues, leading to developmental defects or diseases (Kleinjan and van Heyningen, 2005). Understanding how positional and temporal cues are interpreted at the genomic level is thus a challenging issue and requires unraveling the functional interactions between transcriptional regulators and CRMs during development.

One important gene for which tight regulation is crucial is the

Paired domain TF *PAX6*, a master regulatory protein acting as a molecular switch to control cell fate and differentiation in the central nervous system (CNS), olfactory system and pancreas (Cvekl and Callaerts, 2016; Osumi et al., 2008; Simpson and Price, 2002; St-Onge et al., 1997; van Heyningen and Williamson, 2002). It has been shown that *PAX6* expression undergoes dosage variation that appears critical for cellular fate. This is evident in the developing eye, in which the loss of one allele of *PAX6* gives rise to haploinsufficiency, leading to the eye abnormality aniridia in human and *small eye* in mouse, while the loss of both alleles results in an absence of eyes (Cvekl and Callaerts, 2016). Functional dosage impact has also been observed in the spinal cord where the removal of *PAX6* alleles progressively leads to more precocious neuronal differentiation (Bel-Vialar et al., 2007; Sansom et al., 2009). In this tissue, *PAX6* is part of a combinatorial TF code that, under the influence of the SHH morphogen, sets up the different progenitor domains, giving rise to the different neuronal subtypes (Bricson et al., 1997; Pituello, 1997). In addition, *PAX6* dosage influences important neurogenesis steps. Indeed, while low

* Corresponding author.

<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.02.015>

Received 3 November 2017; Received in revised form 22 February 2018; Accepted 22 February 2018

Available online 25 February 2018

0012-1606/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

levels are permissive for proliferation, increasing PAX6 levels leads to cell cycle exit and neuronal commitment through the activation of the proneural *NEUROG2* gene (Bel-Vialar et al., 2007). Afterwards, PAX6 expression must be extinguished rapidly in committed neuronal precursors in order to allow subsequent neuronal differentiation. PAX6 dosage and temporal regulation therefore controls the timing of neuronal commitment and differentiation. The main molecular players regulating this temporal expression pattern have been identified. Initially, PAX6 expression is maintained OFF in the stem zone of the caudal neural tube through the repressive action of FGF signaling (Bertrand et al., 2000). Then, PAX6 is turned ON in neural progenitors in response to the retinoic acid (RA) signaling pathway (Díez del Corral et al., 2003; Novitsch et al., 2003) and upregulates *NEUROG2*, which in turn represses PAX6 expression in neuronal precursors (Bel-Vialar et al., 2007).

Given the importance of PAX6 temporal regulation for neuronal production, it is important to understand how these different regulatory signals coordinate their action on dedicated PAX6 CRMs to achieve the proper timing of PAX6 expression during neurogenesis. Both RA signaling and *NEUROG2* involve transcriptional regulation. The RA pathway acts through heterodimerization of the retinoic acid receptor (RAR) with the related retinoid X receptor (RXR) that together recognize specific RA Response Elements (RAREs) in the regulatory regions of their target genes (Janesick et al., 2015). *NEUROG2* is a tissue-specific bHLH transcription factor that heterodimerizes with widely-expressed bHLH proteins such as E12 or E47 and classically acts as a transcriptional activator (Bertrand et al., 2002). It can nevertheless inhibit gene expression through three different molecular mechanisms: (1) acting as (or recruiting) a repressor on E-box DNA-binding motifs in the regulatory regions of its target genes (Ross et al., 2003); (2) functioning as a transcriptional activator, upregulating in turn an intermediate transcriptional repressor (Kovach et al., 2013); or (3) acting independently of its ability to bind DNA, via a protein-protein interaction, sequestering the CBP/p300 co-activator (Ge et al., 2006; Sun et al., 2001). Hence, retinoic acid and *NEUROG2* could regulate PAX6 directly or indirectly and could act coordinately or independently through distinct molecular cues. Therefore the identification of PAX6 neural tube CRMs will be an essential step to identify the mechanistic logic behind PAX6 temporal regulation.

Using sequence conservation and DNaseI hyper-sensitivity assays (to identify nucleosome-free chromatin regions), several groups have identified a large number of CRMs within the PAX6 locus, most of them being required for PAX6 expression in the developing eye (Griffin et al., 2002; Kammandel et al., 1999); (Kim and Lauderdale, 2006; Kleinjan et al., 2004; Kleinjan et al., 2006; McBride et al., 2011; Oosterveen et al., 2012; Plaza et al., 1995b; Williams et al., 1998; Xu et al., 1999). Some of these PAX6-specific CRMs are found at a long distance, 3' of the PAX6 encoding sequences, in a large Downstream Regulatory Region (DRR) located within introns of the adjacent ubiquitously-expressed *ELP4* gene, and containing all the aniridia-associated breakpoints identified so far (Griffin et al., 2002; Kleinjan et al., 2004; Kleinjan et al., 2006; McBride et al., 2011). Several DNaseI hyper-sensitive sites have been characterized in the human DRR, named HS1 to HS7, that display tissue-specific expression in the developing eye and telencephalon (Kleinjan et al., 2006; Kleinjan et al., 2001; McBride et al., 2011). However, despite these extensive genomic dissections around the PAX6 locus, the regulatory logic controlling PAX6 expression in the neural tube has not yet been resolved.

In this study, we investigated in more detail the regulatory mechanisms governing the PAX6^{ON/OFF} switching in the developing neural tube. By performing sequence comparison between mammals and birds, chromatin accessibility mapping and functional assays, we identified within the PAX6 locus in the DRR distal region, a new 940 bp CRM (E940) driving specific reporter gene expression in the developing

neural tube and integrating both retinoic acid positive and *NEUROG2* negative signals. Through genomic sequence comparison with evolutionarily more distant organisms and fine functional dissection of E940 (Itasaki et al., 1999), we narrowed down the sequences responsible for positive and repressive activities to a 94 bp core region, called HOMZ, which is also highly conserved in the zebrafish. Using functional tests in the chick, we show that *NEUROG2* induced repression is indirect, involving the activation of an intermediate gene. Finally, we show that *NEUROG2* and RA exert their opposite activity through the same region in HOMZ, which contains a RARE and is enriched in tandemly-repeated predicted binding sites for nuclear receptors. Altogether our data allow us to propose a model in which temporal regulation of PAX6 expression in the neural tube is controlled through a long-range, short DNA enhancer that integrates opposing RA and *NEUROG2* regulatory inputs.

2. Results

2.1. Identification of a neural tube PAX6 CRM driving the retinoic acid and *NEUROG2* response

In order to decipher precisely the logic of PAX6^{ON/OFF} regulation, we needed to identify neural tube-specific PAX6 regulatory regions that could be driven by RA and *NEUROG2* signals. From the literature, two CRMs were described as driving consistent reporter expression in the neural tube in mouse or zebrafish: the mouse GBS (for Gli Binding Site), located within the 7th intron of PAX6 (Fig. 1A), isolated from a screen to find Shh responsive elements, (Oosterveen et al., 2012); and the mouse E55A, located 90 kb upstream of the P1 promoter (Fig. 1A), identified *in silico* by sequence comparison with the elephant shark (Bhatia et al., 2014). The mouse GBS does not contain any putative RAREs but has 2 putative *NEUROG1/2* binding sites, whereas E55A does not contain any predicted RAREs or E-boxes. We nevertheless analyzed these 2 characterized CRMs in light of our objective. E55A is poorly conserved in the chick; it does not drive LACZ expression at an early stage (HH13, Fig. S1) as expected if receiving a RA signal, and it displays only faint activity at a later stage (HH17, Fig. S1). The mouse GBS confers strong GFP expression in the chick neural tube from HH11 to HH17, but it does not respond to either *NEUROG2* or dnRAR overexpression (Fig. S2). We therefore searched for other putative CRMs that could convey PAX6 temporal cues.

To do so, we analyzed the chromatin landscape of the PAX6 locus using ATAC-seq and ChIP-seq data obtained in the mouse embryo at E8.5 and E9.5 (Thierion et al., 2017). We looked at two histone marks associated with enhancers, H3K4me1 and H3K27ac (Zhou et al., 2011) that have been analyzed in mouse whole embryos at E9.5. In parallel, we interrogated in E8.5 and E9.5 mouse embryos, chromatin accessibility in three dissected regions: a part corresponding to rhombomere 3 (r3), rhombomere 5 (r5) and the anterior part of the neural tube, at both (Thierion et al., 2017). As expected, E55A and GBS display high H3K4me1 and H3K27ac enrichment at E9.5 (Fig. S3), consistent with enhancer activity, and we also detected high peaks of accessibility at E55A and GBS positions in neural tube samples (Fig. S3). Interestingly, one of the DNaseI hyper-sensitive sites characterized in the human DRR, HS5 +, located 94 kb downstream of the PAX6 transcription units (Fig. 1A) and showing significant activity in the mouse neural tube in a *LacZ* reporter assay (McBride et al., 2011), also displays a signature of enhancer chromatin marks (Fig. 1B and Fig. S3). The human HS5 + contains three blocks of high sequence conservation in vertebrates of 940 bp, 83 bp and 821 bp, flanking exon 9 of the *Elp4* gene (Fig. S4). To narrow down the region driving neural tube activity, we examined in more detail the chromatin landscape of this region. In whole embryo extract, HS5 + displays high H3K4me1 enrichment and to a lesser extent some H3K27ac signal (Fig. 1B) suggesting that HS5 + might be active at E9.5. When looking at the chromatin accessibility

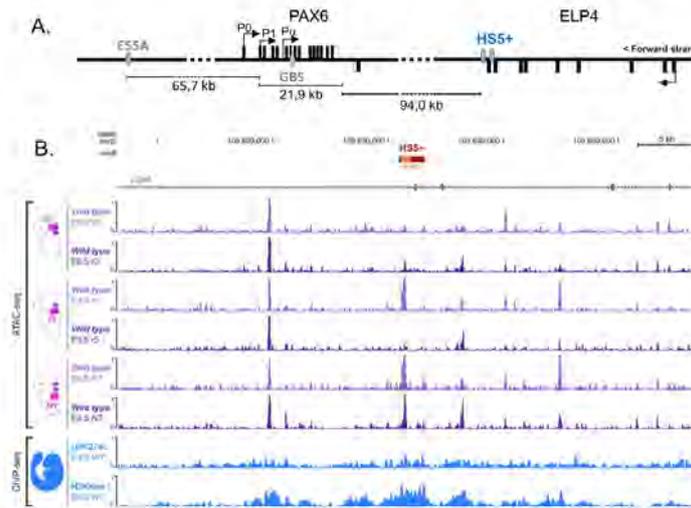


Fig. 1. Identification of a neural tube specific long range *PAX6* CRM. **A.** Schematic representation of the human *PAX6* locus. E55A, GBS and HS5+ positions are indicated. The HS5+ region surrounds the exon 9 of the *ELP4* gene, 94 kb downstream of the *PAX6* transcription units. **B.** Chromatin state and accessibility of the mouse HS5+. ATAC-seq was performed on dissected regions (r3, r5 and a more posterior region of the neural tube ("NT")) from wild type E8.5 embryos (light purple) and E9.5 embryos (dark purple). ChIP-seq was performed for the H3K27ac and H3K4me1 marks on wild type E9.5 whole embryos (blue). The mouse *Elp4* gene, region HS5+ (red), mouse E940 element included in the HS5+ (E940, orange) and a genomic scale are indicated at the top.

that has been analyzed specifically in the neural tube and compared to r3 and r5, we detected a high peak at the HS5+ position in r5 and neural tube at E8.5, and only in the neural tube at E9.5 (Fig. 1B). This demonstrates local chromatin accessibility at the HS5+ genomic region in the neural tube at the time when neurogenesis occurs, confirming the activity of this enhancer in a time and tissue specific manner. Moreover, the peak of open chromatin maps to the most proximal block of HS5+ (940 bp). We therefore tested separately the proximal and distal blocks of HS5+ in a reporter assay, in the mouse, and found that the 940 bp region was the only one displaying activity in the neural tube (Fig. 2Aa), confirming the result obtained in our chromatin accessibility analysis. We therefore characterized in more detail this small genomic region, from here on called E940.

2.2. E940 recapitulates temporal and spatial cues of *PAX6* expression in the developing neural tube

As observed in Fig. 2Aa, mE940 drives LacZ expression specifically in the neural tube up to the level of r5 and in a narrow region of the brain. We cloned the chick E940 CRM (E940, 911 bp long) and tested its capacity to recapitulate *PAX6* expression, using either a LacZ reporter or a nuclear d2EGFP destabilized reporter to analyze *de novo* the specificity of expression driven by the E940 enhancer. E940 drives significant expression in the chick neural tube as seen with both LacZ and GFP reporters (Fig. 2 and Fig. S5, S6). Co-electroporation of E940d2GFP with a RFP expressing control vector to identify electroporated cells, allowed us to depict precisely the specificity of E940 activity along the antero-posterior and dorso-ventral axes. Consistent activity is detected at early stages (HH11) in the neural tube and caudal hindbrain (Fig. S5). Caudally, E940 drives GFP expression in the transition zone and is not expressed in the stem zone (Fig. S6). This expression profile fits perfectly with normal expression of *PAX6* along the antero-posterior axis at this stage. We then analyzed E940 activity at later stages. At HH15 and HH17, GFP expression is still intense (Fig. S6b-b'''), but it becomes hard to detect in the whole embryo at later

stages (HH18; Fig. S6c-c'''). These observations indicate that similar to endogenous *PAX6* expression, E940 driven GFP signal is progressively narrowed down dorso-ventrally to the medial part of the ventricular zone during the course of neural tube maturation. In agreement with the mouse ATAC-seq data, E940 confers expression in r5 at stage HH11 but not HH17, corresponding to E8.5 and E9.5 in the mouse, and is never active in r3 (Fig. S5). When examined carefully in the D-V axis at HH15, only a subset of electroporated cells expresses the GFP, all located in the *PAX6* expression domain (Fig. 2B). The GFP is now restricted to few cells in the medial region of the ventricular zone (Fig. 2C), consistent with the faint GFP signal observed in the whole embryo at this stage (Fig. S6c-c'''). Immunostaining of *NEUROG2* shows that some GFP positive nuclei co-express low or intermediate levels of *NEUROG2*, consistent with our previous study showing that *NEUROG2* is progressively upregulated in *PAX6* positive cells, up to a critical threshold required to downregulate *Pax6* via a feedback mechanism (see Fig. 8 in (Bel-Vialar et al., 2007)). However, as expected from this same study, and consistent with the non-expression of *PAX6* in neurons, we couldn't detect any GFP signal in electroporated cells expressing the neuronal marker *Huc/D*, (Bel-Vialar et al., 2007).

In order to test whether E940 contains the molecular cues necessary to control *PAX6*^{ON/OFF}, we electroporated the E940d2GFP reporter together with either a dominant negative form of the RAR alpha (dnRAR), to block the RA pathway, or with *NEUROG2*. The overexpression of dnRAR or *NEUROG2* completely abolished the expression of E940d2GFP compared to a control vector (Fig. 2D). To quantify this effect we used a dual luciferase assay, with a construct in which E940 drives the expression of firefly luciferase (E940Luc). We observed that blockade of the RA pathway or *NEUROG2* overexpression leads to a strong decrease in E940Luc expression (Fig. 2D) (140 and 30 fold change respectively). This data indicates that E940 conveys both retinoic acid positive activity and *NEUROG2* repressive activity.

Altogether, these data show that this long range CRM integrates temporal cues for *PAX6* regulation in the neural tube.

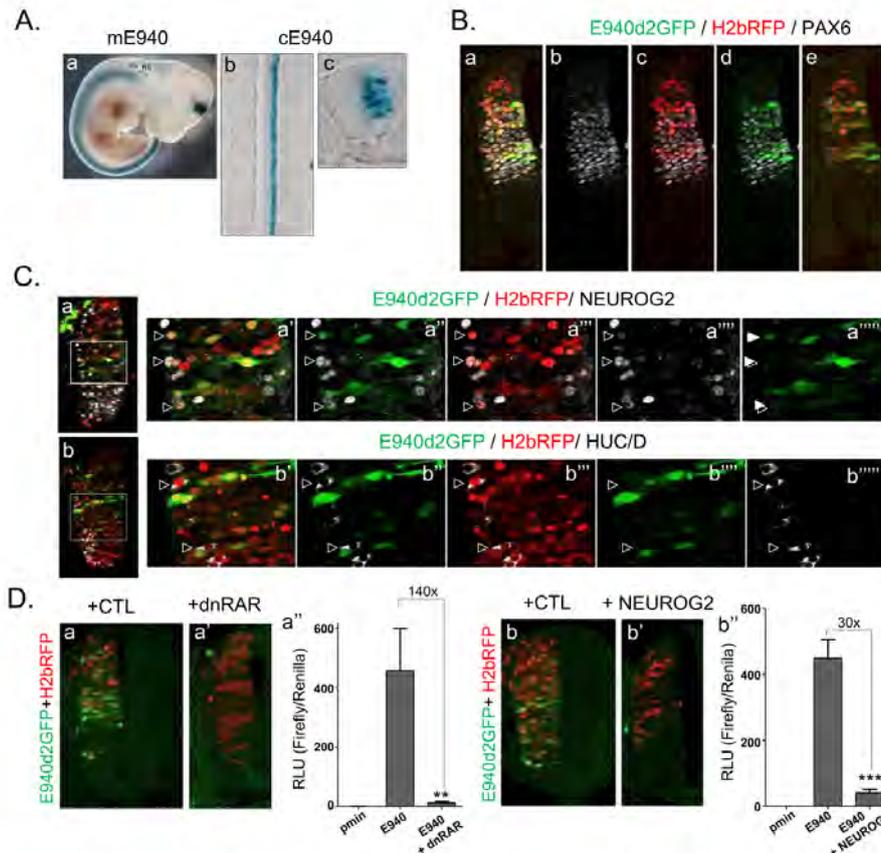


Fig. 2. E940 recapitulates temporal PAX6 expression during neurogenesis. **A.** Expression of a *LACZ* reporter gene under the control of the mouse E940 in a 10.5 dpc embryo from a transgenic line (a) or the chicken E940 (cE940) in a stage 15 electroporated chick neural tube (b, c). **B.** Expression of a d2GFP destabilized under the control of cE940 in a transversal section of electroporated neural tube (a-e). In red is the RFP signal given by a control vector co-electroporated with pLAC00E940-GFP. The GFP signal overlaps with the endogenous PAX6 protein detected in far red by immunohistochemistry. **C.** Stage HH17 chick embryos electroporated at HH12 with cE940d2GFP + H2bRFP. The GFP signal progressively decreases in NEUROG2 positive cells (arrowheads NEUROG2^{low}, GFP^{low} cells) and is completely extinguished in neurons labeled with HUC/D (arrowheads). **D.** Electroporation of dnRAR (a, a') or NEUROG2 (b, b') abolishes the activity of cE940 (GFP in green). In red the RFP signal is given by a control vector electroporated at the same time. (a'') and (b'') are histograms showing the relative luminescence signal (RLU) of the luciferase firefly under the control of a minimal promoter (pmin, n = 4 in a''; n = 9 in b'') or E940 (pmin-E940, n = 5 in a''; n = 9 in b'') co-electroporated with a control vector, dnRAR (n = 5) or NEUROG2 (n = 9). P value < 0.001 ***, P value < 0.01 **, Mann-Whitney test.

