



HAL
open science

Importance de la dynamique de la phase G2 et mécanismes moléculaires recrutés en aval de CDC25B dans le contrôle de la neurogenèse des vertébrés

Sofiane Omerani

► **To cite this version:**

Sofiane Omerani. Importance de la dynamique de la phase G2 et mécanismes moléculaires recrutés en aval de CDC25B dans le contrôle de la neurogenèse des vertébrés. Biologie du développement. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2023. Français. NNT : 2023TOU30152 . tel-04332052

HAL Id: tel-04332052

<https://theses.hal.science/tel-04332052v1>

Submitted on 8 Dec 2023

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
Sofiane OMERANI**

Le 17 juillet 2023

**Importance de la dynamique de la phase G2 et mécanismes
moléculaires recrutés en aval de CDC25B dans le contrôle de la
neurogenèse des vertébrés**

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

Spécialité : **BIOLOGIE DU DEVELOPPEMENT**

Unité de recherche :

MCD - Molecular, Cellular and Developmental Biology Unit

Thèse dirigée par

Sophie BEL-VIALAR

Jury

Mme Muriel PERRON, Rapporteur

M. Xavier MORIN, Rapporteur

M. Alexandre DAVID, Rapporteur

Mme Pascale DUFOURCQ, Examinatrice

Mme Sophie BEL-VIALAR, Directrice de thèse

I. REMERCIEMENTS

Le doctorat, un grand chapitre qui se termine, mais avant de tourner cette page, laissez-moi remercier l'ensemble des personnes qui m'ont soutenu au cours de mon parcours universitaire et de ma thèse.

Je souhaite débiter cette partie en remerciant en premier lieu l'université Paul Sabatier et le centre de biologie intégrative de Toulouse qui m'ont accompagné tout au long de mon parcours universitaire.

Toute ma reconnaissance va également aux membres de mon équipe d'accueil.

À commencer par Fabienne Pituello pour m'avoir donné l'opportunité d'intégrer son équipe et de m'avoir accompagné durant mes dernières années universitaires. Merci pour votre gentillesse, votre bienveillance et votre positivité tout au long de ces années. Cela a été un véritable plaisir et une fierté d'avoir travaillé au sein de votre équipe.

Un grand merci également à ma directrice de thèse Sophie Bel-Vialar, pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet de thèse. Ce projet a été un défi extrêmement intéressant et stimulant à relever et m'a permis de découvrir un large panel de techniques et de modèles. Je suis très fier du parcours que l'on a accompli ensemble et je te remercie de m'avoir donné cette chance. Je tiens également à te remercier pour ton aide, ton soutien et l'ensemble de tes conseils. Merci également pour ton écoute et ta disponibilité tout au long de cette aventure scientifique. Cela a été un grand plaisir d'avoir travaillé avec toi et j'espère que nos chemins se recroiseront.

Evidemment merci aussi à Éric, François, Valérie et Odile, pour votre joie, votre bonne humeur, vos conseils et bien évidemment votre aide tout au long de ces années. Quel plaisir d'avoir travaillé avec vous, j'espère que nous aurons l'occasion de partager d'autres moments.

Dans un second temps je tiens à remercier les personnes qui m'ont accompagné autour de ce projet. A commencer par les membres de mon comité de thèse, Laurence Liaubet et Vanessa Ribes qui m'ont suivi, conseillé et encouragé dans les premières années de mon doctorat. Ensuite les membres de mon jury de thèse, Muriel Perron, Xavier Morin, Alexandre David pour avoir pris le temps d'évaluer mes travaux de thèse. Merci également pour vos retours positifs et encourageants ainsi que pour la riche discussion que nous avons partagée lors de ma soutenance.

Merci également à Pascale Dufourcq pour m'avoir accompagné depuis six ans, c'était un véritable honneur de t'avoir à la présidence du jury. Merci pour tes conseils, tes encouragements tout au long de ces années. C'est en partie grâce à ton engagement inconditionnel pour les étudiants et à ta pédagogie que j'ai pu progresser et aller au bout ce projet.

Je tiens également à remercier les personnes avec qui j'ai pu collaborer lors de cette thèse. En commençant par Marion Aguirrebengoa, qui m'a accompagné en bio-informatique, merci pour ta bonne humeur, ton temps et ta pédagogie. Merci également à Thomas Jungas pour m'avoir fait découvrir le modèle des organoïdes cérébraux, c'était une expérience passionnante et te suis reconnaissant de m'avoir initié à ce nouveau modèle. Merci à

Stéphanie Balor, Vanessa Soldan, et Ramteen Shayan à la plateforme de microscopie électronique à transmission, pour votre patience et votre bonne humeur, c'était un véritable plaisir d'interagir avec vous.

Pour finir, Célia Plisson-Chastang et Simon Lebaron, je vous remercie tout particulièrement pour votre gentillesse, votre bienveillance, votre aide technique et théorique durant les derniers mois de ma thèse. Cela a été un véritable plaisir de travailler avec vous et j'espère que nous aurons également l'occasion de nous revoir.

Je n'oublie pas également les collègues avec qui j'ai pu interagir tout au long de ces années. En commençant par les thésards, merci pour cette solidarité face au défi que représente le doctorat. Aussi, les chercheurs et les ingénieurs du laboratoire, avec les membres des équipes voisines, je pense notamment à David Ohayon, Eric Theveneau, Cathy Danesin, Bertrand Bénazéraf, Julie Batut, Sophie Polès et moins voisines notamment Odile Humbert, Benjamin Albert, Jessie Bourdeaux, Brice Ronsin et Stéphanie Bosch. Merci pour votre gentillesse, les discussions que nous avons pu avoir, votre soutien et bien sûr votre bonne humeur !

Comment pourrais-je oublier, les collègues et maintenant amis du quotidien avec qui nous avons partagé moult repas, discussions scientifiques et philosophiques. Je pense bien sûr à Olivier, Charlène, David, Ali, Julien, Carine, Delphine, Julie et Perrine. Ces années de thèse n'auraient clairement pas été les mêmes sans vous, merci pour tous ces moments de rigolades et de soutien mutuel.

Merci également à ma famille, ma belle famille et mes proches, d'avoir été des piliers dans cette aventure et pour votre soutien tout au long de ces années. Wil, Laurène, Clémence, Jérémie, Manon, Charles, Nathalie, Hippolyte, Mathéa et Marine merci pour votre soutien et l'ensemble de ces moments partagés ! Papa, maman, j'ai eu énormément de chance malgré la distance, d'avoir votre soutien, vos encouragements et bien évidemment votre amour. Bien sûr comment pourrais-je t'oublier Atika, un heureux hasard a fait que nous nous sommes retrouvés dans la même ville, merci infiniment pour tout ton soutien, les moments de fous rires interminables et les longues balades au bord du canal. Papa, maman, Atika, votre présence a été une véritable bouffée d'air pendant toutes ces années et je ne vous remercierai jamais assez d'avoir été là aussi bien dans les bons que dans les mauvais moments. Merci également à Sylvie, Wil, Carine, Xavier, Christophe et Eliane merci pour votre curiosité pour mon travail et votre soutien.