2.3. Three E940 subregions are sufficient to recapitulate the whole CRM activity

In order to identify which subregions are important for E940 activity, we performed a functional dissection using a dual firefly and Renilla luciferase assay (Fig. 3A). We first tested a series of fragments lacking either the 3' part (E940A), the 5' part (E940B) or deleted from both ends (E940C). Only E940B and E940C display noticeable activity, indicating that a region located in E940B and E940C but absent in E940A is critically required (Fig. 3A). By analyzing sequence conservation among species (Fig. S7), we found that E940B and E940C contain all or part of a 94 bp length region in E940 that shows strong conservation in zebrafish and that we called HOMZ for HOMologous to Zebrafish (Fig. S7 and Fig. 3B). Moreover, the peak observed in the ATAC-seq data is centered in this HOMZ region in the neural tube (Fig. 3C). We therefore analyzed the

importance of this evolutionarily-conserved region by testing an E940 version specifically deleted for HOMZ (E940delHOMZ). This deletion leads to a strong decrease in E940 activity, indicating that the HOMZ region conveys a strong positive activity (Fig. 3A). However when tested on its own, HOMZ did not drive any activity, indicating that HOMZ is the core region of E940 and needs to be combined with other E940 parts to recapitulate full E940 activity. As E940C, which contains HOMZ, is not sufficient for full activity, we hypothesized that regions on the 5' and/or 3' ends absent from E940C must also be required for the robustness of expression. We tested a series of deletion constructs keeping the HOMZ core region intact and identified that a construct linking the 5'-most and 3'-most sub regions to HOMZ (5'+HOMZ+3'), 412 bp long, recapitulates the complete E940 activity (Fig. 3A). We thus identified three subregions, 5'-E940, HOMZ and 3'-E940, that synergize to drive high reporter expression specifically in the neural tube.

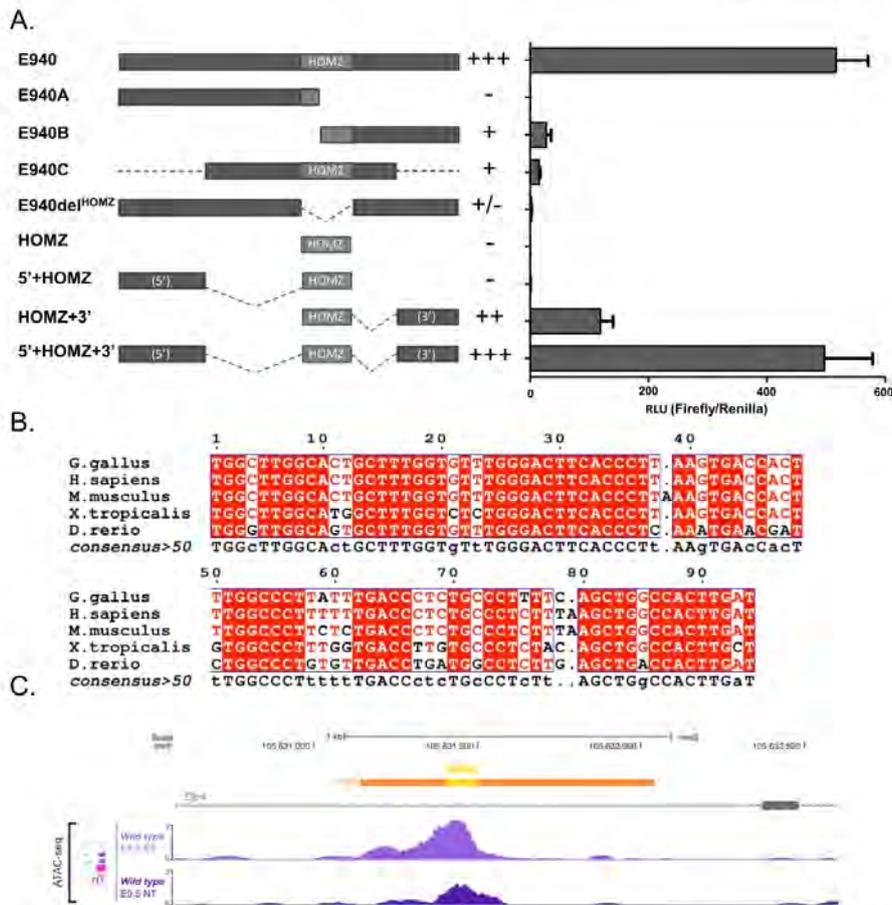


Fig. 3. Three sub-regions of the E940 CRM synergize for full activity. **A.** Graphical representation of the enhancer regions tested for their luciferase activity in and corresponding RLU measures ($n = 3$ to 23). **B.** HOMZ conservation among vertebrates (from 529 to 623 bp in the chick E940 sequence). Strictly conserved residues are in white on a red background, whereas partially conserved ones are depicted in red on a white background. A consensus sequence is shown in beneath with strictly or partially conserved residues in upper or lower case characters, respectively. **C.** Chromatin state and accessibility of the mouse region HOMZ. ATAC-seq was performed on dissected neural tube ("NT") from wild type E8.5 embryos (light purple) and E9.5 embryos (dark purple). The mouse E940 element (orange), HOMZ (yellow) and a genomic scale are indicated at the top.

2.4. Retinoic acid controls E940-driven neural tube expression through three scattered RARE sites

Given that E940 activity responds to retinoic signaling, we wondered which part of E940 is involved in this response. We searched *in silico*, using the genomatis software, for putative RARE elements in the entire E940 (Cartharius et al., 2005). RAR-RXR heterodimers preferentially bind response elements comprised of two AGGTCA sites arranged as direct repeats, with specific inter-half-site spacings of 1–5 bp (known as DR1–DR5, respectively; (Umesono et al., 1991; Mangelsdorf and Evans, 1995). We found three putative DR1 or DR5 binding sites, two located in the 5'-E940 region (DR1 and DR5, respectively) (Fig. 4A, matrix similarity of 0.786, 0.812 and 0.858, respectively). To determine the importance of these RAREs for E940 positive activity, we mutated them separately or together within E940 (Fig. 4A) and compared their activity using GFP or luciferase reporter

assays (Fig. 4B, C). Single base pair mutations in any of the 3 RAREs or in all of them together, lead to a strong reduction in E940 activity (Fig. 4B, C). Interestingly, mutation in the RARE3 alone has the same effect as mutating all three RAREs together, suggesting that it has preponderant importance when compared to RARE 1 and RARE2. We then asked whether E940 and HOMZ were responsive to retinoic acid positive input. We electroporated E940Luc, E940mutRAR123Luc or HOMZLuc with RAR-VP16, which is a constitutively active form of the RAR alpha receptor (Blumberg et al., 1997). Both E940 and HOMZ respond to RAR-VP16 (Fig. 4D, E). In addition, we tested if HOMZ activity was responsive to dnRAR. As it doesn't drive any detectable activity we combined it with a well-characterized minimal enhancer, showing weak activity in the neural tube (E^{min} , (Moore et al., 2013), see methods), that should allow us to bypass the detection threshold. E^{min} HOMZ drove positive activity (Fig. 4E) and as expected, it is negatively responsive to dnRAR (Fig. 4E). We then tested if mutation of the 3

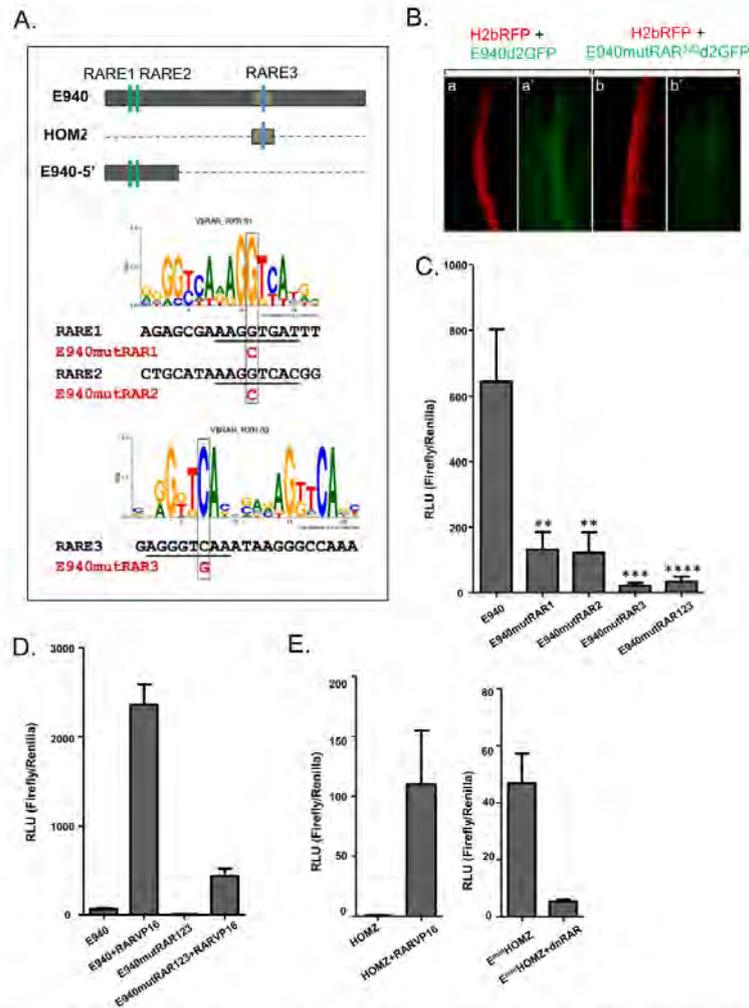


Fig. 4. Three RAREs collaborate on E940 to drive retinoic acid response. **A. On top:** Graphical representation of the position of the RAREs (green and blue bars) in E940 (dark grey) and HOMZ (light grey). **Bottom:** Alignment of RARE1 and RARE2 with the RAR/RXR heterodimer DR1 site (random expectation of 0.07 matches per 1000 bp) and alignment of RARE3 with the RAR/RXR heterodimer DR5 site (random expectation of less than 0.01 matches per 1000 bp), from MatBase 10.0, Genomatix. In red, the one bp replacements that were performed in each of the 3 RAREs to generate mutated versions of cE940: E940mutRAR1, E940mutRAR2, E940mutRAR3. The E940mutRAR123 contains all three mutations. **B.** Dorsal view of neural tubes electroporated with pLAC00E940-GFP (a, a') or pLAC00E940mutRAR123-GFP (b, b') constructs and a pRFP control vector. Note that simultaneous mutation of the 3 RAREs strongly diminishes E940 activity (b, b'). **C.** Quantitative measure of the activity of the E940 mutated forms in luciferase assays. (E940, n = 10; E940mutRAR1, n = 10; E940mutRAR2, n = 7; E940mutRAR3, n = 11; E940mutRAR123, n = 8). All the mutated forms display a strong reduction of activity if compared to native E940; P value < 0.0001 ****, P value < 0.001 ***, P value < 0.01 **, Mann-Whitney test. **D.** Comparison of the effect of RAR-VP16 on E940 and E940mutRAR123 in luciferase assays (E940, n = 3; E940mutRAR123, n = 3). **E.** Quantitative measure of the response of the core enhancer HOMZ to RA signaling (HOMZ, n = 3; HOMZ+RAR-VP16, n = 3; E^{min}HOMZ, n = 3; E^{min}HOMZ+dnRAR, n = 3).

RAREs was sufficient to abolish RA activity and indeed, E940mutRAR123 is less sensitive to RAR-VP16 than E940 (Fig. 4D), confirming the importance of RAREs 1–3 for driving RA positive input. These data argue that the three predicted RAREs recapitulate most of their activity and act synergistically to transduce an RA positive regulatory signal.

2.5. The regulatory link between *NEUROG2* and *PAX6* is conserved in the zebrafish

As HOMZ is also present in the zebrafish genome, we performed additional experiments in the fish to determine if the regulatory link between *NEUROG2* and *PAX6* that we described in the chick has been

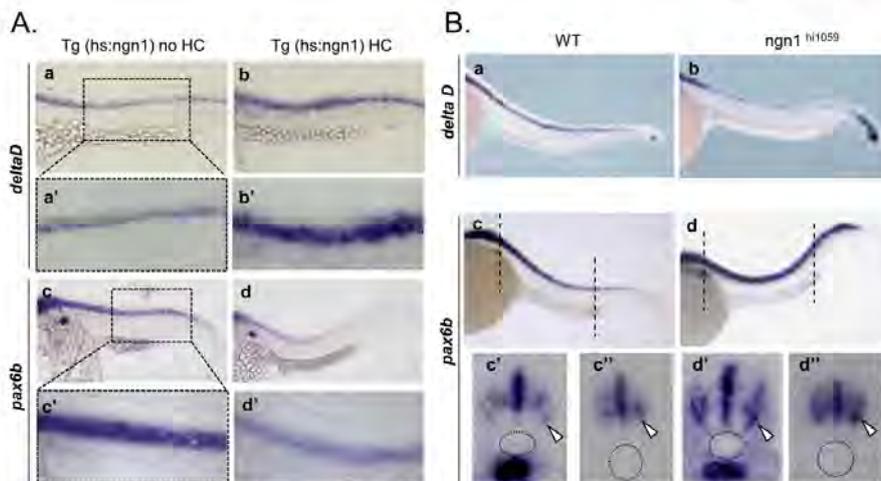


Fig. 5. The NEUROG2/PAX6 regulatory link is conserved in the zebrafish. **A.** Expression of *deltaD* and *pax6b* in zebrafish embryos expressing the *ngn1* transgene under the control of a *hsp70* heat shock (HS) inducible promoter. *deltaD* expression in non-heat shock (a, a', n = 10) and heat shock *ngn1* transgenic embryos (b, b', n = 5). *pax6b* expression in non-heat shock (c, c', n = 15) and heat shock *ngn1* transgenic embryos (d, d', n = 5). *deltaD* is induced and *pax6b* is repressed when *ngn1* is overexpressed upon HC (compare b to a' and d' to c' respectively). **B.** Expression of *deltaD* and *pax6b* in zebrafish embryos invalidated for *ngn1* (*ngn1*^{hi1059}) and WT embryos. *deltaD* expression is downregulated in the absence of *ngn1* function (compare a (n = 20) and b (n = 10)). *pax6b* is upregulated in *ngn1*^{hi1059} (compare c (n = 30) to d (n = 15)). Transversal section of WT or *ngn1*^{hi1059} embryos showing that *pax6b* expression is maintained at the border of the neural tube where neuronal precursors are located (compare d, d' to c, c'). Dashed circle mark the position of the notochord.

conserved throughout evolution. In the zebrafish, the NEUROG1/2 closest homolog is *neurog1* (Blader et al., 1997), and PAX6 has been duplicated in two paralogous genes, *pax6a* and *pax6b* (Kleinjan et al., 2008; Ma et al., 1996; Nornes et al., 1998). In the neural tube, *pax6b* expression is stronger than *pax6a* (data not shown), we thus decided to focus on *pax6b* expression. We also analyzed the expression of *deltaD*, the zebrafish homolog of Delta that is a well-known proneural positive target gene (Chinis et al., 1995; Ma et al., 1998). We first analyzed their expression in a heat-shock inducible *ngn1* transgenic line (Fig. 5A). As expected for a positive NEUROG1/2 target, *deltaD* expression is strongly activated upon heat shock (Fig. 5A a-a' and b-b'). In contrast, *pax6b* expression is downregulated in the heat shock condition (Fig. 5A c-c', d-d'). This result indicates that *neurog1* represses *pax6b* expression in the zebrafish neural tube, similar to the situation seen in the chick embryo.

We further took advantage of this genetic model to determine if neurogenin activity is necessary for *pax6b* repression, using a zebrafish mutant line in which *neurog1* expression is strongly impaired (Golling et al., 2002). As anticipated, *deltaD* is firmly downregulated in this mutant (Fig. 5B a, b), and *pax6b* expression is specifically upregulated in neuronal precursors where *neurog1* would normally be present (Fig. 5B d-d'). These results show that the NEUROG1/2/PAX6 regulatory loop has been conserved during vertebrate evolution. In addition, they reinforce our previous data by showing that NEUROG1/2 is necessary to extinguish PAX6 expression in neuronal precursors.

2.6. Repression by NEUROG2 is indirect and requires an intermediate gene

We next investigated the molecular mechanism by which NEUROG2 represses PAX6 expression. As mentioned in the introduction, NEUROG2 can repress its target genes by different mechanisms. To distinguish between the various possibilities, we tested the capability of different mutant forms of NEUROG2 to repress PAX6 expression in chick neural tube. We performed an *in silico* search for neurogenin specific E-boxes and did not find any predicted sites in

E940 (not shown). In a previous study, we showed that DNA-binding to E-boxes is necessary for this repression, by electroporating NEUROG2-AQ, a mutant form containing a two amino-acid substitution in the C terminus of the basic domain that abolishes binding to E-boxes and leads to loss of neurogenic activity (Fig. 6A b-b' and (Lacomme et al., 2012)). Here we asked whether protein-protein interaction with the CBP/p300 co-activator is also involved in this repression, using NEUROG2-YA, in which tyrosine Y241 is converted to alanine, which abolishes the interaction with CBP/P300 without affecting neurogenic activity (Ge et al., 2006; Lacomme et al., 2012; Sun et al., 2001). We electroporated NEUROG2-YA in the neural tube of HH11 chick embryos and found that it drives strong PAX6 inhibition after 6 h, similar to the effect of overexpressing a native form of NEUROG2 (Fig. 6A c-c' and a-a'), indicating that PAX6 repression only requires binding to E-boxes and is not due to CBP/p300 sequestration.

In order to determine whether the repression is direct or indirect, we next compared the repressive potential of NEUROG2-ENR, a constitutive repressor form of NEUROG2, or NEUROG2-VP16, a constitutively active form (Dixit et al., 2014) on PAX6 expression. Electroporation of NEUROG2-VP16 mimicked the effect of the native NEUROG2 gain-of-function, whereas NEUROG2-ENR had no effect (Fig. 6A, d-d' and e-e' and (Lacomme et al., 2012)). Altogether these experiments indicate that NEUROG2 activates one or several repressor gene(s) that in turn inhibit(s) PAX6 transcription.

2.7. NEUROG2 driven repression relies on the HOMZ core region

The next step was to determine which E940 sub-region(s) mediate(s) NEUROG2 driven repressive activity. To do so we co-electroporated different E940 sub-regions with or without NEUROG2 and performed the previously-used dual luciferase assay. The activity of E940, 5'+HOMZ+3' and E940C was strongly repressed by NEUROG2 (Fig. 6B and Fig. S8), suggesting that HOMZ, which is the only shared fragment between these three constructs, might be the region driving NEUROG2 negative activity. The HOMZ+3' combination also displays a consistent NEUROG2 response, while the 5'+HOMZ construct could

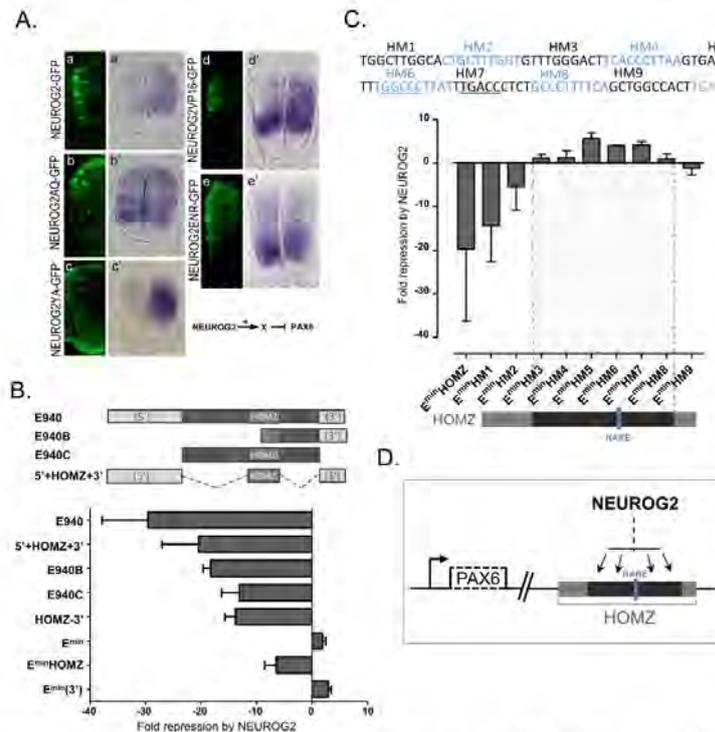


Fig. 6. NEUROG2 acts indirectly through a 60 bp region in HOMZ. **A.** In situ detection of chicken PAX6 mRNA in HH12 chicken neural tube sections electroporated with the mentioned constructs (co-expressing the GFP, in green). **B.** Comparison of the repressive effect of NEUROG2 on the activity of different regions of the E940 enhancer in luciferase assays. Only HOMZ activity is repressed by NEUROG2. **C. On top:** Graphic representation of the 10 bp by 10 bp replacement (HM mutations) performed on the HOMZ element fused to E^{min} (see methods). Underlined are the two half sites of the RAR-RXR RARE3 binding motif. **On bottom:** comparison of the effect of NEUROG2 on the activity of the different E^{min} HM forms in luciferase reporter assays. The light gray bar schematizes HOMZ with a dark gray zone corresponding to the 60 bp region necessary for NEUROG2 repression. **D. Model:** Repression of PAX6 transcripts by NEUROG2 in the neural tube involves the activation of an intermediate repressor protein and requires a 60 bp sequence on HOMZ that also contains RARE3.

not be tested due to its absence of activity. In addition, E940B, containing only part of HOMZ, responds to NEUROG2, suggesting that the repressive activity is contained in the 3' part of HOMZ (Fig. 6B and Fig. S8). Due to the faint expression driven by 5'-E940, HOMZ and 3'-E940 alone (Fig. 6A and not shown), we could not directly test if their drive NEUROG2 repressive activity. We therefore tested for repression on combined forms linking 5'-E940, HOMZ or 3'-E940 regions with the minimal enhancer E^{min} (Moore et al., 2013). When combined with E^{min} , the 5'-E940 region combination ($E^{min}(5')$) led to reduced activity when compared to E^{min} alone, whereas HOMZ ($E^{min}HOMZ$) and 3'-E940 ($E^{min}(3')$) drove positive activity (Fig. S9). It was still not possible to test 5'-E940, owing to its inability to drive any positive activity on its own or combined with E^{min} . However, we tested repression by NEUROG2 of HOMZ and 3'-E940 using the E^{min} -fused versions. Having verified that E^{min} alone does not respond to NEUROG2 signaling (Fig. 6B and Fig. S10), we observed that $E^{min}HOMZ$ is repressed by NEUROG2, whereas $E^{min}(3')$ is insensitive or even slightly activated by NEUROG2 (Fig. 6B and Fig. S8). These data thus indicate that in addition to RA driven positive activity, the HOMZ core region is also required for NEUROG2-mediated repressive activity.

The fact that E940B, which lacks the first 39 bases of HOMZ (E940B sequence ranges from 568 to 911 bp of E940, Fig. S7), is

completely repressed by NEUROG2, allowed us to narrow down the DNA sequence required for repression to between 40–94 bp of the HOMZ CRM. Interestingly, this region also contains the DR5 RAR-RXR DNA binding site (RARE3) that we identified as necessary for the RA signaling response. In order to identify which DNA motif inside this 40 to 94 bp region is required for NEUROG2 driven repression, we performed a “linker scanning” experiment by replacing every 10 bp of $E^{min}HOMZ$ with a scrambled DNA sequence. We thus generated 9 modified HOMZ versions (HM1 to HM9) and tested each one in the dual luciferase assay for their expression and response to repressive NEUROG2 (see methods, Fig. 6C and Fig. S11). This approach confirmed that the region between base 40 and base 94 is important for HOMZ positive activity (Fig. S11). Even though some HM forms only maintained faint activity (HM5 to HM7, Fig. S11), we nevertheless tested all of them for repression by NEUROG2. We found that replacement of any 10 bp portion between the 30th (HM3) and the 80th (HM8) base pair of the HOMZ sequence impeded repression by NEUROG2 (Fig. 6C and Fig. S12). The least active forms, HM5, HM6 and HM7, even became slightly activated, likely due to the presence of the E^{min} enhancer. This functional dissection of the HOMZ core enhancer indicates that NEUROG2 repressive activity is not restricted to a single DNA binding motif but channeled through a 60 bp long region inside HOMZ, also containing the RARE3 binding site (Fig. 6D).

2.8. Repressive *NEUROG2* and activating *RA* signals act through the same DNA motif

As repressive and activating signals are acting through the same 60 bp DNA region, it raises the possibility that *RA* and *NEUROG2* driven signals share the same DNA motif and compete to fine tune the ON/OFF of *PAX6* expression. It has been described that *NEUROG2* can physically interact with *RAR* receptors, tethering them to E-box sites and controlling gene expression in motoneurons (Lee et al., 2009). In view of this data, the possibility existed that the reduction of *E940* activity upon *NEUROG2* overexpression was due to unspecific sequestration of *RARs* away from their own DNA binding sites. If it were the case, *NEUROG2AQ* is highly inefficient at repressing *E940-Luc* (Fig. S1.3). However, downregulation of *E940* activity could still be due to an indirect sequestration of *RARs* by the *NEUROG2* target. We reasoned that if the effect of *NEUROG2* was due to *RARs* sequestration, *E940mutRAR123* activity shouldn't be modulated by *NEUROG2*. Alternatively its activity should be downregulated as efficiently as for the *E940* WT form. To test this we co-electroporated *NEUROG2* with either the wild-type *E940* or *E940mutRAR123* reporter construct and quantified the activity of these two CRMs in the dual luciferase assay. As shown in Fig. 7A, the expression driven by *E940mutRAR123* is still repressed efficiently by *NEUROG2*, indicating that repression by *NEUROG2* is not an indirect effect due to sequestration of *RARs* receptors away from the *RARE* sites. Moreover, *NEUROG2* repressive activity on *E940mutRAR123* was even stronger than on the native *E940* form (Fig. 7A), suggesting that mutation of *RAREs* tips the regulatory balance in favor of repression by *NEUROG2*. As we have shown that *NEUROG2* acts through the *HOMZ* core region, this suggests that it is the mutation in *RARE3* that favors repression by *NEUROG2*. We therefore compared the repression of *E940mutRAR1* to that of *E940mutRAR3*, reasoning that *E940mutRAR1* should not be more repressed than wildtype *E940* as *RARE1* is located outside the *HOMZ* region, whereas *E940mutRAR3* should be as sensitive as the *E940mutRAR123* construct to repressive *NEUROG2* activity. Indeed we found that *E940mutRAR3* is subject to repression by *NEUROG2* at the same level as *E940mutRAR123*, and that *E940mutRAR1* is repressed to the same level as native *E940* (Fig. 7 A, B). Thus, repression downstream of *NEUROG2* seems a more favored response specifically when the *RARE3* site is mutated, suggesting that *RAR-RXR* heterodimers and *NEUROG2* induced-repressor(s) physically compete through the same DNA motif within *HOMZ* to finely regulate *PAX6*^{ON/OFF} status.

To clarify this issue, we performed competition experiments using a mutated form of *RAR*, *RAR^{delAF2}*, which is able to bind to *RAREs* but lacks part of its heterodimerization domain and does not interact with co-activators such as *CBP/p300* (Lee et al., 2009). We hypothesized that *RAR^{delAF2}* would sterically block the *RAREs* on *E940* without significantly modifying the *RA* response, as *RAR* mutants lacking both the delta *AF2* domain and the dimerization domain have been reported to have negligible dominant negative activity when compared to *dnRAR*, which retains the dimerization domain (Blumberg et al., 1997; Lee et al., 2009). As seen in Fig. 7C, *RAR^{delAF2}* indeed fails to perturb *E940* activity (Fig. 7C c, c'). However when co-electroporated with *NEUROG2*, it blocks the ability of *NEUROG2* to inhibit *E940* driven GFP signal (Fig. 7C d, d'). We quantified the effect of *NEUROG2* and *RAR^{delAF2}*, alone or in combination, in our luciferase assay and confirmed that *RAR^{delAF2}* does not alter *E940* activity but strongly impedes the repressive activity of *NEUROG2* on *E940* (Fig. 7D: -80 FC repression with *NEUROG2* and -2 FC with *NEUROG2+ RAR^{delAF2}*). These experiments indicate that *RARs* compete with *NEUROG2* on *HOMZ* to control *E940* activity.

The observation that any 10 bp replacement between bp 40 to 90 on

the *HOMZ* region impedes *NEUROG2* repression, suggests that several TFs act together or synergistically to repress *PAX6* expression, or that clustering of binding sites for the same transcriptional repressor is needed, and that these TFs bind within a 60 bp region surrounding the *HOMZ RARE (RARE3)*. We therefore searched for putative TF binding sites in the vicinity of the *RARE*. *In silico* analysis revealed a significant enrichment of binding sites for potent genes in the nuclear receptor (NR) superfamily (Fig. 7E). Significantly, the binding sites are remarkably regularly spaced and similarly oriented. All the linker scanning replacements affecting *NEUROG2*-dependent repression (*HM4* to *HM8*) affect at least one of these predicted sites (compare Figs. 7E and 6B), suggesting that a subset of nuclear receptors could act cooperatively to repress *Pax6* expression downstream of *NEUROG2*.

All together our results suggest a model in which *RA* and the *NEUROG2* target gene(s), which could be members of the NR superfamily, share DNA motifs in close proximity on *E940* to control *PAX6* temporal expression during the course of spinal neurogenesis (Fig. 7F). Further investigation will be necessary to decipher if orphan nuclear receptors or some of their co-factors are involved in this balanced temporal regulation.

3. Discussion

In this study we have characterized a new CRM, *E940*, which controls the temporal dynamics of *PAX6* expression in the chicken neural tube. This highly conserved CRM is located at quite a long distance downstream of the *PAX6* gene and responds to *RA* driven positive and *NEUROG2* driven negative signals. We show that within *E940*, these regulatory signals switch *PAX6* on or off in the developing neural tube through a 94 bp core region, *HOMZ*, which is highly conserved in the zebrafish. Moreover, we identified 3 *RAREs* that trigger most of the positive retinoic acid response and showed that the repression by *NEUROG2* involves the activation of one or several intermediate factor(s). In addition we showed that *RA* and *NEUROG2* regulatory signals compete through a 60 bp DNA region in *HOMZ* to exert their opposing effects on *PAX6* expression. Altogether, our results present an important step forward in identifying the spatio-temporal regulatory logic of *PAX6* expression in the developing neural tube. The high density of predicted nuclear receptor binding sites within *HOMZ* suggests a scenario that could also implicate this gene family in the temporal ON/OFF switching of *PAX6* expression.

3.1. *E940*: A temporal control element

It is now well established that gene expression is often controlled not just by one but by several CRMs that collaborate to reinforce robustness of expression patterns and that allow a more delicately fine-tuned temporal and spatial regulation (Spatz and Firingar, 2012). This is particularly true for *PAX6* regulation, as the transgenic reporter studies that have been performed so far have identified a large number of CRMs with overlapping tissue specificities. Collectively these data suggest that for various tissues, several CRMs cooperate within the endogenous locus. Here we show that *E940* controls the temporal aspect of *PAX6* expression in the developing neural tube. *E940* activity starts at the level of the transition zone, caudally, where retinoic acid signaling starts to be active (Díez del Corral et al., 2003) and spans the entire A-P axis of the neural tube. In addition, in agreement with the dynamics of endogenous *PAX6* expression during the different steps of neurogenesis (Bel-Vialar et al., 2007), *E940* is active in neural progenitors but is progressively silenced in differentiating neuronal precursors, as seen when compared to *NEUROG2* and *HuCD* expression. Consistent with ATAC-seq data obtained in the mouse, *E940* drives GFP expression in *r5* at early embryonic stages but is never active in *r3*. However, it has been shown that *PAX6* is expressed in *r3/r5* from *HH10* to at least *HH17* (Kayan et al., 2013). *E940* therefore does not contain regulatory cues for *PAX6* expression in the hindbrain,