Pour conclure, mes derniers remerciements iront à mon amie, collègue, mais également binôme de vie, Sophie, sans qui toute cette aventure n'aurait clairement pas été la même, merci d'avoir pris soin de moi, de m'avoir soutenu et supporté, merci aussi pour tous ces moments de joie. Tu as été un véritable pilier central tout au long de ce parcours, tu as toujours veillé sur moi et su trouver les mots pour me motiver et me remonter le moral. Merci.

Merci à tous!

II. TABLE DES MATIERES	
I. Remerciements	2
II. Table des matières	4
III. Liste des abréviations	6
IV. Table des figures	8
V. Résumé des travaux de thèse	11
VI. Introduction	13
A. Avant-propos	13
B. Chapitre 1 : Formation du système nerveux	14
1. Développement embryonnaire du système nerveux	15
2. Le tube neural	19
3. Production neuronale	28
4. Dynamique de la neurogenèse dans le tube neural	35
5. Développement du cortex	38
C. Chapitre 2 : Cycle cellulaire et neurogenèse	46
1. Le cycle cellulaire et ses acteurs	46
2. Dynamique et acteurs du cycle cellulaire et l'équilibre prolifération et différenciation	52
3. Rôle de la dynamique du cycle cellulaire dans un contexte de neurogenèse	58
4. La phosphatase CDC25B, un régulateur de l'équilibre prolifération/différenciation au cours de la neurogenèse	65
D. Chapitre 3 : la machinerie traductionnelle et la régulation de l'équilibre prolifération/différenciation des cellules souches	75
1. Nouveaux mécanismes à l'origine de l'équilibre prolifération/différenciation	75
2. Machinerie traductionnelle, biogenèse des ribosomes et destin cellulaire	77
3. Cycle cellulaire et traduction : deux machineries étroitement liées	87
4. Hétérogénéité des ribosomes au cours du développement	90
VII. Objectifs de thèse	97
Caractériser l'importance de la dynamique de la phase G2 et identifier les événements moléculaires et processus biologiques mis en place en aval de CDC25B au cours de la neurogenèse précoce	97
VIII. Résultats	99
A. Partie 1 : La diminution de la durée de la phase G2 est suffisante pour mimer partiellement l'effet neurogénique de CDC25B	99
B. Partie 2 : La phosphatase CDC25B régule l'équilibre prolifération/différenciation des CPNs en modulant l'expression de gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes et la machinerie traductionnelle	110

C.	Partie 3 : Modulation de la machinerie traductionnelle en aval de CDC25B	121
D.	Partie 4 : Importance de la dynamique de la phase G2 dans la régulation de la maturation des progéniteurs neuraxiaux chez l'Humain	134
E.	Conclusion générale : partie résultat	142
IX.	Discussion / Perspectives	144
A.	Partie 1 : Le raccourcissement de la phase G2 est suffisant pour mimer partiellement les fonctions neurogéniques de CDC25B	144
1.	Dans le tube neural de poulet	144
2.	Dans les organoïdes cérébraux	147
B.	Partie 2 : La surexpression de CDC25B induit la transcription de gènes codant des protéines ribosomiques et des protéines d'assemblages	149
C.	Partie 3 : Lien causal entre biogenèse des ribosomes (RiBi)/synthèse protéique et destin cellulaire	157
D.	Conclusion :	158
X.	Matériel et Méthode	160
A.	Embryons de poulet :	160
B.	Lignée perte de fonction conditionnelle de CDC25B :	160
C.	Cultures d'organoïdes cérébraux :	160
D.	Constructions d'ADN et électroporation <i>in ovo</i> :	161
E.	Traitement pharmacologique :	161
F.	Immunofluorescence :	161
G.	Mesure des paramètres du cycle cellulaire :	163
1.	Embryons de poulet :	163
2.	Organoïdes cérébraux Humains :	163
H.	Tri-cellulaire :	164
I.	Extraction ARN :	164
J.	Analyse RNA-seq :	165
K.	Microscopie électronique à transmission :	166
L.	RiboMegaSec :	166
M.	Analyses statistiques :	166
N.	Figures et illustrations :	167
XI.	Annexe	168
XII.	Bibliographie	180

III. LISTE DES ABREVIATIONS

AP	Apical Progenitor/ Progéniteur apical
ADN	acide désoxyribonucléique
aIP	Apical Intermediate Progenitor/ Progéniteur intermédiaire apical
aRG	Apical Radial Glia/ Progéniteur de la glie radiaire
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN Messenger
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
Ascl1	Achaete-scute homolog 1
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
bIP	Basal Intermediate Progenitor / Progéniteur basal intermédiaire
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BP	Basal Progenitor
BrdU	Bromo-desoxy-Uridine
bRG	Basal Radial Glia / Cellule de la glie radiaire basale
CDK	Cyclin Dependent Kinase
CIP/KIP	CDK Interacting Protein/Kinases Inhibitory Protein
CKI	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
dl(1-6)	Interneurones Dorsaux (1-6)
EdU	5-Ethynyl-2'-deoxyuridine
ESC	Embryonic Stem Cell / Cellule souche embryonnaire
FGF	Fibroblast Growth Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase 3 β
H3P	Histone H3 Phosphorylé
HDAC	Histone Deacetylase
HES	Hairy / Enhancer of Split
hESC	Human Embryonic Stem Cells / Cellule souche embryonnaire Humaine
HH	Hamburger and Hamilton (auteurs de l'Atlas du développement embryonnaire du poulet)
HSC	Hematopoietic Stem Cell / Cellule souche hématopoïétique
INK4	Inhibitor of CDK4
INM	Interkinetic Nuclear Migration
LGN/GPSM2	G-protein-signaling modulator 2
MCPH1	Microcephalin-1
mECS	mouse Embryonic Stem Cells / Cellule souche embryonnaire murine
MN	Motoneurone
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
NES	Nuclear Export Signal
NeuroG2	Neurogenin 2
NLS	Nuclear Localization Sequence
NPC	Neural Progenitor Cell / Cellule progénitrice neurale
NSC	Neural Stem cell / Cellule souche neurale
Olig2	Oligodendrocyte transcription factor 2
oRGC	Outer Radial Glia Cells

p53	Tumor protein 53
Pax6	Paired Box 6
PLM	Percentage of Labelled Mitosis
pMN	progéniteurs des motoneurones
Poll	ARN polymérase 1
pV(0-3)	progéniteurs ventraux (0-3)
RA	Retinoic Acid
RiBi	Ribosome Biogenesis
RP	Ribosomal Protein
Shh	Sonic Hedgehog
SMAD1/5	Mothers Against Decapentaplegic Homolog 1/5
Smo	Smoothened
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
Sox2	Sex determining region Y-box 5
SS	Secondary Structures
Tbr2	T-box brain factor 2
TGF β	Transforming Growth Factor β
Tis21 (Btg2)	BTG anti-proliferation factor 2
uORF	Upstream Open Reading Frame
Wnt	Wingless Integration Site