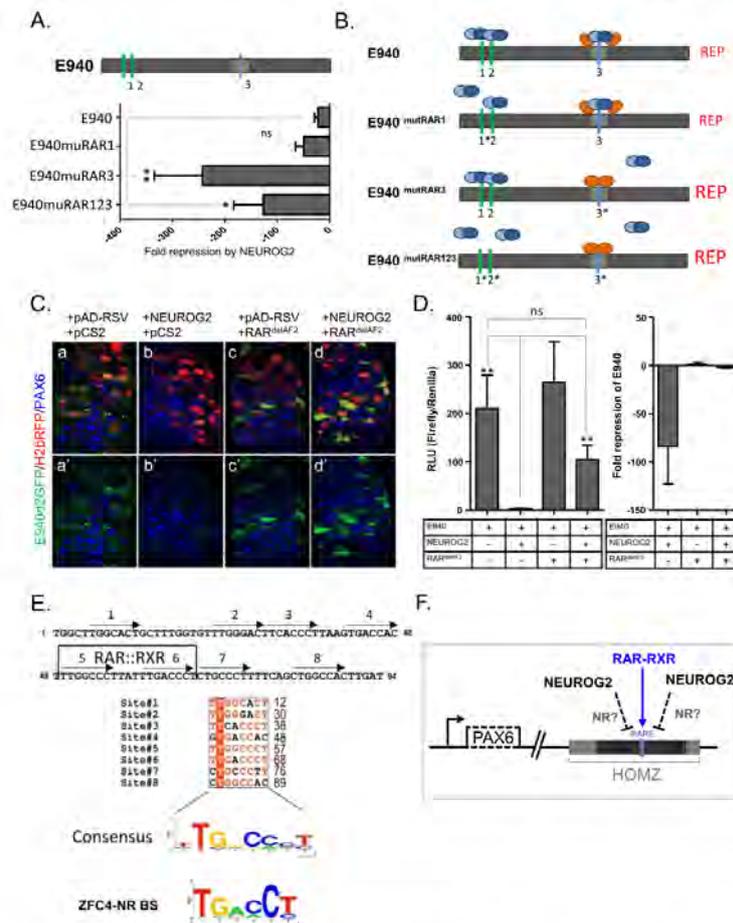


Fig. 7. NEUROG2 and RA exert their opposite activities through competition on a 60 bp region enriched in NRs putative DBS on HOMZ. **A.** Comparison of the repressive effect of NEUROG2 on the activity of different mutated versions of E940 in luciferase assays. The E940mut123 and E940mut3 are more sensitive to NEUROG2 repression than E940 or E940mut1 (E940, n = 9; E940mutRAR123, n = 4; E940RARmut1 n = 3; E940RARmut3, n = 4). P value < 0.05 *, P value < 0.01 **, Mann-Whitney test. **B.** Scheme presenting the strength of the repression of the different E940mutRAR forms and modeling the hypothesized changes in accessibility of the different RAREs following RAREs mutation. Green and blue bars represent the RAREs motifs, * indicates the mutated RAREs. In orange are NEUROG2 target proteins, in blue are RAR-RXR heterodimers. REP in small upper case letters indicates normal repression, REP in large upper case letters indicates strong repression. **C.** Co-electroporation of pLac00E940-GFP (in green) with empty control vectors pADRSV and pCS2 (a, a'), pADRSVNEUROG2 and pCS2 (b, b'), pADRSV and pCS2RAR^{ΔMAF2} (c, c'), pADNEUROG2 and pCS2RAR^{ΔMAF2} (d, d'). H2bRFP was included in all conditions (in red). Embryos were electroporated at HH12 and harvested 18 h later. **D. Left panel:** Quantitative expression of E940-LUC when co-electroporated with the indicated constructs; **Right panel:** Fold change in E940-LUC expression upon the action of NEUROG2, RAR^{ΔMAF2} or both as indicated at the bottom table. This is a complementary representation of the results presented in (a). **E.** The chicken HOMZ sequence is shown in the upper part with positions of arrayed putative NR binding sites (NRBS) indicated with arrows (note that they are all similarly oriented), the RAR::RXR cognate site being framed. Corresponding NRBS sequences are aligned below (positions within HOMZ are indicated on the right), with strictly conserved residues in white on a red background and partially conserved ones in red on a white background. A consensus LOGO sequence is shown beneath that is highly similar to the ZFC4-NR consensus sequence. **F. Schematic model proposed from our results:** NEUROG2 and RAR-RXR heterodimers act through the same DNA motif to oppositely control PAX6 temporal expression. This motif being enriched in putative nuclear receptor cognate sites and NRs being able to repress endogenous PAX6 and E940-GFP expression, we propose that NEUROG2 could activate a combination of NRs that would compete with RAR-RXR heterodimers for fixation on HOMZ.

even if it shows some activity in r5 at early stages. All these observations point to E940 being specifically dedicated to control PAX6^{ON/OFF} during the course of neurogenesis. This poses the question of whether this CRM is crucial for PAX6 expression or whether it acts redundantly with yet another unidentified neural enhancer. In a transgenic mouse study analyzing transcriptional activity in reporter yeast artificial chromosomes (YACs) containing large genomic sequences of the PAX6 locus, it was shown that YAC transgenes lacking

the downstream regulatory region (DRR) of PAX6 and containing E940, no longer showed proper GFP expression in the developing eye, emphasizing the importance of this remote control region in eye formation (Kleinjan et al., 2006). While the focus of that paper was on eye development, it was clear that removing the DRR from the YAC also leads to a strong reduction of reporter signal in the spinal cord. As E940 is a part of this DRR, the decrease in GFP expression in the neural tube upon removing the DRR could be due to missing E940

from the truncated YAC. However, some expression remained in the neural tube even in the absence of the DRR, suggesting the existence of some other neural tube enhancers in the genomic region present on the YAC but outside of the DRR. Genomic scanning of large regions surrounding the *PAX6* transcription units has in fact identified a large number of CRMs but only a few of them were able to drive robust neural tube activity. Two studies reported some *LACZ* expression in the spinal cord for an element (E1E4Q/E1E4H) located in the 4th intron of *PAX6* in quail, human and mouse, but its activity tested in the mouse was very caudal and late compared to endogenous *PAX6* expression (Plaza et al., 1995a; Xu and Saunders, 1998). Another enhancer located between the P0 and P1 *PAX6* promoters was reported to drive faint expression in the spinal cord (Kammandel et al., 1999). However these enhancers have not been functionally characterized in detail. More recently, Oosterveen et al., in a search for Gli-family binding sites in the vicinity of SHH target genes, identified a neural tube-specific enhancer GBS, located within the 7th intron of *PAX6*. This enhancer drives strong neural tube expression in the chick and is responsive to SHH signaling (Oosterveen et al., 2012), but we found that it is not downregulated by either *NEUROG2* or *dnRAR* overexpression, suggesting that it may be more specifically involved in the dorso-ventral restriction of *PAX6* expression. During the course of our study we also tested, another CRM, E55A, that was shown to drive strong reporter expression in the neural tube in transgenic mouse or zebrafish (Bhatia et al., 2014). We cloned the chick E55A, but it conferred only late expression of a *LACZ* reporter, and this expression was very weak, so we did not pursue further its characterization. Interestingly however, the ATAC-seq profile of E55A resembled that of E940: we detected significant peaks specifically in the neural tube and in r5 at E9.5. Therefore, E55A remains a promising CRM to be functionally dissected in the neural tube, and it could function redundantly with E940 in controlling *PAX6* temporal expression. Altogether these studies and our own data emphasize the complexity of *PAX6* regulation in a developing tissue such as the neural tube. They suggest that E940 is part of a CRM group dedicated to the control of *PAX6* expression in the neural tube and more specifically to the interpretation of temporal cues.

3.2. Antagonistic *NEUROG2* and RA signals act through a 60-bp-long motif within *HOMZ*

We showed that both positive and negative regulation of the E940 CRM by RA and *NEUROG2* act through a short 60 bp region within the *HOMZ* region. We identified 3 functional RAREs within E940, one being located in *HOMZ*. Mutation of these RAREs abolishes almost completely E940 activity in the neural tube, indicating that they are necessary for triggering positive RA response. The fact that E940mutRAR123 still responds partially to RAR-VP16 overexpression is possibly due to unspecific binding on DNA binding sites related to RAREs. During our *in silico* search for RAREs, we also found some putative RXR-VDR and RXR-THRB sites on E940. As DNA binding sites are highly similar between these different nuclear receptors, it is likely that in the absence of canonical RAREs, RAR-VP16, which is a strong constitutively active RAR, can bind to other putative binding sites and trigger some signal. However, we clearly demonstrate that RARE 1, 2, 3 are essential for E940 positive activity and interestingly, a single-base-pair mutation of RARE3, located in *HOMZ*, is sufficient to abolish positive activity while concomitantly increasing sensitivity to *NEUROG2*. As *NEUROG2* represses *PAX6* indirectly, this result favors a model in which the *NEUROG2* target gene(s) involved in *PAX6* repression and the positively acting RAR-RXRs heterodimers compete on shared cognate sites within *HOMZ*, and where the ratio between these two molecular players finely controls the balance of both spatial and temporal levels of *PAX6* in the developing neural tube.

A relationship between the retinoic acid pathway and *NEUROG2* has already been reported in the developing spinal cord. First, *NEUROG2* is activated by retinoic acid together with other neuronal

genes at the onset of neurogenesis (Novitsch et al., 2003; Díez del Corral et al., 2003; Ribes et al., 2008). Second, it has been shown that RA and *NEUROG2* cooperate for motoneuron (MN) specification (Lee et al., 2009). In this case, RAR-*NEUROG2* heterodimers are tethered on E-boxes and, upon fixation of RA, recruit CPB/p300 to regulate the expression of TPs involved in MN specification, such as Hb9. Our study brings to light a new mode of functional interaction between RA and *NEUROG2*, involving the sharing of a DNA motif to regulate target gene expression in opposing directions. Such a competitive interaction with RA signaling could be used more widely by *NEUROG2* as a way to efficiently repress other progenitors and/or cell cycle-controlling genes during the course of neurogenesis. In addition to *HOMZ*, we cannot exclude that another region in E940, the 5' part of E940, is also involved in *NEUROG2* repressive activity. We were unable to test that possibility because the fragment does not display any activity on its own, but when combined with a weak positive enhancer it led to a decrease in activity. Therefore, in addition to *HOMZ*, the 5' part of E940 could also carry a motif driving redundant negative activity.

3.3. *HOMZ* is enriched for predicted orphan nuclear receptor cognate sites

Our *in silico* analysis reveals a significant enrichment of putative nuclear receptor (NR) superfamily binding sites surrounding the *HOMZ* RARE, suggesting that several NRs could be involved in *PAX6* temporal regulation. Interestingly, such an involvement for nuclear receptors in temporal gene regulation has been described in *Drosophila* (Potier et al., 2014). Indeed, Potier et al. identified and validated NR binding sites located in a cardiac-specific enhancer acting in the adult fly. They showed that 3 distinct NRs behave as temporal transcriptional regulators acting through these heart enhancers. The NRs are relatives of RORA/B/C (DHR3) and Rev-ErbB (E75A/B/C) for which we found putative cognate sites within *HOMZ*. These NRs have been shown to interact physically with each other, allowing switching of DHR3-activating to repressive potential. It is tempting to propose a similar scenario in which *NEUROG2* activates or changes the activity of one or several NRs which then recruit other NR family partners or co-factors to form a repressive complex upon dedicated *HOMZ* sequences. This complex could exert a steric blockade on or around the RARE, impeding further binding of the RAR-RXR heterodimers. Alternatively, we can imagine that *NEUROG2* could change the stability or the activity of some particular NRs by activating genes involved in post-translational modification. NR function can be modulated by the recruitment of coactivators or repressor complexes (Auger and Jensen, 2009). It is thus also conceivable that *NEUROG2* induces the expression of NR co-factors that could change the activity or composition of NRs containing complexes leading to a repressive action. Identification of the NR target genes of *NEUROG2* and/or the co-factors known to functionally collaborate with NRs will be essential to allow further testing of that model.

4. Materials and methods

4.1. Ethics statement

All zebrafishes were handled in a facility certified by the French Ministry of Agriculture (approval ID B-31-555-10) and in accordance with the guidelines from the European directive on the protection of animals used for scientific purposes (2010/63/UE), French Decret 2013-118.

4.2. Zebrafish experiments

Zebrafish embryos were raised and staged as described in (Westerfield, 1995) and provided by P.Blader. The *ngn1^{hi1059}* line was generated by insertion of a mouse retroviral vector in the 3' UTR of

the *ngn1* gene (Golling et al., 2002). The thermo-sensitive *ngn1* transgenic line (Tg(hsp70l:neurog1)ups1) was generated by inserting a transgene containing *ngn1* fused to a hsp70 heat shock inducible promoter (Madeline and Blader, 2011). Heat shock was performed as follows: Embryos were raised in a 28 °C water bath, then transferred at the 21hpf (hour post fertilization) stage to a 38 °C water bath for one hour. Then they were replaced in a 28 °C water bath for 2 more hours before being fixed for in situ hybridization (ISH). Whole-mount ISH was performed as described in (Madeline and Blader, 2011). Antisense riboprobes to detect *pax6b* and *DeltaD* transcripts were a gift from P.Blader. After ISH, embryos were embedded in gelatine/albumin and 10–15 µm sections were cut using a vibratome (Leica VT1000s).

4.3. Chicken embryos

Fertile hen's eggs (from *G. Gallus*) were provided by a local supplier (SCAL) and incubated at 37 °C in a humidified incubator for the appropriate time to reach the required Hamburger and Hamilton (HH) stage. Eggs were grown until HH10–HH12 (E1.5–2) to perform electric pulses. After electroporation, eggs were further incubated either 7 h, 18 h to 22 h or 36 h before harvesting.

4.4. Electroporation of DNA

Electroporation was performed as described on the left side of the neural tube. 0.5 to 3 µg/µl of DNA were injected in the lumen of the neural tube before applying 5 pulses of 20ms using square electrodes. The pADRSV-NEUROG2 flag and pADRSV constructs were a gift from P.Charnay (Garcia-Donínguez et al., 2003). The *Xenopus* dnRARα expressing construct was a gift from Nancy Papalopulu. It is a truncated *Xenopus* RARα form that lacks amino acids 406 to 474, corresponding to the AF2 domain (xRARα1405*, (Blumberg et al., 1997)). H2b-RFP came from (Magnson, 2009). RARdelAF2 is a human RAR alpha receptor truncated from the 374 amino acid, lacking part of the heterodimerisation domain and the AF2 domain (Lae et al., 2009). The pCAAG-RARα expressing construct was a gift from Nancy Papalopulu. The LAC00 vector in which the CRMs were first cloned was given by J.M. Matter (Crossley and Brownlee, 1990; Hernandez et al., 1995). The d2EGFP vectors were derived from the pCIG plasmid (Megasan and McMahon, 2002). For luciferase assays, all the tested CRMs were cloned into a pGL4.23 [luc2/minP] vector (Promega), and in some cases the PAX3CNE1 enhancer (E^{min}) (Moore et al., 2013) was also inserted into this vector. The HM mutated forms HM1 to HM8 were generated by PCR, using the overlap extension method (Ho et al., 1989). Every 10 bp on HOMZ were replaced by a NOT1 site flanked by two additional base pairs (GGGGGGCGCCGCC).

4.5. Production and analysis of reporter transgenic mice

The mE940 construct was made by PCR amplification of a 1.54 kb fragment (hg38 assembly chr11:31650121–31651659) with primer pair: 5'-TGCTTTCCCTTGAGCACT-3' and 5'-TCATATACGGCAGATCCTCG-3', cloned into pGEM-T (Promega), followed by subcloning into the NotI site of the p610+LacZ reporter vector. Microinjection fragments were generated by digestion with suitable restriction enzymes, isolated from agarose gel using Qiagen gel extraction columns and microinjected into mouse oocytes according to standard procedures. Transgenic mice and embryos were identified by PCR using LacZ specific primers. A number of transient transgenic embryos and two expressing lines were obtained, showing a sub-pattern of the previously characterized HS5 +Z transgenic expression pattern (McBride et al., 2011).

4.6. In situ hybridization, Immunohistochemistry and LACZ staining

Detection of transcripts and protein was done on 50 µm thick transversal sections (made with a vibratome) that were embedded in

5% agarose following 3h fixation in 4% paraformaldehyde at RT. *In situ* hybridization was performed as published in (Bel-Vialar et al., 2002). Riboprobes to detect PAX6 transcripts were synthesized from isolated specific PCR products devoid of plasmid sequences to avoid unspecific cross reaction between the riboprobe and electroporated plasmids (oligonucleotides are available on request).

Immunohistochemistry was performed as described in (Lobjouis et al., 2004). The antibodies we used were as follows: a monoclonal anti-human neuronal protein HuC/HuD (anti-HuC/D; Molecular Probes; 1/500); a polyclonal rabbit anti-PAX6 (Covance, ref. PRB-278P, 1/300); a polyclonal anti-Ngn2 (from D. Anderson; 1/3000). LACZ staining was done as described in (Bel-Vialar et al., 2002).

4.7. Dual luciferase assay

The luciferase assays were performed with the Dual Luciferase reporter assay kit (Promega), according to the manufacturer's recommendations. The different forms of E940, cloned into the pGL4.23 firefly vector, were electroporated into E1.5–2 neural tubes at a concentration close to 0.5 µg/ul. The concentration of the empty pGL4.23 firefly vector was 0.5 µg/ul and all E940 forms or sub-fragment concentrations were calculated depending of their length in order to obtain the same final number of molecules. Each test also included a pGL3 Renilla vector at 0.05 µg/ul that served to normalize the firefly measure with the quantity of electroporated cells. NEUROG2, NEUROG2AQ, dnRARα and RAR^{delAF2} were electroporated at a concentration of 0.5 µg/ul. Neural tubes were collected 18 h following electroporation and lysed in the provided lysis buffer before measuring luciferase activity. At least three neural tubes were pooled for each experimental condition, and all experiments were reproduced at least three times. All the results are expressed as a mean ± SEM of at least three independent experiments, and statistical significance was evaluated when relevant using the Mann-Whitney test.

4.8. Confocal analysis

Confocal images were acquired on a SP8 Leica confocal microscope from optical slices of 4µm depth with an x40 objective.

4.9. Bioinformatics

Genomic sequences homologous to chicken E940 were recovered through BLAST analyses at NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Multiple sequence alignments were generated with MAFFT version 7.0 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) and colored with ESPript version 3.0 (<http://esprict.ibcp.fr/ESPrict/ESPrict/>) using the Risler homology matrix (global score of 0.7). Putative RARE sites were identified using the Mat Inspector module of the genomix software suite (<https://www.genomix.de>). Clustered putative NR binding sites within HOMZ were identified through the MEME suite version 4.11.4 (<http://meme-suite.org/index.html>) as well as through visual inspection, and the corresponding consensus sequence was generated with WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>).