IV. TABLE DES FIGURES

Figure 1. Le système nerveux central :	14
Figure 2. Étapes de la neurulation	16
Figure 3 : Émergence des vésicules encéphaliques :	17
Figure 4 : La moelle épinière :	17
Figure 5. Le tube neural en développement :	19
Figure 6. Polarité apico-basale des progéniteurs du tube neural :	20
Figure 7. Élongation antéro-postérieure du tube neural :	21
Figure 8. Régionalisation antéro-postérieure du tube neural :	22
Figure 9. Régionalisation dorso-ventrale du tube neural :	23
Figure 10. Spécification des domaines de progéniteurs ventraux :	24
Figure 11. Spécification des domaines de progéniteurs dorsaux :	26
Figure 12. Les progéniteurs neuraux réalisent trois modes de division :	28
Figure 13. L'orientation des fuseaux mitotiques dans la régulation du destin des progéniteurs :	30
Figure 14. Facteurs de maturation des progéniteurs neuraux :	32
Figure 15. Pax6 et NeuroG2 acteurs de la maturation et de la différenciation des progéniteurs neuraux :	34
Figure 16. Dynamique de progression de la neurogenèse spinale aviaire et murine :	36
Figure 17. La corticogenèse :	39
Figure 18. Voies de signalisation impliquées dans le développement cortical :	41
Figure 19. Le cycle cellulaire et ses acteurs	46
Figure 20. La voie Rb est essentielle à la transition G1/S :	48
Figure 21. Expression oscillatoire des Cyclines tout au long du cycle cellulaire	49
Figure 22. Les CKI et les phosphatases CDC25 régulateurs de la progression dans le cycle cellulaire :	50
Figure 23. Wee1/Myt1 régulateurs négatifs de CDK1 :	50
Figure 24. l'activité des CDKs au cœur de la régulation de l'équilibre prolifération/différenciation :	52
Figure 25. CDK1 régule la voie des PI3K/Akt :	54
Figure 26. Cycline D1 un régulateur transcriptionnel :	55
Figure 27. Régionalisation des CKIs au sein du tube neural :	56

Figure 28. Dynamiques des phases du cycle cellulaire décrites pour être concomitantes avec la différenciation des cellules souches/progénéiteurs :	65
Figure 29. (a) Arbre phylogénétique des orthologues des phosphatases CDC25. (b) Structures protéiques et variants d'épissage :	66
Figure 30. Sites de phosphorylations activatrices ou inhibitrices des protéines de la famille des CDC25 :	68
Figure 31. L'expression de CDC25B corrèle avec la dynamique de progression de la neurogenèse :	70
Figure 32. La biogenèse des ribosomes :	76
Figure 33. La biogenèse des ribosomes et la synthèse protéique sont dynamiques au cours de la maturation des cellules souches :	79
Figure 34. La voie mTOR au cœur de la régulation de nombreux processus :	81
Figure 35. l'activité de la voie mTOR augmente pour favoriser la maturation et la différenciation de nombreux types cellulaires :	82
Figure 36. Phosphorylation de eIF2 α et maintien de la pluripotence cellulaire :	85
Figure 37. CDK1 un régulateur de la machinerie traductionnelle :	88
Figure 38. Hétérogénéité des ribosomes :	91
Figure 39. La disponibilité en ribosomes, un prérequis pour la traduction de certains ARNm :	93
Figure 40. L'inhibiteur de Wee1 (PD0166285) réduit la durée de la phase G2 des progénéiteurs neuraux :	98
Figure 41. Le PD0166285 induit une diminution de la durée de la phase G2 sans affecter les autres paramètres du cycle cellulaire :	101
Figure 42. La diminution spécifique de la durée de la phase G2 induit une augmentation la proportion des divisions neurogéniques et une diminution des divisions prolifératives :	103
Figure 43. La diminution de la durée de la phase G2 induit une augmentation de la proportion de neurones et une diminution de la proportion de progénéiteurs :	106
Figure 44. CDC25B impacte la durée de la phase G2 dès 18 heures post-électroporation : ..	109
Figure 45. Stratégie du RNA-Seq :	112
Figure 46. La condition CDC25B ^{ACDK} n'est pas discriminable des conditions contrôle et CDC25B :	113
Figure 47. Les conditions contrôles et CDC25B sont discriminables l'une de l'autre :	114
Figure 48. Analyse différentielle et descriptive :	115
Figure 49. Analyse Gene Ontology :	117

Figure 50. La perte de fonction de CDC25B semble affecter la machinerie traductionnelle des progéniteurs neuraux en diminuant la quantité de ribosomes en traduction (polysomes) :	120
Figure 51. Modulation de la biogenèse des ribosomes à la suite d'une perte de fonction de CDC25B dans le tube neural de la souris :	123
Figure 52. La machinerie traductionnelle est modulée en aval d'une diminution de la durée de la phase G2 :	126
Figure 53. La machinerie traductionnelle est altérée par l'inhibiteur pharmacologique BMH21 :	128
Figure 54. La densité des ribosomes cytoplasmiques semble évoluer avec l'état de maturation des progéniteurs :	131
Figure 55. Durée moyenne de la phase G2 dans les progéniteurs Pax6+ des organoïdes cérébraux humains en condition WT :	136
Figure 56. L'inhibiteur de Wee1 (PD0166285) réduit la durée de la phase G2 des progéniteurs Pax6+ humains :	137
Figure 57. L'inhibiteur de Wee1 (PD0166285) n'impacte pas significativement la proportion progéniteurs Pax6+ en phase G1 :	139
Figure 58. L'inhibiteur de Wee1 (PD0166285) semble provoquer une maturation précoce des progéniteurs apicaux (aRGs) en progéniteurs basaux (bIPs) :	140
Figure 59. Variabilité inter-expérimentale de l'incorporation d'EdU :	145
Figure 60. Modèle proposé des fonctions neurogéniques de CDC25B au cours de la phase G2 :	155

V. RESUME DES TRAVAUX DE THESE

Le contrôle de l'équilibre prolifération/différenciation des cellules souches/progéniteurs est essentiel au développement et à l'homéostasie du système nerveux. Une dérégulation de cet équilibre provoque des défauts développementaux ou des cancers. Décrypter les mécanismes contrôlant le choix du destin des cellules souches est donc d'une importance majeure en recherche fondamentale et peut ouvrir de nouvelles perspectives pour le diagnostic et l'innovation thérapeutique. Des études montrent que **la durée du cycle cellulaire influence le choix d'un progéniteur de rester en prolifération ou se différencier**. Nous étudions le rôle d'un régulateur du cycle cellulaire, CDC25B, dans ce processus. Nous avons montré que **CDC25B contrôle la durée de la phase G2 des progéniteurs neuraux et influence le choix du destin de ces progéniteurs** dans le système nerveux vertébré.

L'objectif de ma thèse était d'étudier **le rôle de la durée de la phase G2** et d'identifier **les mécanismes moléculaires recrutés en aval de CDC25B, pour le choix du destin des progéniteurs**, dans des modèles *in vivo* (embryon de poulet et souris) et un modèle *ex vivo* (organoïdes cérébraux humains).

Au travers de mes travaux de thèse, j'ai montré que **la durée de la phase G2 d'un progéniteur neural influence le destin des cellules filles après la mitose**. Des données préliminaires, produites sur organoïdes cérébraux humains, suggèrent que **l'importance de la durée de la phase G2 pour la régulation du destin des progéniteurs neuraux est conservée chez l'Humain**.

D'autre part, la réalisation d'un crible par RNA-Seq m'a permis **d'identifier les gènes recrutés en aval de CDC25B** dans le tube neural en développement. Parmi les 233 gènes cibles identifiés, **22 ARNm codant des protéines ribosomiques sont surreprésentés en aval d'une surexpression de CDC25B**. L'analyse par ontologie m'a permis de révéler que **les processus biologiques les plus représentés dans cet ensemble de gènes cibles sont la traduction et la biogenèse des ribosomes**.

Les liens entre **biogenèse des ribosomes/modulation de la machinerie traductionnelle et régulation du destin cellulaire** ont été bien établis dans différents modèles expérimentaux. De plus, des **défauts d'expression de protéines ribosomiques** sont associés à des **microcéphalies** chez l'humain. **J'ai donc posé l'hypothèse que CDC25B pourrait favoriser la différenciation des cellules souches neurales en induisant un réarrangement qualitatif et/ou**

quantitatif des complexes ribosomiques, permettant de synthétiser de nouvelles protéines nécessaires au changement de destin.

Par différentes approches complémentaires (modulation de la durée de la phase G2, perte de fonction de CDC25B), j'ai pu montrer qu'un **changement du destin des progéniteurs neuraux, est concomitant avec une modulation de la biogenèse des ribosomes et de la quantité de ribosomes en cours de traduction.** De plus, la comparaison de tubes neuraux à différents stades de développement, suggère **qu'une augmentation de la quantité de ribosomes en cours de traduction accompagne la maturation et la restriction des progéniteurs neuraux vers un destin neuronal.**

Mes travaux de thèse, ont donc permis d'aller plus loin dans la compréhension de l'importance de la machinerie du cycle cellulaire, dans la régulation du destin des progéniteurs neuraux au cours de la neurogenèse précoce des vertébrés. Ces travaux me permettent de proposer que **CDC25B, en modulant la dynamique du cycle cellulaire et le traductome des progéniteurs neuraux à chaque nouveau cycle, favoriserait la production neuronale en restreignant peu à peu les cellules vers un destin neurogénique.** Pour valider ce modèle, il sera important par la suite de déterminer le lien causal entre modulation de la biogenèse des ribosomes/traduction et destin neuronal.

VI. INTRODUCTION

A. AVANT-PROPOS :

Comment une cellule unique, la cellule œuf (Zygote), est capable à elle seule de donner naissance à un organisme multicellulaire complexe et fonctionnel ? C'est la question à laquelle les biologistes du développement tentent de répondre, en décryptant les mécanismes cellulaires, moléculaires et mécaniques des cellules souches. De nombreux mécanismes sont mis en jeu et régulés à la fois spatialement et temporellement, pour orchestrer tels des architectes, la formation et la mise en place de ces nombreux tissus. L'un de ces mécanismes, est le cycle cellulaire qui à son terme, permet de générer deux cellules filles à partir d'une cellule mère. Cette machinerie, va permettre durant les phases précoces du développement embryonnaire la génération d'un stock de cellules dites totipotentes, capables de donner naissance à tous les tissus embryonnaires et extra-embryonnaires. Mais peu à peu les cellules sont restreintes vers un destin cellulaire spécifique, pour enfin sortir du cycle cellulaire et se différencier. Une modulation de la dynamique du cycle cellulaire accompagne ces différentes étapes de maturation.

Comment une cellule souche en prolifération décide-t-elle de quitter le cycle cellulaire et de donner naissance à une cellule spécialisée ? Cette question, est d'une importance majeure pour comprendre comment est régulée l'homéostasie tissulaire au cours du développement embryonnaire et comment une dérégulation de cet équilibre peut être à l'origine de pathologies développementales ou de cancers après la naissance.

Un excellent paradigme pour étudier cette question est le système nerveux central en développement.

Au cours de ma thèse, j'ai étudié l'importance de la dynamique de la phase G2 dans la régulation de destin cellulaire et identifié les événements moléculaires et les processus biologiques recrutés en aval de la phosphatase CDC25B au cours de la neurogénèse chez les vertébrés. Dans un premier chapitre, je vais aborder la formation du système nerveux central (Tube neural et Cortex) ; dans un second chapitre, je parlerai de l'importance de la machinerie du cycle cellulaire dans la régulation de la neurogénèse ; enfin dans un dernier chapitre j'aborderai l'importance de la biogenèse des ribosomes et de la machinerie traductionnelle

dans la régulation de l'équilibre prolifération/différentiation des cellules souches et parlerai de l'état des connaissances du rôle de cette machinerie au cours de la neurogenèse.

B. **CHAPITRE 1** : FORMATION DU SYSTEME NERVEUX

Le système nerveux est constitué de deux entités, le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP).