4.10. ATAC-seq experiments (Thivernon et al., 2017)

ATAC experiments were performed according to Buenrostro and colleagues (Buenrostro et al., 2013), using a homemade transposome (Piccoli et al., 2014). For each genotype, 7–8 embryos at 10–12 s were dissected in cold PBS and cells were mechanically dissociated. Cells were lysed before transposition using 1 µl of transposome and purified using a Qiagen MinElute Kit with 10 µl of Elution Buffer. Transposed DNA was amplified by PCR as previously described (Buenrostro et al., 2013) and quantified by qPCR using 5 µl of PCR product. The number of additional cycles was determined by plotting linear Rn versus cycle and corresponded to one third of the maximum fluorescence intensity. The

remaining PCR product (45 µl) was treated with the additional number of cycles. The final product was purified with Qiagen PCR Cleanup Kit and eluted in 20 µl Elution Buffer. Sequencing was performed on multiplexed samples using 42 bp paired-end reads on an Illumina NextSeq according to the manufacturer's specifications. For computational analysis, paired-end reads were mapped onto the mouse genome assembly mm9 using STAR (outFilterMultimapNmax 1; outFilterMismatchNmax 999; outFilterMismatchNoverLmax 0.06; alignIntronMax 1; alignEndsType EndToEnd; alignMatesGapMax 2000). Duplicate reads were removed using Picard (<http://picard.sourceforge.net>) (MarkDuplicates, REMOVE_DUPLICATES = true). To consider only those fragments coming from transcription factor protected DNA (and not from nucleosomes), only fragments smaller than 100 bp were kept. BIGWIG tracks were obtained using DeepTools BamCoverage (1.5.9.1).

4.11. ChIP-seq experiments (Thierion et al., 2017)

ChIP-seq experiments were performed as previously described (Vitobello et al., 2011). Briefly, 10 embryos at E9.5 were dissected in cold PBS. Cell suspensions were obtained by passage through a 21 G needle fitted onto a 5 ml syringe. The cells were cross-linked with 1% formaldehyde for 10 min and washed twice in PBS, 1 mM PMSF, 1 × PIC (Protease Inhibitor Cocktail). Sonication was performed on a Covaris S220 using the following programme: duty factor = 10, peak incident power = 140, cycles per burst = 200 during 600 seconds. 10 µg of chromatin were used for each IP using 3 µg of the following antibodies: anti H3K4me1 (C15410037, Diagenode) and anti H3K27ac (ab4729, Abcam) in RIPA buffer. The libraries were prepared with the MicroPlex Library Preparation kit (Diagenode, E8.5 embryos) and with the NEXTflex ChIP-Seq Kit (Bioo Scientific, E9.5 embryos). ChIP Seq experiments were done in duplicate.

Sequencing was performed on multiplexed samples using 50 bp single-end reads on an Illumina HiSeq system (E9.5 embryos), or using 42 bp paired-end reads on an Illumina NextSeq (E8.5 embryos) according to the manufacturer's specifications. Chip-seq data were analysed, using Eoulsan (Jourdren et al., 2012) with extended support for ChIP-seq workflows (<https://github.com/GenomicParisCentre/eoulsan/tree/branch-chip-seq>), see (Thierion et al., 2017). Mapping was performed using STAR (Dobin et al., 2013) (version 2.4.0k in module mapreads). Further filters were applied to the mapped reads before conversion into BAM, (Thierion et al., 2017). BIGWIG files were created from the resulting BAM files using deepTools' bamCoverage (Ramirez et al., 2014). The ATAC-seq and ChIP-seq data have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) under accession number GSE94716 (Thierion et al., 2017).

4.12. Genomic sequences

The coordinates for the genomic sequences used in this study are: Chicken E940: Galgal4:5:5141000:5142000:1; Human E940: GRCh38:11:31650584:31651473:1; Mouse E940: GRCm38:2:105790983:105791885:1; Mouse HS5 +: GRCm38-2:105790856-105793087.1(-); Mouse HOMZ: GRCm38:2:105791242-105791346; Zebrafish HOMZ:GRCz10:25:14870614-14870716; Mouse GBS: GRCm38:2:105689932-105690425; Mouse E55A: GRCm38:2:105610856-105611811.

Acknowledgments

We thank Patrick Blader and Pascale Dufourcq for providing zebrafish embryos and expertise. We thank Alice Baldy, Alicia Malet and the Imagery Platform TRI Toulouse for technical support. We also thank members of our team, members of Alice Davy's team, Michelle Studer and Vanessa Ribes for helpful discussions. Finally we thank Pascale Gilardi-Hebenstreit, Serge Plaza and Muriel Boube for critical reading of the manuscript.

Funding

This work was supported by grants for ML from the CNRS and region Midi-Pyrenees. Core support was from the CNRS and University Paul Sabatier, Toulouse. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.ydbio.2018.02.015.

References

- Auger, A.P., Jessen, H.M., 2009. Corepressors, nuclear receptors, and epigenetic factors on DNA: a tail of repression. *Psychoneuroendocrinology* 34 (Suppl 1), S39–S47.
- Bel-Vialar, S., Itasaki, N., Krumlauf, R., 2002. Initiating Hox gene expression in the early chick neural tube differential sensitivity to FGF and RA signaling subdivides the HoxB genes in two distinct groups. *Development* 129, 5103–5115.
- Bel-Vialar, S., Medevielle, F., Pituello, F., 2007. The on/off of Pax6 controls the tempo of neuronal differentiation in the developing spinal cord. *Dev. Biol.* 305, 659–673.
- Bertrand, N., Castro, D.S., Guillemot, F., 2002. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 517–530.
- Bertrand, N., Medevielle, F., Pituello, F., 2000. FGF signalling controls the timing of Pax6 activation in the neural tube. *Development* 127, 4837–4843.
- Bhatia, S., Monahan, J., Ravi, V., Gautier, P., Murdoch, E., Brenner, S., van Heyningen, V., Venkatesh, B., Kleinjan, D.A., 2014. A survey of ancient conserved non-coding elements in the PAX6 locus reveals a landscape of interdigitated cis-regulatory archipelagos. *Dev. Biol.* 387, 214–228.
- Blader, P., Fischer, N., Gradwohl, G., Guillemot, F., Strahle, U., 1997. The activity of neurogenin1 is controlled by local cues in the zebrafish embryo. *Development* 124, 4557–4569.
- Blumberg, B., Bolado, J., Moreno, T., Kintner, C., Evans, R., Papalopulu, N., 1997. An essential role for retinoid signaling in anteroposterior neural patterning. *Development* 124, 373–379.
- Buenrostro, J.D., Giresi, P.G., Zaba, L.C., Chang, H.Y., Greenleaf, W.J., 2013. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat. Methods* 10, 1213–1218.
- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M., Werner, T., 2005. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21, 2933–2942.
- Chitris, A., Henrique, D., Lewis, J., Ish-Horowitz, D., Kintner, C., 1995. Primary neurogenesis in Xenopus embryos regulated by a homologue of the Drosophila neurogenic gene Delta. *Nature* 375, 761–766.
- Crossley, M., Brownlee, G.G., 1990. Disruption of a C/EBP binding site in the factor IX promoter is associated with haemophilia B. *Nature* 345, 444–446.
- Cylok, A., Callaerts, P., 2016. PAX6: 25th anniversary and more to learn. *Exp. Eye Res.*
- Diez del Corral, R., Olivera-Martinez, I., Goriely, A., Gale, E., Maden, M., Storey, K., 2003. Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension. *Neuron* 40, 65–79.
- Dixit, R., Wilkinson, G., Canciano, G.I., Shaker, T., Adnani, L., Li, S., Dennis, D., Kurrasch, D., Chan, J.A., Olson, E.C., Kaplan, D.R., Zimmer, C., Schourms, C., 2014. Neurog1 and Neurog2 control two waves of neuronal differentiation in the piriform cortex. *J. Neurosci.* 34, 539–553.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., Gingeras, T.R., 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21.
- Ericson, J., Rashbass, P., Scheid, A., Brenner-Morton, S., Kawakami, A., van Heyningen, V., Jessell, T.M., Briscoe, J., 1997. Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell* 90, 169–180.
- Garcia-Dominguez, M., Poquet, C., Garel, S., Charnay, P., 2003. Ebf gene function is required for coupling neuronal differentiation and cell cycle exit. *Development* 130, 6013–6025.
- Ge, W., He, F., Kim, K.J., Blanchi, B., Coskun, V., Nguyen, L., Wu, X., Zhao, J., Heng, J.J., Martinovich, K., Tao, J., Wu, H., Castro, D., Sobehi, M.M., Corfas, G., Gleason, J.G., Greenberg, M.E., Guillemot, F., Sun, Y.E., 2006. Coupling of cell migration with neurogenesis by proneural bHLH factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 1319–1324.
- Golling, G., Amsterdam, A., Sun, Z., Antonelli, M., Maldonado, E., Chen, W., Burgess, S., Haldi, M., Artzt, K., Farrington, S., Lin, S.Y., Nissen, R.M., Hopkins, N., 2002. Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nat. Genet.* 31, 135–140.
- Griffin, C., Kleinjan, D.A., Doe, B., van Heyningen, V., 2002. New 3' elements control Pax6 expression in the developing pretectum, neural retina and olfactory region. *Mech. Dev.* 112, 89–100.
- Hernandez, M.C., Erkman, L., Matter-Sadzinski, L., Roztocil, T., Ballivet, M., Matter, J.M., 1995. Characterization of the nicotinic acetylcholine receptor beta 3 gene. Its regulation within the avian nervous system is effected by a promoter 143 base pairs in length. *J. Biol. Chem.* 270, 3224–3233.

- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., Pease, L.R., 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51–59.
- Itasaki, N., Bel-Vialar, S., Krumlauf, R., 1999. "Shocking" developments in chick embryology: electroporation and *in ovo* gene expression. *Nat. Cell Biol.* 1, E203–E207.
- Janesick, A., Wu, S.C., Blumberg, B., 2015. Retinoic acid signaling and neuronal differentiation. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 1559–1576.
- Jourdren, L., Bernard, M., Dillies, M.A., Le Crom, S., 2012. Eoulsan: a cloud computing-based framework facilitating high throughput sequencing analyses. *Bioinformatics* 28, 1542–1543.
- Kammandel, B., Chowdhury, K., Stoykova, A., Aparicio, S., Brenner, S., Gruss, P., 1999. Distinct cis-essential modules direct the time-space pattern of the Pax6 gene activity. *Dev. Biol.* 205, 79–97.
- Kayam, G., Kohl, A., Magen, Z., Peretz, Y., Weisinger, K., Bar, A., Novikov, O., Brodski, C., Sela-Donenfeld, D., 2013. A novel role for Pax6 in the segmental organization of the hindbrain. *Development* 140, 2190–2202.
- Kim, J., Lauderback, J.D., 2006. Analysis of Pax6 expression using a BAC transgene reveals the presence of a paired-less isoform of Pax6 in the eye and olfactory bulb. *Dev. Biol.* 292, 486–505.
- Kleinjan, D., Seawright, A., Child, A., van heynigen, V., 2004. Conserved elements in Pax6 intron 7 involved in (auto)regulation and alternative transcription. *Dev. Biol.* 265, 462–477.
- Kleinjan, D.A., Banciewicz, R.M., Gautier, P., Dahm, R., Schonhaler, H.B., Damante, G., Seawright, A., Hever, A.M., Yeyati, P.L., van Heyningen, V., Coutinho, P., 2008. Subfunctionalization of duplicated zebrafish pax6 genes by cis-regulatory divergence. *PLoS Genet.* 4, e29.
- Kleinjan, D.A., Seawright, A., Mella, S., Carr, C.B., Tyas, D.A., Simpson, T.I., Mason, J.O., Price, D.J., van Heyningen, V., 2006. Long-range downstream enhancers are essential for Pax6 expression. *Dev. Biol.* 299, 563–581.
- Kleinjan, D.A., Seawright, A., Schedl, A., Quinlan, R.A., Danes, S., van Heyningen, V., 2001. Aniridia-associated translocations, DNase hypersensitivity, sequence comparison and transgenic analysis redefine the functional domain of PAX6. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2049–2059.
- Kleinjan, D.A., van Heyningen, V., 2005. Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease. *Am. J. Hum. Genet.* 76, 8–32.
- Kovach, C., Dixit, R., Li, S., Mattar, P., Wilkinson, G., Elsen, G.E., Kurrasch, D.M., Hevner, R.F., Schuurmans, C., 2013. Neurog2 simultaneously activates and represses alternative gene expression programs in the developing neocortex. *Cereb. Cortex* 23, 1884–1900.
- 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. *Mol. Cell Biol.* 32, 2596–2607.
- Lee, S., Lee, B., Lee, J.W., Lee, S.K., 2009. Retinoid signaling and neurogenin2 function are coupled for the specification of spinal motor neurons through a chromatin modifier CBP. *Neuron* 62, 641–654.
- Lohjais, 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. *Dev. Biol.* 273, 195–209.
- Ma, Q., Chen, Z., del Barco Barrantes, I., de la Pompa, J.L., Anderson, D.J., 1998. neurogenin1 is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia. *Neuron* 20, 469–482.
- Ma, Q., Kintner, C., Anderson, D.J., 1996. Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 87, 43–52.
- Madelaine, R., Blader, P., 2011. A cluster of non-redundant Ngn1 binding sites is required for regulation of deltaEa expression in zebrafish. *Dev. Biol.* 350, 198–207.
- Mangelsdorf, D.J., Evans, R.M., 1995. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841–850.
- McBride, D.J., Buckle, A., van Heyningen, V., Kleinjan, D.A., 2011. DNase hypersensitivity and ultraconservation reveal novel, interdependent long-range enhancers at the complex Pax6 cis-regulatory region. *PLoS One* 6, e28616.
- Megason, S.G., 2009. *In toto* imaging of embryogenesis with confocal time-lapse microscopy. *Methods Mol. Biol.* 546, 317–332.
- Megason, S.G., McMahon, A.P., 2002. A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. *Development* 129, 2087–2098.
- Moore, S., Ribes, V., Terriente, J., Wilkinson, D., Relaix, F., Briscoe, J., 2013. Distinct regulatory mechanisms act to establish and maintain Pax3 expression in the developing neural tube. *PLoS Genet.* 9, e1003811.
- Nornes, S., Clarkson, M., Mikkola, L., Pedersen, M., Bardsley, A., Martinez, J.P., Krauss, S., Johansen, T., 1998. Zebrafish contains two pax6 genes involved in eye development. *Mech. Dev.* 77, 185–196.
- Novitsch, B.G., Wichterle, H., Jessell, T.M., Sockanathan, S., 2003. A requirement for retinoic acid-mediated transcriptional activation in ventral neural patterning and motor neuron specification. *Neuron* 40, 81–95.
- Oosterveen, T., Kurdija, S., Alekseenko, Z., Uhde, C.W., Bergsland, M., Sandberg, M., Andersson, E., Dias, J.M., Muhr, J., Ericson, J., 2012. Mechanistic differences in the transcriptional interpretation of local and long-range Shh morphogen signaling. *Dev. Cell* 23, 1006–1019.
- Osumi, N., Shinohara, H., Numayama-Tsuruta, K., Maekawa, M., 2008. Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. *Stem Cells* 26, 1663–1672.
- Picelli, S., Bjorklund, A.K., Reinius, B., Sagasser, S., Winberg, G., Sandberg, R., 2014. Tn5 transposase and tagmentation procedures for massively scaled sequencing projects. *Genome Res.* 24, 2033–2040.
- Pituello, F., 1997. Neuronal specification: generating diversity in the spinal cord. *Curr. Biol.* 7, R701–R704.
- Plaza, S., Dozier, C., Langlois, M.C., Saule, S., 1995a. Identification and characterization of a neuroretina-specific enhancer element in the quail Pax-6 (Pax-QNR) gene. *Mol. Cell Biol.* 15, 892–903.
- Plaza, S., Dozier, C., Turque, N., Saule, S., 1995b. Quail Pax-6 (Pax-QNR) mRNAs are expressed from two promoters used differentially during retina development and neuronal differentiation. *Mol. Cell Biol.* 15, 3344–3353.
- Potier, D., Seyres, D., Guichard, C., Iche-Torres, M., Aerts, S., Herrmann, C., Perrin, L., 2014. Identification of cis-regulatory modules encoding temporal dynamics during development. *BMC Genom.* 15, 534.
- Ramirez, F., Dundar, F., Diehl, S., Gruning, B.A., Manke, T., 2014. deepTools: a flexible platform for exploring deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 42, W187–W191.
- Ribes, V., Stutzmann, F., Bianchetti, L., Guillemot, F., Dolle, P., Le Roux, I., 2008. Combinatorial signalling controls Neurogenin2 expression at the onset of spinal neurogenesis. *Dev. Biol.* 321, 470–481.
- Ross, S.E., Greenberg, M.E., Stiles, C.D., 2003. Basic helix-loop-helix factors in cortical development. *Neuron* 39, 13–25.
- Sansom, S.N., Griffiths, D.S., Faedo, A., Kleinjan, D.J., Ruan, Y., Smith, J., van Heyningen, V., Rubenstein, J.L., Livesey, F.J., 2009. The level of the transcription factor Pax6 is essential for controlling the balance between neural stem cell self-renewal and neurogenesis. *PLoS Genet.* 5, e1000511.
- Simpson, T.I., Price, D.J., 2002. Pax6; a pleiotropic player in development. *Bioessays* 24, 1041–1051.
- Spitz, F., Furlong, E.E., 2012. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nat. Rev. Genet.* 13, 613–626.
- St-Onge, L., Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Mansouri, A., Gruss, P., 1997. Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature* 387, 406–409.
- Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Misono, S., Lin, M.Z., Zubiaga, A., Hua, X., Fan, G., Greenberg, M.E., 2001. Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* 104, 365–376.
- Thierion, E., Le Men, J., Collombet, S., Hernandez, C., Couplier, F., Torbey, P., Thomas-Chollier, M., Noordermeer, D., Charnay, P., Gilardi-Hohenstreit, P., 2017. Krox20 hindbrain regulation incorporates multiple modes of cooperation between cis-acting elements. *PLoS Genet.* 13, e1006903.
- Umesono, K., Murakami, K.K., Thompson, C.C., Evans, R.M., 1991. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* 65, 1255–1266.
- van Heyningen, V., Williamson, K.A., 2002. PAX6 in sensory development. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1161–1167.
- Vitobello, A., Ferretti, E., Lampe, X., Vilain, N., Ducret, S., Ori, M., Spetz, J.F., Selli, L., Rijli, F.M., 2011. Hox and Pbx factors control retinoic acid synthesis during hindbrain segmentation. *Dev. Cell.* 20, 469–482.
- Westerfield, M. (Ed.), 1995. *A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*. OR: University of Oregon Press, Eugene.
- Williams, S.C., Altmann, C.R., Chow, R.L., Hemmati-Brivanlou, A., Lang, R.A., 1998. A highly conserved lens transcriptional control element from the Pax-6 gene. *Mech. Dev.* 73, 225–229.
- Xu, P.X., Zhang, X., Heaney, S., Yoon, A., Michelson, A.M., Maas, R.L., 1999. Regulation of Pax6 expression is conserved between mice and flies. *Development* 126, 383–395.
- Xu, Z.P., Saunders, G.F., 1998. Pax6 intronic sequence targets expression to the spinal cord. *Dev. Genet.* 23, 259–263.
- Zhou, V.W., Goren, A., Bernstein, B.E., 2011. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nat. Rev. Genet.* 12, 7–18.

Références

- Agirman, G., Broix, L., and Nguyen, L. (2017). Cerebral cortex development: an outside-in perspective. *FEBS Lett.* *591*, 3978–3992.
- Agius, E., Bel-Vialar, S., Bonnet, F., and Pituello, F. (2014). Cell cycle and cell fate in the developing nervous system: the role of CDC25B phosphatase. *Cell Tissue Res.*
- Ali, F., Hindley, C., McDowell, G., Deibler, R., Jones, A., Kirschner, M., Guillemot, F., and Philpott, A. (2011). Cell cycle-regulated multi-site phosphorylation of Neurogenin 2 coordinates cell cycling with differentiation during neurogenesis. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 4267–4277.
- Ali, F.R., Cheng, K., Kirwan, P., Metcalfe, S., Livesey, F.J., Barker, R.A., and Philpott, A. (2014). The phosphorylation status of *Ascl1* is a key determinant of neuronal differentiation and maturation in vivo and in vitro. *Dev. Camb. Engl.* *141*, 2216–2224.
- Aprea, J., Prenninger, S., Dori, M., Ghosh, T., Monasor, L.S., Wessendorf, E., Zocher, S., Massalini, S., Alexopoulou, D., Lesche, M., et al. (2013). Transcriptome sequencing during mouse brain development identifies long non-coding RNAs functionally involved in neurogenic commitment. *EMBO J.* *32*, 3145–3160.
- Arai, Y., Pulvers, J.N., Haffner, C., Schilling, B., Nüsslein, I., Calegari, F., and Huttner, W.B. (2011). Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nat. Commun.* *2*, 154.
- Artegiani, B., Lindemann, D., and Calegari, F. (2011). Overexpression of *cdk4* and *cyclinD1* triggers greater expansion of neural stem cells in the adult mouse brain. *J. Exp. Med.* *208*, 937–948.
- Ayeni, J.O., Audibert, A., Fichelson, P., Srayko, M., Gho, M., and Campbell, S.D. (2016). G2 phase arrest prevents bristle progenitor self-renewal and synchronizes cell division with cell fate differentiation. *Dev. Camb. Engl.* *143*, 1160–1169.
- Azaïs, M., Agius, E., Blanco, S., Gautrais, J., Molina, A., Pituello, F., and Tregan, J.-M. (2018). Mathematical modeling supports fate restriction in neurogenic progenitors of the embryonic ventral spinal cord. *BioRxiv* 384347.
- Baffet, A.D., Hu, D.J., and Vallee, R.B. (2015). Cdk1 Activates Pre-mitotic Nuclear Envelope Dynein Recruitment and Apical Nuclear Migration in Neural Stem Cells. *Dev. Cell* *33*, 703–716.
- Batsché, E., Moschopoulos, P., Desroches, J., Bilodeau, S., and Drouin, J. (2005). Retinoblastoma and the related pocket protein p107 act as coactivators of NeuroD1 to enhance gene transcription. *J. Biol. Chem.* *280*, 16088–16095.
- Bel-Vialar, S., Medevielle, F., and Pituello, F. (2007). The on/off of Pax6 controls the tempo of neuronal differentiation in the developing spinal cord. *Dev. Biol.* *305*, 659–673.

- Bénazéraf, B., Chen, Q., Peco, E., Lobjois, V., Médevielle, F., Ducommun, B., and Pituello, F. (2006). Identification of an unexpected link between the Shh pathway and a G2/M regulator, the phosphatase CDC25B. *Dev. Biol.* *294*, 133–147.
- Bertrand, N., Castro, D.S., and Guillemot, F. (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat. Rev. Neurosci.* *3*, 517–530.
- Besson, A., Gurian-West, M., Schmidt, A., Hall, A., and Roberts, J.M. (2004). p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes Dev.* *18*, 862–876.
- Bian, S., Hong, J., Li, Q., Schebelle, L., Pollock, A., Knauss, J.L., Garg, V., and Sun, T. (2013). MicroRNA cluster miR-17-92 regulates neural stem cell expansion and transition to intermediate progenitors in the developing mouse neocortex. *Cell Rep.* *3*, 1398–1406.
- Bienvenu, F., Jirawatnotai, S., Elias, J.E., Meyer, C.A., Mizeracka, K., Marson, A., Frampton, G.M., Cole, M.F., Odom, D.T., Odajima, J., et al. (2010). Transcriptional role of cyclin D1 in development revealed by a genetic-proteomic screen. *Nature* *463*, 374–378.
- Bonnet, F., Molina, A., Roussat, M., Azais, M., Bel-Vialar, S., Gautrais, J., Pituello, F., and Agius, E. (2018a). Neurogenic decisions require a cell cycle independent function of the CDC25B
- Boutros, R., and Ducommun, B. (2008). Asymmetric localization of the CDC25B phosphatase to the mother centrosome during interphase. *Cell Cycle Georget. Tex* *7*, 401–406.
- Boutros, R., Dozier, C., and Ducommun, B. (2006). The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr. Opin. Cell Biol.* *18*, 185–191.
- Boutros, R., Lobjois, V., and Ducommun, B. (2007a). CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat. Rev. Cancer* *7*, 495–507.
- Boutros, R., Lobjois, V., and Ducommun, B. (2007b). CDC25B involvement in the centrosome duplication cycle and in microtubule nucleation. *Cancer Res.* *67*, 11557–11564.
- Boutros, R., Mondesert, O., Lorenzo, C., Astuti, P., McArthur, G., Chircop, M., Ducommun, B., and Gabrielli, B. (2013). CDC25B overexpression stabilises centrin 2 and promotes the formation of excess centriolar foci. *PLoS One* *8*, e67822.
- Briscoe, J., and Ericson, J. (2001). Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr. Opin. Neurobiol.* *11*, 43–49.
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T.M., and Ericson, J. (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* *101*, 435–445.
- Butler, S.J., and Bronner, M.E. (2015). From classical to current: analyzing peripheral nervous system and spinal cord lineage and fate. *Dev. Biol.* *398*, 135–146.
- Calegari, F., and Huttner, W.B. (2003). An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. *J. Cell Sci.* *116*, 4947–4955.

- Calegari, F., Haubensak, W., Haffner, C., and Huttner, W.B. (2005). Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 6533–6538.
- Carabalona, A., Hu, D.J.-K., and Vallee, R.B. (2016). KIF1A inhibition immortalizes brain stem cells but blocks BDNF-mediated neuronal migration. *Nat. Neurosci.* *19*, 253–262.
- Cardozo, M.J., Mysiak, K.S., Becker, T., and Becker, C.G. (2017). Reduce, reuse, recycle - Developmental signals in spinal cord regeneration. *Dev. Biol.* *432*, 53–62.
- Caspary, T., and Anderson, K.V. (2003a). Patterning cell types in the dorsal spinal cord: what the mouse mutants say. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 289–297.
- Castro, D.S., Martynoga, B., Parras, C., Ramesh, V., Pacary, E., Johnston, C., Drechsel, D., Lebel-Potter, M., Garcia, L.G., Hunt, C., et al. (2011). A novel function of the proneural factor *Ascl1* in progenitor proliferation identified by genome-wide characterization of its targets. *Genes Dev.* *25*, 930–945.
- Caviness, V.S., Takahashi, T., and Nowakowski, R.S. (1995). Numbers, time and neocortical neuronogenesis: a general developmental and evolutionary model. *Trends Neurosci.* *18*, 379–383.
- Chen, M.S., Hurov, J., White, L.S., Woodford-Thomas, T., and Piwnicka-Worms, H. (2001). Absence of apparent phenotype in mice lacking *Cdc25C* protein phosphatase. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 3853–3861.
- Collier, J.R., Monk, N.A., Maini, P.K., and Lewis, J.H. (1996). Pattern formation by lateral inhibition with feedback: a mathematical model of delta-notch intercellular signalling. *J. Theor. Biol.* *183*, 429–446.
- Conduit, P.T., Wainman, A., and Raff, J.W. (2015). Centrosome function and assembly in animal cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 611–624.
- Coumilleau, F., Fürthauer, M., Knoblich, J.A., and González-Gaitán, M. (2009). Directional Delta and Notch trafficking in Sara endosomes during asymmetric cell division. *Nature* *458*, 1051–1055.
- Cremisi, F., Philpott, A., and Ohnuma, S. (2003). Cell cycle and cell fate interactions in neural development. *Curr. Opin. Neurobiol.* *13*, 26–33.
- Das, R.M., and Storey, K.G. (2014). Apical Abscission Alters Cell Polarity and Dismantles the Primary Cilium During Neurogenesis. *Science* *343*, 200–204.
- Davidson, G., Shen, J., Huang, Y.-L., Su, Y., Karaulanov, E., Bartscherer, K., Hassler, C., Stannek, P., Boutros, M., and Niehrs, C. (2009). Cell cycle control of wnt receptor activation. *Dev. Cell* *17*, 788–799.
- Del Bene, F., Wehman, A.M., Link, B.A., and Baier, H. (2008). Regulation of neurogenesis by interkinetic nuclear migration through an apical-basal notch gradient. *Cell* *134*, 1055–1065.

- Delaunay, D., Kawaguchi, A., Dehay, C., and Matsuzaki, F. (2017). Division modes and physical asymmetry in cerebral cortex progenitors. *Curr. Opin. Neurobiol.* *42*, 75–83.
- Delile, J., Rayon, T., Melchionda, M., Edwards, A., Briscoe, J., and Sagner, A. (2019). Single cell transcriptomics reveals spatial and temporal dynamics of gene expression in the developing mouse spinal cord. *Dev. Camb. Engl.* *146*.
- Ding, Y.-Q., Yin, J., Kania, A., Zhao, Z.-Q., Johnson, R.L., and Chen, Z.-F. (2004). *Lmx1b* controls the differentiation and migration of the superficial dorsal horn neurons of the spinal cord. *Dev. Camb. Engl.* *131*, 3693–3703.
- Dobashi, Y., Shoji, M., Kitagawa, M., Noguchi, T., and Kameya, T. (2000). Simultaneous suppression of *cdc2* and *cdk2* activities induces neuronal differentiation of PC12 cells. *J. Biol. Chem.* *275*, 12572–12580.
- Draganova, K., Zemke, M., Zurkirchen, L., Valenta, T., Cantù, C., Okoniewski, M., Schmid, M.-T., Hoffmans, R., Götz, M., Basler, K., et al. (2015). Wnt/ β -catenin signaling regulates sequential fate decisions of murine cortical precursor cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* *33*, 170–182.
- Dyer, M.A., and Cepko, C.L. (2000). p57(Kip2) regulates progenitor cell proliferation and amacrine interneuron development in the mouse retina. *Dev. Camb. Engl.* *127*, 3593–3605.
- El-Brolosy, M.A., Kontarakis, Z., Rossi, A., Kuenne, C., Günther, S., Fukuda, N., Kikhi, K., Boezio, G.L.M., Takacs, C.M., Lai, S.-L., et al. (2019). Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation. *Nature* *568*, 193–197.
- Englund, C., Fink, A., Lau, C., Pham, D., Daza, R.A.M., Bulfone, A., Kowalczyk, T., and Hevner, R.F. (2005). *Pax6*, *Tbr2*, and *Tbr1* are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 247–251.
- Ericson, J., Rashbass, P., Schedl, A., Brenner-Morton, S., Kawakami, A., van Heyningen, V., Jessell, T.M., and Briscoe, J. (1997). *Pax6* controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell* *90*, 169–180.
- Ferguson, A.M., White, L.S., Donovan, P.J., and Piwnicka-Worms, H. (2005). Normal cell cycle and checkpoint responses in mice and cells lacking *Cdc25B* and *Cdc25C* protein phosphatases. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 2853–2860.
- Florio, M., and Huttner, W.B. (2014). Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. *Dev. Camb. Engl.* *141*, 2182–2194.
- Florio, M., Albert, M., Taverna, E., Namba, T., Brandl, H., Lewitus, E., Haffner, C., Sykes, A., Wong, F.K., Peters, J., et al. (2015). Human-specific gene *ARHGAP11B* promotes basal progenitor amplification and neocortex expansion. *Science* *347*, 1465–1470.
- Foucrier, J., and Le Moigne, A. *Biologie du développement*. 5ème édition.
- Frantz, G.D., and McConnell, S.K. (1996). Restriction of late cerebral cortical progenitors to an upper-layer fate. *Neuron* *17*, 55–61.

- Freret-Hodara, B., Cui, Y., Griveau, A., Vigier, L., Arai, Y., Touboul, J., and Pierani, A. (2017). Enhanced Abventricular Proliferation Compensates Cell Death in the Embryonic Cerebral Cortex. *Cereb. Cortex* 27, 4701–4718.
- Galaktionov, K., and Beach, D. (1991). Specific activation of cdc25 tyrosine phosphatases by B-type cyclins: evidence for multiple roles of mitotic cyclins. *Cell* 67, 1181–1194.
- Gertz, C.C., Lui, J.H., LaMonica, B.E., Wang, X., and Kriegstein, A.R. (2014). Diverse behaviors of outer radial glia in developing ferret and human cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 2559–2570.
- Glasgow, S.M., Henke, R.M., Macdonald, R.J., Wright, C.V.E., and Johnson, J.E. (2005). Ptf1a determines GABAergic over glutamatergic neuronal cell fate in the spinal cord dorsal horn. *Dev. Camb. Engl.* 132, 5461–5469.
- Glickstein, S.B., Monaghan, J.A., Koeller, H.B., Jones, T.K., and Ross, M.E. (2009). Cyclin D2 is critical for intermediate progenitor cell proliferation in the embryonic cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 9614–9624.
- Gonzales, K.A.U., Liang, H., Lim, Y.-S., Chan, Y.-S., Yeo, J.-C., Tan, C.-P., Gao, B., Le, B., Tan, Z.-Y., Low, K.-Y., et al. (2015). Deterministic Restriction on Pluripotent State Dissolution by Cell-Cycle Pathways. *Cell* 162, 564–579.
- Gorski, J.A., Talley, T., Qiu, M., Puellas, L., Rubenstein, J.L.R., and Jones, K.R. (2002). Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 6309–6314.
- Govindan, S., and Jabaudon, D. (2017). Coupling progenitor and neuronal diversity in the developing neocortex. *FEBS Lett.* 591, 3960–3977.
- Gross, M.K., Dottori, M., and Goulding, M. (2002). Lbx1 specifies somatosensory association interneurons in the dorsal spinal cord. *Neuron* 34, 535–549.
- Gruber, R., Zhou, Z., Sukchev, M., Joerss, T., Frappart, P.-O., and Wang, Z.-Q. (2011). MCPH1 regulates the neuroprogenitor division mode by coupling the centrosomal cycle with mitotic entry through the Chk1-Cdc25 pathway. *Nat. Cell Biol.* 13, 1325–1334.
- Harashima, H., Dissmeyer, N., and Schnittger, A. (2013). Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends Cell Biol.* 23, 345–356.
- Hardwick, L.J.A., Ali, F.R., Azzarelli, R., and Philpott, A. (2015). Cell cycle regulation of proliferation versus differentiation in the central nervous system. *Cell Tissue Res.* 359, 187–200.
- Hasenpusch-Theil, K., West, S., Kelman, A., Kozic, Z., Horrocks, S., McMahon, A.P., Price, D.J., Mason, J.O., and Theil, T. (2018). Gli3 controls the onset of cortical neurogenesis by regulating the radial glial cell cycle through Cdk6 expression. *Dev. Camb. Engl.* 145.