Le système nerveux centrale est composé de deux organes : le cerveau et la moelle épinière. Le cerveau permet de contrôler différentes fonctions de l'organisme, tels que la perception de l'environnement, le mouvement, la parole et la mémoire. La moelle épinière quant à elle, est liée au cerveau par le tronc cérébral et entourée des vertèbres qui forment la colonne vertébrale (**Figure 1**). Elle est composée de neurones dont les extensions cytoplasmiques émergent de la moelle pour innervier l'ensemble du corps ; ces réseaux de neurones, permettent de transmettre ou d'émettre différentes informations au cerveau par des voies efférentes ou afférentes. Ces extensions composent le système nerveux périphérique.

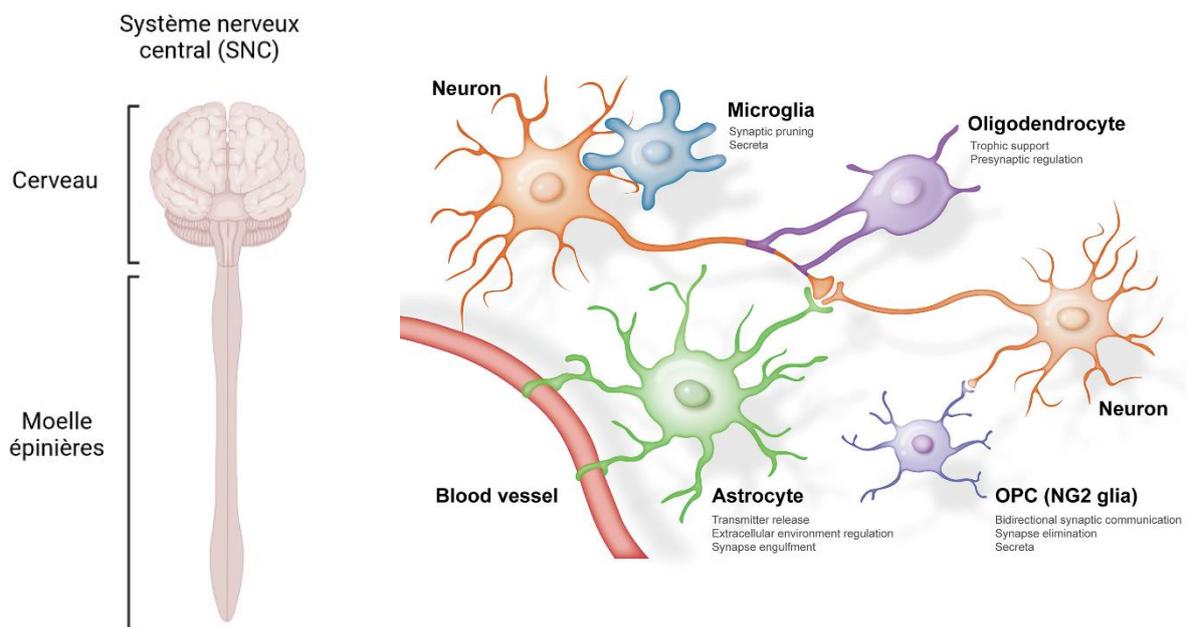


Figure 1. Le système nerveux central :

Le système nerveux central est composé de deux structures : le cerveau et la moelle épinière. Ce système est composé de neurones et de cellules gliales (Astrocytes, oligodendrocytes et microglie) (Liu et al., 2023)

Le système nerveux périphérique est lui-même divisé en deux systèmes, le système nerveux somatique et le système nerveux autonome constitués de neurones composant les voies sensorielles (voies afférentes) et les voies motrices (voies efférentes). Les voies sensorielles afférentes sont composées de neurones somatiques et viscéraux dont les corps cellulaires

sont regroupés au niveau des ganglions rachidiens et paravertébraux. Les voies motrices efférentes quant à elles, sont composées des nerfs crâniens et rachidiens formant les voies motrices somatiques.

Ce système nerveux est composé de neurones et de cellules gliales (**Figure 1**). Les neurones, assurent la transmission et la communication d'informations par influx nerveux (signaux bioélectriques) grâce à leur morphologie particulière. Ces cellules sont en effet composées d'un corps cellulaire, de prolongations cytoplasmiques et de dendrites. Les prolongations cytoplasmiques permettent d'émettre ces signaux et les dendrites constituent la partie réceptrice. Les neurones sont subdivisés en deux groupes : les neurones excitateurs, appelés neurones glutamatergiques et les neurones inhibiteurs appelés neurones GABA(γ -aminobutyric acid)-ergiques .

Les cellules gliales quant à elles, sont composées des astrocytes, des oligodendrocytes et de la microglie (Liu et al., 2023). Ces cellules assurent des fonctions de support du tissu nerveux, en protégeant les neurones, en assurant un apport en nutriment et en oxygène et en participant à la défense immunitaire (Jäkel and Dimou, 2017).

Les neurones et les cellules gliales ont une même origine, les cellules souches neurales, et sont formées respectivement au cours des processus appelés neurogenèse et gliogenèse. Ces processus permettent le développement des systèmes nerveux central et périphérique fonctionnels. Ces deux systèmes ayant également une origine commune, sont formés au cours du développement embryonnaire et à partir d'une seule et même structure, le tube neural. Au cours de ce chapitre, je vais, décrire le système nerveux en développement et les acteurs à l'origine de sa mise en place (Marieb, E. N., & Hoehn, K. Human Anatomy and Physiology 8th ed., 2010. San Francisco: Benjamin Cummings, 32(1114), 28).

1. DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DU SYSTEME NERVEUX

Les vertébrés sont des organismes triploblastiques, c'est-à-dire que l'ensemble des organes sont formés à partir de trois feuillets embryonnaires, l'endoderme retrouvé en profondeur, le mésoderme en partie intermédiaire et l'ectoderme en surface.