- Hatakeyama, J., Bessho, Y., Katoh, K., Ookawara, S., Fujioka, M., Guillemot, F., and Kageyama, R. (2004). Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Dev. Camb. Engl.* *131*, 5539–5550.
- Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W., and Huttner, W.B. (2004). Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 3196–3201.
- Helms, A.W., and Johnson, J.E. (2003a). Specification of dorsal spinal cord interneurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* *13*, 42–49.
- Hindley, C., Ali, F., McDowell, G., Cheng, K., Jones, A., Guillemot, F., and Philpott, A. (2012). Post-translational modification of Ngn2 differentially affects transcription of distinct targets to regulate the balance between progenitor maintenance and differentiation. *Dev. Camb. Engl.* *139*, 1718–1723.
- Hsieh, Y.-W., and Yang, X.-J. (2009). Dynamic Pax6 expression during the neurogenic cell cycle influences proliferation and cell fate choices of retinal progenitors. *Neural Develop.* *4*, 32.
- Hu, D.J.-K., Baffet, A.D., Nayak, T., Akhmanova, A., Doye, V., and Vallee, R.B. (2013). Dynein recruitment to nuclear pores activates apical nuclear migration and mitotic entry in brain progenitor cells. *Cell* *154*, 1300–1313.
- Imayoshi, I., Isomura, A., Harima, Y., Kawaguchi, K., Kori, H., Miyachi, H., Fujiwara, T., Ishidate, F., and Kageyama, R. (2013). Oscillatory control of factors determining multipotency and fate in mouse neural progenitors. *Science* *342*, 1203–1208.
- Isshiki, T., Pearson, B., Holbrook, S., and Doe, C.Q. (2001). *Drosophila* neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny. *Cell* *106*, 511–521.
- Jiang, Y., and Hsieh, J. (2014). HDAC3 controls gap 2/mitosis progression in adult neural stem/progenitor cells by regulating CDK1 levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 13541–13546.
- Kakizuka, A., Sebastian, B., Borgmeyer, U., Hermans-Borgmeyer, I., Bolado, J., Hunter, T., Hoekstra, M.F., and Evans, R.M. (1992). A mouse *cdc25* homolog is differentially and developmentally expressed. *Genes Dev.* *6*, 578–590.
- Kang, W., Wong, L.C., Shi, S.-H., and Hébert, J.M. (2009). The transition from radial glial to intermediate progenitor cell is inhibited by FGF signaling during corticogenesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 14571–14580.
- Kicheva, A., Bollenbach, T., Ribeiro, A., Valle, H.P., Lovell-Badge, R., Episkopou, V., and Briscoe, J. (2014). Coordination of progenitor specification and growth in mouse and chick spinal cord. *Science* *345*, 1254927.
- Komada, M., Saito, H., Kinboshi, M., Miura, T., Shiota, K., and Ishibashi, M. (2008a). Hedgehog signaling is involved in development of the neocortex. *Dev. Camb. Engl.* *135*, 2717–2727.

- Konno, D., Shioi, G., Shitamukai, A., Mori, A., Kiyonari, H., Miyata, T., and Matsuzaki, F. (2008). Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nat. Cell Biol.* *10*, 93–101.
- Körner, K., Jérôme, V., Schmidt, T., and Müller, R. (2001). Cell cycle regulation of the murine *cdc25B* promoter: essential role for nuclear factor-Y and a proximal repressor element. *J. Biol. Chem.* *276*, 9662–9669.
- Kosodo, Y., Suetsugu, T., Suda, M., Mimori-Kiyosue, Y., Toida, K., Baba, S.A., Kimura, A., and Matsuzaki, F. (2011). Regulation of interkinetic nuclear migration by cell cycle-coupled active and passive mechanisms in the developing brain. *EMBO J.* *30*, 1690–1704.
- Kowalczyk, T., Pontious, A., Englund, C., Daza, R.A.M., Bedogni, F., Hodge, R., Attardo, A., Bell, C., Huttner, W.B., and Hevner, R.F. (2009). Intermediate neuronal progenitors (basal progenitors) produce pyramidal-projection neurons for all layers of cerebral cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* *19*, 2439–2450.
- Kuwahara, A., Hirabayashi, Y., Knoepfler, P.S., Taketo, M.M., Sakai, J., Kodama, T., and Gotoh, Y. (2010). Wnt signaling and its downstream target N-myc regulate basal progenitors in the developing neocortex. *Dev. Camb. Engl.* *137*, 1035–1044.
- Kwan, K.Y., Šestan, N., and Anton, E.S. (2012). Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Dev. Camb. Engl.* *139*, 1535–1546.
- Lacomme, M., Liaubet, L., Pituello, F., and Bel-Vialar, S. (2012a). 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. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 2596–2607.
- Lai, K., Kaspar, B.K., Gage, F.H., and Schaffer, D.V. (2003). Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat. Neurosci.* *6*, 21–27.
- LaMonica, B.E., Lui, J.H., Hansen, D.V., and Kriegstein, A.R. (2013). Mitotic spindle orientation predicts outer radial glial cell generation in human neocortex. *Nat. Commun.* *4*, 1665.
- Lancaster, M.A., and Knoblich, J.A. (2012). Spindle orientation in mammalian cerebral cortical development. *Curr. Opin. Neurobiol.* *22*, 737–746.
- Lanctot, A.A., Guo, Y., Le, Y., Edens, B.M., Nowakowski, R.S., and Feng, Y. (2017). Loss of Brap Results in Premature G1/S Phase Transition and Impeded Neural Progenitor Differentiation. *Cell Rep.* *20*, 1148–1160.
- Lange, C., Huttner, W.B., and Calegari, F. (2009a). Cdk4/cyclinD1 overexpression in neural stem cells shortens G1, delays neurogenesis, and promotes the generation and expansion of basal progenitors. *Cell Stem Cell* *5*, 320–331.
- Le Dréau, G., Saade, M., Gutiérrez-Vallejo, I., and Martí, E. (2014). The strength of SMAD1/5 activity determines the mode of stem cell division in the developing spinal cord. *J. Cell Biol.* *204*, 591–605.

- Lee, G., White, L.S., Hurov, K.E., Stappenbeck, T.S., and Piwnica-Worms, H. (2009). Response of small intestinal epithelial cells to acute disruption of cell division through CDC25 deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 4701–4706.
- Lee, G., Origanti, S., White, L.S., Sun, J., Stappenbeck, T.S., and Piwnica-Worms, H. (2011). Contributions made by CDC25 phosphatases to proliferation of intestinal epithelial stem and progenitor cells. *PLoS One* *6*, e15561.
- Leingärtner, A., Thuret, S., Kroll, T.T., Chou, S.-J., Leasure, J.L., Gage, F.H., and O’Leary, D.D.M. (2007). Cortical area size dictates performance at modality-specific behaviors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 4153–4158.
- Leone, D.P., Srinivasan, K., Chen, B., Alcamo, E., and McConnell, S.K. (2008). The determination of projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Curr. Opin. Neurobiol.* *18*, 28–35.
- Leung, L., Klopper, A.V., Grill, S.W., Harris, W.A., and Norden, C. (2011). Apical migration of nuclei during G2 is a prerequisite for all nuclear motion in zebrafish neuroepithelia. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 5003–5013.
- Li, H., Collado, M., Villasante, A., Matheu, A., Lynch, C.J., Cañamero, M., Rizzoti, K., Carneiro, C., Martínez, G., Vidal, A., et al. (2012). p27(Kip1) directly represses Sox2 during embryonic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell* *11*, 845–852.
- Liang, H., Hippenmeyer, S., and Ghashghaei, H.T. (2012a). A Nestin-cre transgenic mouse is insufficient for recombination in early embryonic neural progenitors. *Biol. Open* *1*, 1200–1203.
- Liang, H., Xiao, G., Yin, H., Hippenmeyer, S., Horowitz, J.M., and Ghashghaei, H.T. (2013). Neural development is dependent on the function of specificity protein 2 in cell cycle progression. *Dev. Camb. Engl.* *140*, 552–561.
- Lim, S., and Kaldis, P. (2012). Loss of Cdk2 and Cdk4 induces a switch from proliferation to differentiation in neural stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* *30*, 1509–1520.
- Lin, M.-J., and Lee, S.-J. (2016). Stathmin-like 4 is critical for the maintenance of neural progenitor cells in dorsal midbrain of zebrafish larvae. *Sci. Rep.* *6*, 36188.
- Lincoln, A.J., Wickramasinghe, D., Stein, P., Schultz, R.M., Palko, M.E., De Miguel, M.P., Tessarollo, L., and Donovan, P.J. (2002). Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nat. Genet.* *30*, 446–449.
- Lobjois, V., Benazeraf, B., Bertrand, N., Medevielle, F., and 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. *Dev. Biol.* *273*, 195–209.
- Lobjois, V., Bel-Vialar, S., Trousse, F., and Pituello, F. (2008). Forcing neural progenitor cells to cycle is insufficient to alter cell-fate decision and timing of neuronal differentiation in the spinal cord. *Neural Develop.* *3*, 4.

- Lopes, C.S., and Casares, F. (2015). Eye selector logic for a coordinated cell cycle exit. *PLoS Genet.* *11*, e1004981.
- Loulier, K., Barry, R., Mahou, P., Le Franc, Y., Supatto, W., Matho, K.S., Ieng, S., Fouquet, S., Dupin, E., Benosman, R., et al. (2014). Multiplex cell and lineage tracking with combinatorial labels. *Neuron* *81*, 505–520.
- Lukaszewicz, A.I., and Anderson, D.J. (2011). Cyclin D1 promotes neurogenesis in the developing spinal cord in a cell cycle-independent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 11632–11637.
- Lukaszewicz, A., Savatier, P., Cortay, V., Kennedy, H., and Dehay, C. (2002). Contrasting effects of basic fibroblast growth factor and neurotrophin 3 on cell cycle kinetics of mouse cortical stem cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 6610–6622.
- Mairet-Coello, G., Tury, A., Van Buskirk, E., Robinson, K., Genestine, M., and DiCicco-Bloom, E. (2012). p57(KIP2) regulates radial glia and intermediate precursor cell cycle dynamics and lower layer neurogenesis in developing cerebral cortex. *Dev. Camb. Engl.* *139*, 475–487.
- Mansouri, A. (2001). Mouse Knockouts: Modifying the Mouse Genome by using Embryonic Stem Cells. In *ELS*, (John Wiley & Sons, Ltd), p.
- Manuel, M.N., Mi, D., Mason, J.O., and Price, D.J. (2015). Regulation of cerebral cortical neurogenesis by the Pax6 transcription factor. *Front. Cell. Neurosci.* *9*, 70.
- Martynoga, B., Morrison, H., Price, D.J., and Mason, J.O. (2005). Foxg1 is required for specification of ventral telencephalon and region-specific regulation of dorsal telencephalic precursor proliferation and apoptosis. *Dev. Biol.* *283*, 113–127.
- Martynoga, B., Drechsel, D., and Guillemot, F. (2012). Molecular control of neurogenesis: a view from the mammalian cerebral cortex. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*.
- Mi, D., Carr, C.B., Georgala, P.A., Huang, Y.-T., Manuel, M.N., Jeanes, E., Niisato, E., Sansom, S.N., Livesey, F.J., Theil, T., et al. (2013). Pax6 exerts regional control of cortical progenitor proliferation via direct repression of Cdk6 and hypophosphorylation of pRb. *Neuron* *78*, 269–284.
- Mihalas, A.B., and Hevner, R.F. (2018). Clonal analysis reveals laminar fate multipotency and daughter cell apoptosis of mouse cortical intermediate progenitors. *Dev. Camb. Engl.* *145*.
- Mihalas, A.B., Elsen, G.E., Bedogni, F., Daza, R.A.M., Ramos-Laguna, K.A., Arnold, S.J., and Hevner, R.F. (2016). Intermediate Progenitor Cohorts Differentially Generate Cortical Layers and Require Tbr2 for Timely Acquisition of Neuronal Subtype Identity. *Cell Rep.* *16*, 92–105.
- Mizuguchi, R., Kriks, S., Cordes, R., Gossler, A., Ma, Q., and Goulding, M. (2006a). Ascl1 and Gsh1/2 control inhibitory and excitatory cell fate in spinal sensory interneurons. *Nat. Neurosci.* *9*, 770–778.
- Molina, A., and Pituello, F. (2017). Playing with the cell cycle to build the spinal cord. *Dev. Biol.* *432*, 14–23.

- Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Menezes, J.R.L., and Macklis, J.D. (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* *8*, 427–437.
- Monuki, E.S., Porter, F.D., and Walsh, C.A. (2001). Patterning of the dorsal telencephalon and cerebral cortex by a roof plate-Lhx2 pathway. *Neuron* *32*, 591–604.
- Mora-Bermúdez, F., Badsha, F., Kanton, S., Camp, J.G., Vernot, B., Köhler, K., Voigt, B., Okita, K., Maricic, T., He, Z., et al. (2016). Differences and similarities between human and chimpanzee neural progenitors during cerebral cortex development. *ELife* *5*.
- Morin, X., Jaouen, F., and Durbec, P. (2007). Control of planar divisions by the G-protein regulator LGN maintains progenitors in the chick neuroepithelium. *Nat. Neurosci.* *10*, 1440–1448.
- Müller, T., Brohmann, H., Pierani, A., Heppenstall, P.A., Lewin, G.R., Jessell, T.M., and Birchmeier, C. (2002). The homeodomain factor *lhx1* distinguishes two major programs of neuronal differentiation in the dorsal spinal cord. *Neuron* *34*, 551–562.
- Munji, R.N., Choe, Y., Li, G., Siegenthaler, J.A., and Pleasure, S.J. (2011). Wnt signaling regulates neuronal differentiation of cortical intermediate progenitors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 1676–1687.
- Murciano, A., Zamora, J., López-Sánchez, J., and Frade, J.M. (2002). Interkinetic nuclear movement may provide spatial clues to the regulation of neurogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.* *21*, 285–300.
- Murray, A.W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* *116*, 221–234.
- Myat, A., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., and Lewis, J. (1996). A chick homologue of Serrate and its relationship with Notch and Delta homologues during central neurogenesis. *Dev. Biol.* *174*, 233–247.
- Najas, S., Arranz, J., Lochhead, P.A., Ashford, A.L., Oxley, D., Delabar, J.M., Cook, S.J., Barallobre, M.J., and Arbonés, M.L. (2015). DYRK1A-mediated Cyclin D1 Degradation in Neural Stem Cells Contributes to the Neurogenic Cortical Defects in Down Syndrome. *EBioMedicine* *2*, 120–134.
- Najas, S., Pijuan, I., Esteve-Codina, A., Usieto, S., Martinez, J.D., Zwijsen, A., Arbonés, M.L., Martí, E., and Dréau, G.L. (2019). A SMAD1/5-YAP signaling module drives radial glial cell expansion and growth of the developing cerebral cortex. *BioRxiv* 558486.
- Nakajo, N., Deno, Y.-K., Ueno, H., Kenmochi, C., Shimuta, K., and Sagata, N. (2011). Temporal and spatial expression patterns of Cdc25 phosphatase isoforms during early *Xenopus* development. *Int. J. Dev. Biol.* *55*, 627–632.
- Nelson, B.R., Hodge, R.D., Bedogni, F., and Hevner, R.F. (2013). Dynamic interactions between intermediate neurogenic progenitors and radial glia in embryonic mouse neocortex: potential role in Dll1-Notch signaling. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 9122–9139.

- Nguyen, L., Besson, A., Heng, J.I.-T., Schuurmans, C., Teboul, L., Parras, C., Philpott, A., Roberts, J.M., and Guillemot, F. (2006). p27kip1 independently promotes neuronal differentiation and migration in the cerebral cortex. *Genes Dev.* *20*, 1511–1524.
- Nogare, D.E.D., Arguello, A., Sazer, S., and Lane, M.E. (2007). Zebrafish *cdc25a* is expressed during early development and limiting for post-blastoderm cell cycle progression. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *236*, 3427–3435.
- Nowakowski, T.J., Fotaki, V., Pollock, A., Sun, T., Pratt, T., and Price, D.J. (2013). MicroRNA-92b regulates the development of intermediate cortical progenitors in embryonic mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 7056–7061.
- Oberst, P., Agirman, G., and Jabaudon, D. (2019a). Principles of progenitor temporal patterning in the developing invertebrate and vertebrate nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* *56*, 185–193.
- Oberst, P., Fièvre, S., Baumann, N., Concetti, C., Bartolini, G., and Jabaudon, D. (2019b). Temporal plasticity of apical progenitors in the developing mouse neocortex. *Nature* *573*, 370–374.
- Ohata, S., Aoki, R., Kinoshita, S., Yamaguchi, M., Tsuruoka-Kinoshita, S., Tanaka, H., Wada, H., Watabe, S., Tsuboi, T., Masai, I., et al. (2011). Dual roles of Notch in regulation of apically restricted mitosis and apicobasal polarity of neuroepithelial cells. *Neuron* *69*, 215–230.
- Ohnuma, S., and Harris, W.A. (2003). Neurogenesis and the cell cycle. *Neuron* *40*, 199–208.
- Ohnuma, S., Hopper, S., Wang, K.C., Philpott, A., and Harris, W.A. (2002). Co-ordinating retinal histogenesis: early cell cycle exit enhances early cell fate determination in the *Xenopus* retina. *Dev. Camb. Engl.* *129*, 2435–2446.
- Okamoto, M., Miyata, T., Konno, D., Ueda, H.R., Kasukawa, T., Hashimoto, M., Matsuzaki, F., and Kawaguchi, A. (2016). Cell-cycle-independent transitions in temporal identity of mammalian neural progenitor cells. *Nat. Commun.* *7*, 11349.
- O’Leary, D.D.M., Chou, S.-J., and Sahara, S. (2007). Area Patterning of the Mammalian Cortex. *Neuron* *56*, 252–269.
- Ostrem, B., Di Lullo, E., and Kriegstein, A. (2017). oRGs and mitotic somal translocation - a role in development and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* *42*, 61–67.
- Osumi, N., Shinohara, H., Numayama-Tsuruta, K., and Maekawa, M. (2008). Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. *Stem Cells Dayt. Ohio* *26*, 1663–1672.
- Paridaen, J.T.M.L., and Huttner, W.B. (2014). Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep.* *15*, 351–364.
- Pauklin, S., and Vallier, L. (2013). The cell-cycle state of stem cells determines cell fate propensity. *Cell* *155*, 135–147.