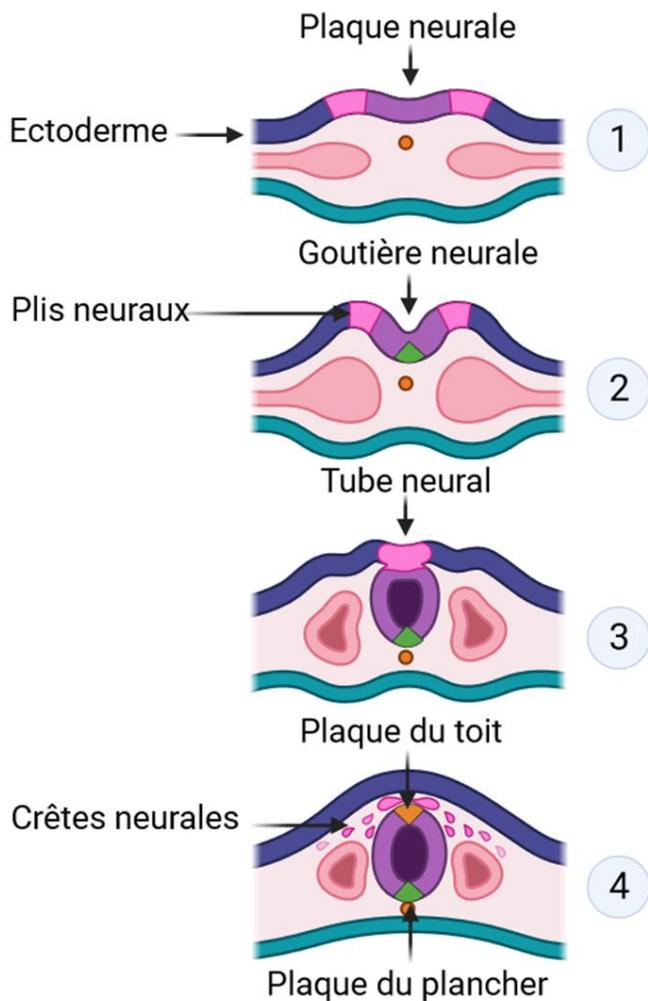


Figure 2. Étapes de la neurulation

moelle épinière (Albert Le Moigne et Jean Foucrier Dunod 2004).

La partie antérieure du tube neurale, va croître pour former les vésicules encéphaliques primitives, constituées du prosencéphale (cerveau antérieur), du mésencéphale (cerveau médian) et du rhombencéphale (cerveau postérieur). Ces structures vont par la suite croître rapidement pour donner naissance aux vésicules encéphaliques secondaires (Figure 3).

Le développement précoce du système nerveux débute lors des étapes de la neurulation (Figure 2). Cette dernière, a lieu après la gastrulation, lors de la transformation de l'ectoderme sus-chordal en tube neural primitif. Cette transformation est contrôlée par l'action du mésoblaste axial, la corde et la plaque préchordale qui expriment les gènes *noggin*, *chordin*, *follistatin* et *cerberus* selon un gradient. Le tube neural en s'épaississant dans la partie médio-dorsale de l'embryon va former la plaque neurale. Cette dernière s'invagine pour former le sillon neural, bordé de part et d'autre par les plis neuraux (Figure 2). L'invagination de la plaque va se poursuivre jusqu'à la fusion des plis neuraux formant ainsi le tube neural. La partie antérieure du tube va être à l'origine de l'encéphale et la partie postérieure de la

Trois vésicules encéphaliques primaires

Cinq vésicules encéphaliques secondaires

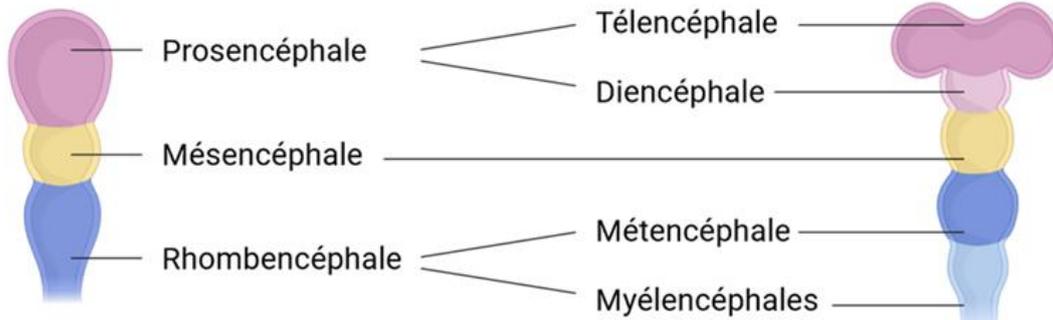


Figure 3 : Émergence des vésicules encéphaliques :

Schéma des vésicules encéphaliques primaires et secondaires, adapté de (Accogli et al., 2020)

Le prosencéphale se divise en deux structures, le télencéphale (tissus à l'origine des hémisphères cérébraux) et le diencéphale (à l'origine du thalamus, l'hypothalamus ; l'épithalamus et la rétine). Le mésencéphale se développe sans se diviser et le rhombencéphale se divise en métencéphale (à l'origine du pont et du cervelet) et en myélocéphales (à l'origine du bulbe rachidien). A l'exception du cervelet, l'ensemble des structures du mésencéphale et du rhombencéphale vont former le tronc cérébral (**Figure 3**) (Marieb, E. N., & Hoehn, K. Human Anatomy and Physiology 8th ed., 2010. *San Francisco: Benjamin Cummings*, 32(1114), 28).

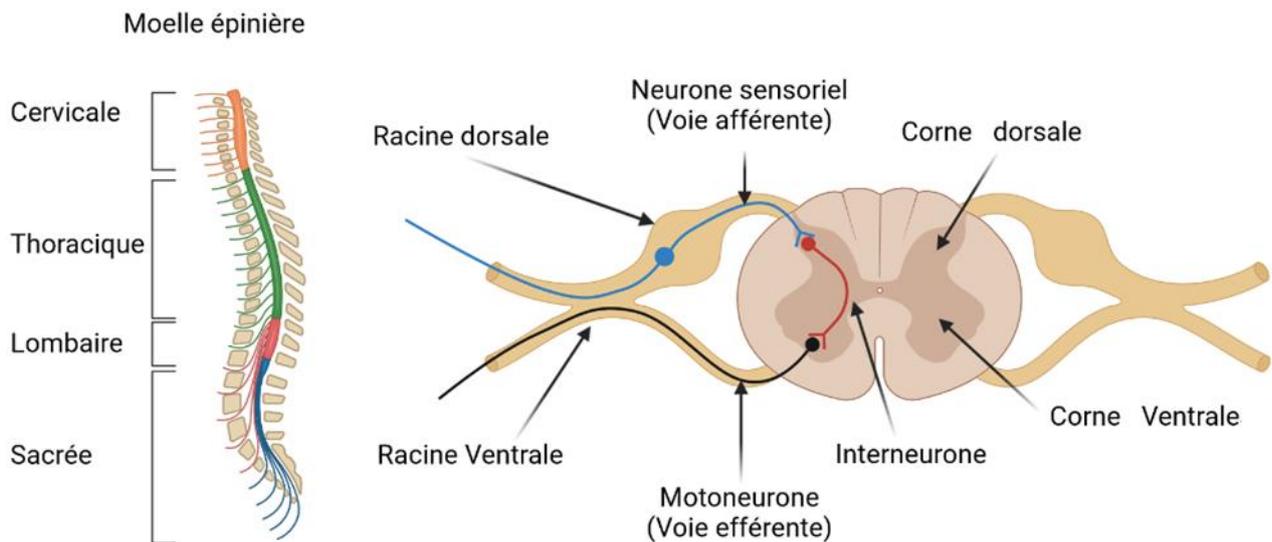


Figure 4 : La moelle épinière :

A gauche régionalisation de la moelle épinière, à droite coupe transversale de moelle épinière et schématisation des voies afférentes (Sensorielles) et efférentes (Motrices)

La moelle épinière quant à elle, est issue de la partie postérieure du tube neural. Chez l'Humain, au cours de la sixième semaine de gestation, deux masses de neuroblastes ayant migré à l'extérieur du tube neural forment la lame dorsale et la lame ventrale. Les neuroblastes issus de la lame dorsale se différencient en interneurones et ceux de la lame ventrale deviennent des motoneurones. Ces lames en se développant vont former le cœur de la substance grise. Les réseaux d'axones issus des interneurones et d'une partie des neurones moteurs quant à eux, vont former la substance blanche externe de la moelle épinière. Les cellules de la crête neurale migrent le long de la partie dorsale de la moelle pour former un réseau de neurones sensitifs à l'origine des ganglions spinaux. La moelle épinière sera divisée en 4 régions distinctes ; cervicale, thoracique, lombaire et sacrée (**Figure 4**) (Marieb, E. N., & Hoehn, K. Human Anatomy and Physiology 8th ed., 2010. San Francisco: Benjamin Cummings, 32(1114), 28).

Ces structures vont au cours du développement embryonnaire se développer pour donner naissance à un système nerveux central et périphérique fonctionnel. L'encéphale va contrôler l'ensemble des fonctions motrices, sensibles et cognitives et la moelle épinière rattachée à l'encéphale au niveau du tronc cérébral va permettre la communication avec le reste du corps, de l'ensemble des informations sensorielles et motrices, à l'aide de signaux efférents et afférents.

Dans les parties suivantes, je vais aborder plus en détail les étapes précoces du développement embryonnaire du système nerveux.

2. LE TUBE NEURAL

Le tube neural est un neuroépithélium pseudostratifié composé de la zone ventriculaire et du manteau qui sont bordés de deux régions sécrétrices, la plaque du toit en dorsal, et la plaque du plancher dans la partie ventrale. La zone ventriculaire est composée de progéniteurs neuraux. Ces progéniteurs neuraux évoluent selon trois phases au cours du temps. D'abord ils prolifèrent, puis s'engagent vers un destin neuronal en passant par une étape intermédiaire de précurseur neuronal, puis se différencient et migrent en périphérie de la zone ventriculaire pour former la zone du manteau (**Figure 5**).

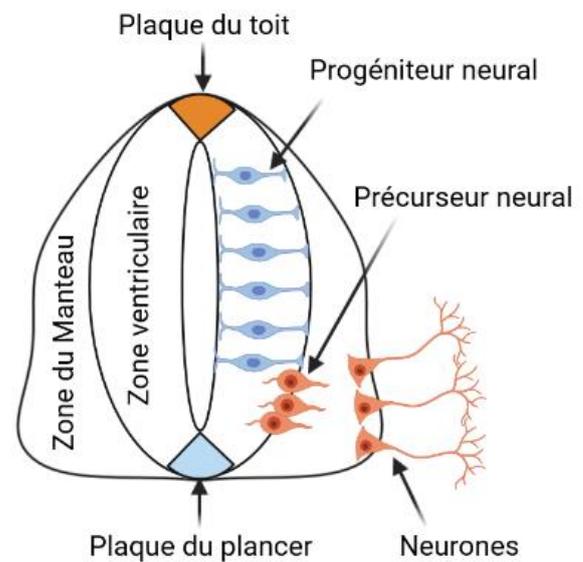


Figure 5. Le tube neural en développement : Schéma du tube neural avec ses structures et la diversité cellulaire qui le compose

a) Polarité apico-basale

Les progéniteurs qui composent la zone ventriculaire sont polarisés le long de l'axe apico-basal (**Figure 6**). Les extensions cytoplasmiques de ces progéniteurs s'étendent le long de l'épaisseur du tube et connectent l'extrémité apicale qui entoure le lumen et la partie basale en contact avec la zone du manteau. Au niveau des pieds apicaux des protéines de la famille des cadhérines et les caténines permettent l'adhésion entre cellules adjacentes (Aaku-Saraste et al., 1996). Ces jonctions permettent le maintien de la polarité apico-basale et de l'architecture de l'épithélium (Götz and Huttner, 2005). Du côté basal, la membrane plasmique est essentiellement constituée de récepteurs des composants de la matrice extra-cellulaire (Götz and Huttner, 2005).

b) Migration interkinétique nucléaire

Les progéniteurs neuraux, fortement prolifératifs, sont caractérisés également pour avoir des noyaux qui migrent le long de l'axe apico-basal. Ce processus, appelé migration interkinétique nucléaire évolue en fonction des phases du cycle cellulaire (Frade, 2002; Miyata et al., 2015). La position du noyau le long de l'axe apico-basal est caractéristique de la phase du cycle cellulaire dans laquelle est le progéniteur neural (**Figure 6**).

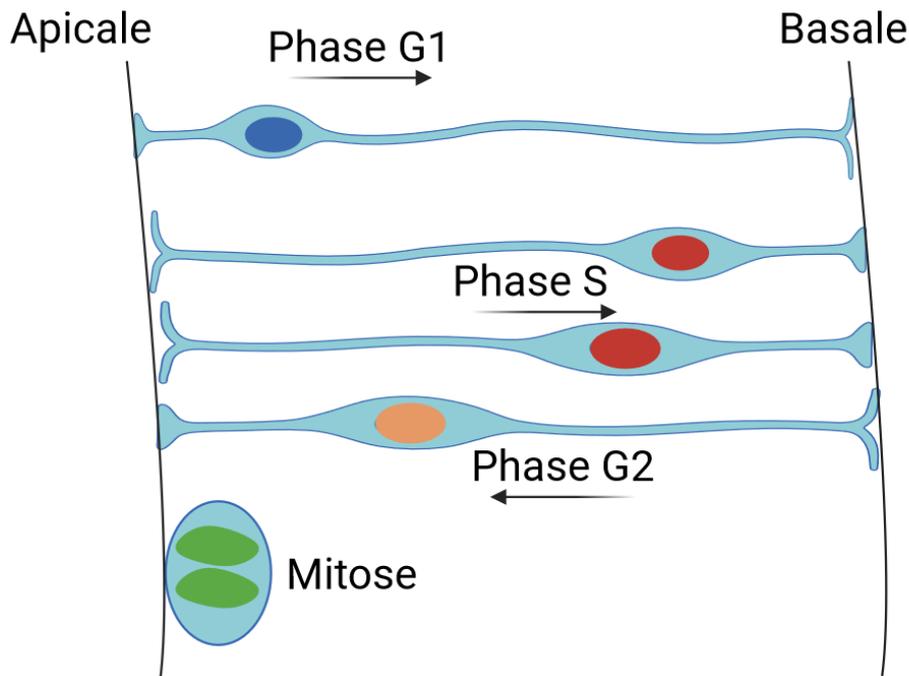


Figure 6. Polarité apico-basale des progéniteurs du tube neural :