- Pauklin, S., Madrigal, P., Bertero, A., and Vallier, L. (2016). Initiation of stem cell differentiation involves cell cycle-dependent regulation of developmental genes by Cyclin D. *Genes Dev.* *30*, 421–433.
- Peco, E., Escude, T., Agius, E., Sabado, V., Medevielle, F., Ducommun, B., and Pituello, F. (2012). The CDC25B phosphatase shortens the G2 phase of neural progenitors and promotes efficient neuron production. *Dev. Camb. Engl.* *139*, 1095–1104.
- Philippidou, P., and Dasen, J.S. (2013). Hox genes: choreographers in neural development, architects of circuit organization. *Neuron* *80*, 12–34.
- Pilaz, L.-J., Patti, D., Marcy, G., Ollier, E., Pfister, S., Douglas, R.J., Betizeau, M., Gautier, E., Cortay, V., Doerflinger, N., et al. (2009). Forced G1-phase reduction alters mode of division, neuron number, and laminar phenotype in the cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 21924–21929.
- Pilaz, L.-J., McMahon, J.J., Miller, E.E., Lennox, A.L., Suzuki, A., Salmon, E., and Silver, D.L. (2016). Prolonged mitosis of neural progenitors alters cell fate in the developing brain. *Neuron* *89*, 83–99.
- Pollen, A.A., Nowakowski, T.J., Shuga, J., Wang, X., Leyrat, A.A., Lui, J.H., Li, N., Szpankowski, L., Fowler, B., Chen, P., et al. (2014). Low-coverage single-cell mRNA sequencing reveals cellular heterogeneity and activated signaling pathways in developing cerebral cortex. *Nat. Biotechnol.* *32*, 1053–1058.
- Postel, M., Karam, A., Pézeron, G., Schneider-Maunoury, S., and Clément, F. (2019). A multiscale mathematical model of cell dynamics during neurogenesis in the mouse cerebral cortex. *BMC Bioinformatics* *20*, 470.
- Quastler, H., and Sherman, F.G. (1959). Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exp. Cell Res.* *17*, 420–438.
- Rakic, P. (1995). A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends Neurosci.* *18*, 383–388.
- Rash, B.G., Tomasi, S., Lim, H.D., Suh, C.Y., and Vaccarino, F.M. (2013). Cortical gyrification induced by fibroblast growth factor 2 in the mouse brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 10802–10814.
- Reis, T., and Edgar, B.A. (2004). Negative regulation of dE2F1 by cyclin-dependent kinases controls cell cycle timing. *Cell* *117*, 253–264.
- Ribes, V., and Briscoe, J. (2009). Establishing and Interpreting Graded Sonic Hedgehog Signaling during Vertebrate Neural Tube Patterning: The Role of Negative Feedback. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *1*.
- Richard-Parpaillon, L., Cosgrove, R.A., Devine, C., Vernon, A.E., and Philpott, A. (2004). G1/S phase cyclin-dependent kinase overexpression perturbs early development and delays tissue-specific differentiation in *Xenopus*. *Dev. Camb. Engl.* *131*, 2577–2586.

Russell, P., and Nurse, P. (1986). *cdc25+* functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* 45, 145–153.

Saade, M., Gutiérrez-Vallejo, I., Le Dréau, G., Rabadán, M.A., Miguez, D.G., Buceta, J., and Martí, E. (2013). Sonic hedgehog signaling switches the mode of division in the developing nervous system. *Cell Rep.* 4, 492–503.

Saade, M., Gonzalez-Gobartt, E., Escalona, R., Usieto, S., and Martí, E. (2017). Shh-mediated centrosomal recruitment of PKA promotes symmetric proliferative neuroepithelial cell division. *Nat. Cell Biol.* 19, 493–503.

Sahara, S., and O’Leary, D.D.M. (2009). Fgf10 Regulates Transition Period of Cortical Stem Cell Differentiation to Radial Glia Controlling Generation of Neurons and Basal Progenitors. *Neuron* 63, 48–62.

Sansom, S.N., Griffiths, D.S., Faedo, A., Kleinjan, D.-J., Ruan, Y., Smith, J., van Heyningen, V., Rubenstein, J.L., and Livesey, F.J. (2009). The level of the transcription factor Pax6 is essential for controlling the balance between neural stem cell self-renewal and neurogenesis. *PLoS Genet.* 5, e1000511.

Sargeant, T.J., Day, D.J., Miller, J.H., and Steel, R.W.J. (2008). Acute in utero morphine exposure slows G2/M phase transition in radial glial and basal progenitor cells in the dorsal telencephalon of the E15.5 embryonic mouse. *Eur. J. Neurosci.* 28, 1060–1067.

Schenk, J., Wilsch-Bräuninger, M., Calegari, F., and Huttner, W.B. (2009). Myosin II is required for interkinetic nuclear migration of neural progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 16487–16492.

Schüller, U., Zhao, Q., Godinho, S.A., Heine, V.M., Medema, R.H., Pellman, D., and Rowitch, D.H. (2007). Forkhead Transcription Factor FoxM1 Regulates Mitotic Entry and Prevents Spindle Defects in Cerebellar Granule Neuron Precursors. *Mol. Cell. Biol.* 27, 8259–8270.

Sessa, A., Mao, C.-A., Colasante, G., Nini, A., Klein, W.H., and Broccoli, V. (2010). Tbr2-positive intermediate (basal) neuronal progenitors safeguard cerebral cortex expansion by controlling amplification of pallial glutamatergic neurons and attraction of subpallial GABAergic interneurons. *Genes Dev.* 24, 1816–1826.

Shikata, Y., Okada, T., Hashimoto, M., Ellis, T., Matsumaru, D., Shiroishi, T., Ogawa, M., Wainwright, B., and Motoyama, J. (2011). Ptch1-mediated dosage-dependent action of Shh signaling regulates neural progenitor development at late gestational stages. *Dev. Biol.* 349, 147–159.

Shimojo, H., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2008). Oscillations in notch signaling regulate maintenance of neural progenitors. *Neuron* 58, 52–64.

Shitamukai, A., Konno, D., and Matsuzaki, F. (2011). Oblique radial glial divisions in the developing mouse neocortex induce self-renewing progenitors outside the germinal zone that resemble primate outer subventricular zone progenitors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 3683–3695.

- Silva, C.G., Peyre, E., Adhikari, M.H., Tielens, S., Tanco, S., Van Damme, P., Magno, L., Krusy, N., Agirman, G., Magiera, M.M., et al. (2018). Cell-Intrinsic Control of Interneuron Migration Drives Cortical Morphogenesis. *Cell* 172, 1063–1078.e19.
- Singh, A.M., Chappell, J., Trost, R., Lin, L., Wang, T., Tang, J., Matlock, B.K., Weller, K.P., Wu, H., Zhao, S., et al. (2013). Cell-cycle control of developmentally regulated transcription factors accounts for heterogeneity in human pluripotent cells. *Stem Cell Rep.* 1, 532–544.
- Spear, P.C., and Erickson, C.A. (2012). Apical movement during interkinetic nuclear migration is a two-step process. *Dev. Biol.* 370, 33–41.
- Stahl, R., Walcher, T., De Juan Romero, C., Pilz, G.A., Cappello, S., Irmeler, M., Sanz-Aquela, J.M., Beckers, J., Blum, R., Borrell, V., et al. (2013). *Trnp1* regulates expansion and folding of the mammalian cerebral cortex by control of radial glial fate. *Cell* 153, 535–549.
- Stancik, E.K., Navarro-Quiroga, I., Sellke, R., and Haydar, T.F. (2010). Heterogeneity in ventricular zone neural precursors contributes to neuronal fate diversity in the postnatal neocortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 7028–7036.
- Stolz, A., Neufeld, K., Ertych, N., and Bastians, H. (2015). Wnt-mediated protein stabilization ensures proper mitotic microtubule assembly and chromosome segregation. *EMBO Rep.* 16, 490–499.
- Sur, S., and Agrawal, D.K. (2016). Phosphatases and Kinases Regulating CDC25 Activity in the Cell Cycle: Clinical Implications of CDC25 Overexpression and Potential Treatment Strategies. *Mol. Cell. Biochem.* 416, 33–46.
- Taverna, E., Götz, M., and Huttner, W.B. (2014). The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of the development and evolution of the neocortex. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 465–502.
- Telley, L., Govindan, S., Prados, J., Stevant, I., Nef, S., Dermitzakis, E., Dayer, A., and Jabaudon, D. (2016). Sequential transcriptional waves direct the differentiation of newborn neurons in the mouse neocortex. *Science* 351, 1443–1446.
- Telley, L., Agirman, G., Prados, J., Amberg, N., Fièvre, S., Oberst, P., Bartolini, G., Vitali, I., Cadilhac, C., Hippenmeyer, S., et al. (2019). Temporal patterning of apical progenitors and their daughter neurons in the developing neocortex. *Science* 364.
- Thomas, Y., Peter, M., Mechali, F., Blanchard, J.-M., Coux, O., and Baldin, V. (2014). Kizuna is a novel mitotic substrate for CDC25B phosphatase. *Cell Cycle Georget. Tex* 13, 3867–3877.
- Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P.C., Bock, R., Klein, R., and Schütz, G. (1999). Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat. Genet.* 23, 99–103.
- Tsunekawa, Y., Britto, J.M., Takahashi, M., Polleux, F., Tan, S.-S., and Osumi, N. (2012). Cyclin D2 in the basal process of neural progenitors is linked to non-equivalent cell fates. *EMBO J.* 31, 1879–1892.

- Tuoc, T.C., Boretius, S., Sansom, S.N., Pitulescu, M.-E., Frahm, J., Livesey, F.J., and Stoykova, A. (2013). Chromatin regulation by BAF170 controls cerebral cortical size and thickness. *Dev. Cell* 25, 256–269.
- Turrero García, M., Chang, Y., Arai, Y., and Huttner, W.B. (2016). S-phase duration is the main target of cell cycle regulation in neural progenitors of developing ferret neocortex. *J. Comp. Neurol.* 524, 456–470.
- Tury, A., Mairet-Coello, G., and DiCicco-Bloom, E. (2012). The multiple roles of the cyclin-dependent kinase inhibitory protein p57(KIP2) in cerebral cortical neurogenesis. *Dev. Neurobiol.* 72, 821–842.
- Ueno, H., Nakajo, N., Watanabe, M., Isoda, M., and Sagata, N. (2008). FoxM1-driven cell division is required for neuronal differentiation in early *Xenopus* embryos. *Dev. Camb. Engl.* 135, 2023–2030.
- Van Essen, D.C., Donahue, C.J., and Glasser, M.F. (2018). Development and Evolution of Cerebral and Cerebellar Cortex. *Brain. Behav. Evol.* 91, 158–169.
- Vasistha, N.A., García-Moreno, F., Arora, S., Cheung, A.F.P., Arnold, S.J., Robertson, E.J., and Molnár, Z. (2015). Cortical and Clonal Contribution of Tbr2 Expressing Progenitors in the Developing Mouse Brain. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* 25, 3290–3302.
- Vilas-Boas, F., Fior, R., Swedlow, J.R., Storey, K.G., and Henrique, D. (2011). A novel reporter of notch signalling indicates regulated and random Notch activation during vertebrate neurogenesis. *BMC Biol.* 9, 58.
- Vitali, I., Fièvre, S., Telley, L., Oberst, P., Bariselli, S., Frangeul, L., Baumann, N., McMahon, J.J., Klingler, E., Bocchi, R., et al. (2018). Progenitor Hyperpolarization Regulates the Sequential Generation of Neuronal Subtypes in the Developing Neocortex. *Cell* 174, 1264-1276.e15.
- Wang, H., Ge, G., Uchida, Y., Luu, B., and Ahn, S. (2011). Gli3 is required for maintenance and fate specification of cortical progenitors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 6440–6448.
- Wang, L., Hou, S., and Han, Y.-G. (2016a). Hedgehog signaling promotes basal progenitor expansion and the growth and folding of the neocortex. *Nat. Neurosci.* 19, 888–896.
- Wickramasinghe, D., Becker, S., Ernst, M.K., Resnick, J.L., Centanni, J.M., Tessarollo, L., Gabel, L.B., and Donovan, P.J. (1995). Two CDC25 homologues are differentially expressed during mouse development. *Dev. Camb. Engl.* 121, 2047–2056.
- Wildner, H., Müller, T., Cho, S.-H., Bröhl, D., Cepko, C.L., Guillemot, F., and Birchmeier, C. (2006a). dILA neurons in the dorsal spinal cord are the product of terminal and non-terminal asymmetric progenitor cell divisions, and require Mash1 for their development. *Dev. Camb. Engl.* 133, 2105–2113.
- Wilson, L., and Maden, M. (2005). The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev. Biol.* 282, 1–13.

- Wong, F.K., Fei, J.-F., Mora-Bermúdez, F., Taverna, E., Haffner, C., Fu, J., Anastassiadis, K., Stewart, A.F., and Huttner, W.B. (2015). Sustained Pax6 Expression Generates Primate-like Basal Radial Glia in Developing Mouse Neocortex. *PLOS Biol.* *13*, e1002217.
- Woodhead, G.J., Mutch, C.A., Olson, E.C., and Chenn, A. (2006). Cell-autonomous beta-catenin signaling regulates cortical precursor proliferation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 12620–12630.
- Wrobel, C.N., Mutch, C.A., Swaminathan, S., Taketo, M.M., and Chenn, A. (2007). Persistent expression of stabilized beta-catenin delays maturation of radial glial cells into intermediate progenitors. *Dev. Biol.* *309*, 285–297.
- Wu, S., and Wolgemuth, D.J. (1995a). The distinct and developmentally regulated patterns of expression of members of the mouse Cdc25 gene family suggest differential functions during gametogenesis. *Dev. Biol.* *170*, 195–206.
- Wu, X., Gu, X., Han, X., Du, A., Jiang, Y., Zhang, X., Wang, Y., Cao, G., and Zhao, C. (2014). A novel function for Foxm1 in interkinetic nuclear migration in the developing telencephalon and anxiety-related behavior. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *34*, 1510–1522.
- Yabut, O.R., Fernandez, G., Huynh, T., Yoon, K., and Pleasure, S.J. (2015). Suppressor of Fused Is Critical for Maintenance of Neuronal Progenitor Identity during Corticogenesis. *Cell Rep.* *12*, 2021–2034.
- Zander, M.A., Burns, S.E., Yang, G., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2014). Snail coordinately regulates downstream pathways to control multiple aspects of mammalian neural precursor development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *34*, 5164–5175.
- Zhu, X., Li, B., Ai, Z., Xiang, Z., Zhang, K., Qiu, X., Chen, Y., Li, Y., Rizak, J.D., Niu, Y., et al. (2016). A Robust Single Primate Neuroepithelial Cell Clonal Expansion System for Neural Tube Development and Disease Studies. *Stem Cell Rep.* *6*, 228–242.
- Zhuang, B., and Sockanathan, S. (2006). Dorsal-ventral patterning: a view from the top. *Curr. Opin. Neurobiol.* *16*, 20–24.
- Zimmerman, L., Parr, B., Lendahl, U., Cunningham, M., McKay, R., Gavin, B., Mann, J., Vassileva, G., and McMahon, A. (1994). Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* *12*, 11–24.

Author: Mélanie ROUSSAT

Title: Function of a cell cycle regulator, the CDC25B phosphatase, during mammalian neurogenesis

Supervisor: Sophie BEL-VIALAR

Summary

Building a functional central nervous system requires tight regulation between proliferation of neural stem/progenitor cells, and their differentiation into neurons. Abnormal proliferation can lead to tumor development, whereas early differentiation can deplete the progenitor pool and lead to brain malformations such as microcephaly. Increasing data suggest that the cell cycle kinetic of progenitors can influence their choice between proliferation or differentiation. In the chick embryo neural tube, our group showed that the expression of the CDC25B phosphatase, a positive regulator of the G2/M transition, shortens the G2 phase length and promotes neuronal production. In addition, a part of this neurogenic function of CDC25B is independent of its cell cycle function. In order to improve our understanding of its function in controlling cell fate and determining the part of its dependent and independent cell cycle functions, we generated conditionally CDC25B knock-out murine line. During my PhD project, I took advantage of this genetic model to explore the function of CDC25B during mammalian neurogenesis. My project aimed to (1) determine whether the neurogenic function of CDC25B in the bird model is conserved during mammalian spinal cord development, (2) explore the function of CDC25B during cerebral cortex development. (1) I showed that CDC25B loss-of-function lengthens the G2 phase without affecting the proliferation rate of spinal progenitors, and decreases the production of dorsal neurons. **CDC25B therefore promotes neuronal differentiation in the developing mammalian spinal cord.** (2) The cerebral cortex is the most recent central nervous system tissue from an evolutionary point of view. Its development is more complex and involves a more various cellular diversity than in the spinal cord. During its development, apical progenitors (aRGs) perform proliferative divisions and then switch their mode of division to produce neurons and basal progenitors (bIPs and bRGs). In this tissue, I showed that CDC25B loss-of-function results in a lengthening of the G2 phase and a shortening of the G1 phase of aRGs, without affecting the proliferation rate and the total cell cycle duration. In parallel, I quantified a decrease in bIPs production and an increase in bRGs number. Conversely, CDC25B gain-of-function increases the number of bIPs. CDC25B therefore regulates the ratio of basal progenitors produced from aRGs. In order to determine whether the G1/G2 phase modifications are necessary to affect the production of bIPs, I overexpressed a mutated form of CDC25B, unable to interact with its Cycline B/CDK1 partners at the G2/M transition. This modified form of CDC25B is no longer able to promote bIPs production. It remains to determine which phase, G1 and/or G2, is involved in the regulation of this process. Regarding these results, I propose that CDC25B, through cell cycle kinetic regulation, controls the fate of basal progenitors resulting from aRGs divisions. This PhD project highlights a previously unknown role for a G2/M transition regulator, the CDC25B phosphatase, in the regulation of spinal and cortical neurogenesis in Mammals.

Centre de Biologie Intégrative – Centre de Biologie du Développement, UMR 5547 CNRS/UPS

118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 9