Schématisation de la polarité apico-basale des progéniteurs neuraux du tube neural et de la migration interkinétique nucléaire au cours des phases du cycle cellulaire

Le noyau est du côté basal lorsque la cellule est en phase S. En phase G2, il se déplace vers le ventricule, lieu où sera initié la mitose. Après cytokinèse, les cellules ont deux destins, soit elles quittent le cycle cellulaire, soit elles entrent à nouveau dans le cycle. Les cellules entrant dans un nouveau cycle, en phase G1, ont leur noyau qui migre de nouveau vers le côté basal pour initier une nouvelle phase de réplication de l'ADN et préparer la cellule à une prochaine division (Götz and Huttner, 2005). En revanche, les cellules qui sont sorties du cycle, migrent vers le côté basal et perdent leur adhésion à la surface apicale. En perdant cette adhésion, les cellules migrent à l'extérieur de la zone ventriculaire afin de former la zone du manteau. Le corps des neurones va être à l'origine de la substance grise et le prolongement de ces derniers va former la substance blanche.

D'un point de vue fonctionnel, les migrations interkinétiques nucléaires favorisent d'une part, une forte densité cellulaire au sein du neuroépithélium et d'autre part permettent aux progéniteurs neuraux de répondre à des variations de signaux environnementaux tout au long de leur progression dans le cycle cellulaire. Parmi les facteurs extracellulaires connus, on peut mentionner notamment les effecteurs des voies Delta-Notch, Wnt et Shh (Hatakeyama et al., 2014; Miyata et al., 2015). Ces derniers participent activement à la régulation de la progression dans le cycle cellulaire et au maintien de la pluripotence cellulaire ; ces fonctions seront développées plus en détail dans les parties suivantes. De plus, la migration interkinétique nucléaire participe à la différenciation cellulaire, puisqu'une altération de ce processus affecte la neurogenèse (Spear and Erickson, 2012). Ainsi, le processus de migration interkinétique nucléaire et la dynamique du cycle cellulaire sont étroitement corrélés et participent à la régulation du destin des progéniteurs neuraux. Ces liens seront détaillés plus amplement dans la suite de ce chapitre.

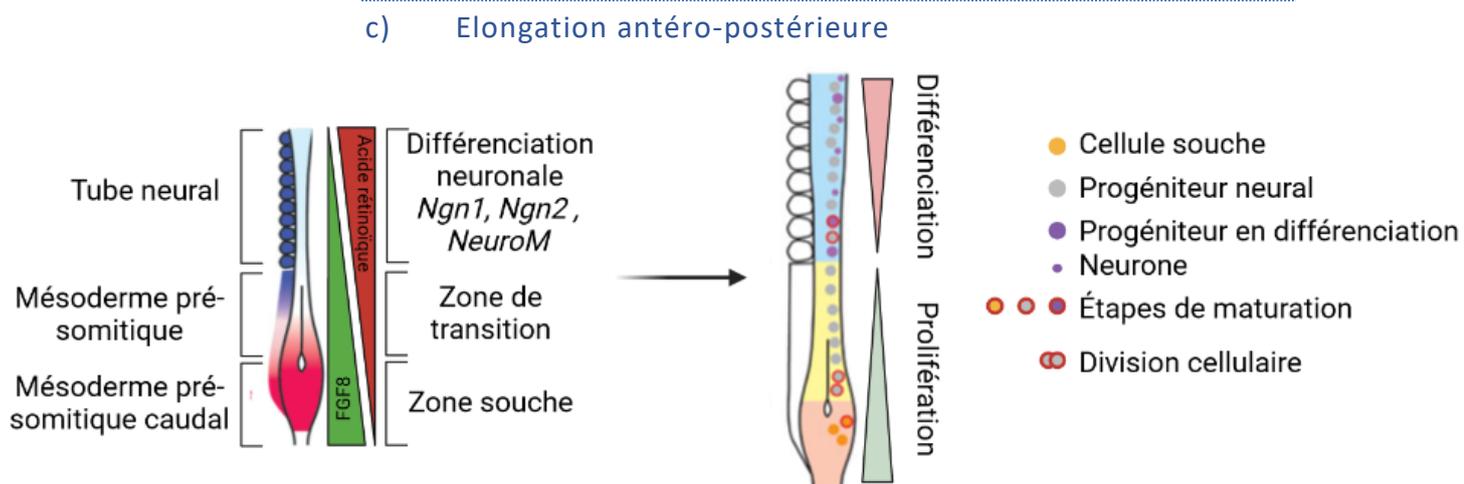


Figure 7. Élongation antéro-postérieure du tube neural :

Schématisme de l'élongation antéro-postérieure du tube neural. Schéma adapté de la publication (Diez del Corral and Storey, 2004)

Le tube neural se développe par élongation de la plaque neurale, progressivement le long de l'axe antéro-postérieur (**Figure 7**). Cette élongation repose sur les cellules souches provenant du mésoderme pré-somitique, elles même issues du mésoderme pré-somitique caudal. Soumises à un fort niveau d'expression de FGF, les cellules dans la région pré-somitique sont maintenues dans un état prolifératif indifférencié (Bertrand et al., 2000; Diez del Corral and Storey, 2004; Novitch et al., 2003). A l'inverse, l'acide rétinoïque produit dans la partie antérieure va permettre d'initier les programmes de spécification et de différenciation. Ces

signaux exercent un antagonisme mutuel sur les cellules souches, ainsi les cellules n'étant plus soumises à la signalisation de FGF (notamment FGF8) vont être exposées à l'AR et perdre leurs caractères souche en n'exprimant plus certains gènes comme *Cash4* et *Sax1* (Diez del Corral and Storey, 2004; Lobjois et al., 2004) pour exprimer des gènes conférant une identité de progéniteur du tube neural comme *Pax6* et *Irx3* (Bel-Vialar et al., 2007; Lobjois et al., 2004).

Ainsi, la répression mutuelle de FGF8 et de l'AR contribue à la coordination des programmes transcriptionnels nécessaires à l'élongation antéro-postérieure et à la maturation du tube neural (**Figure 7**)(Del Corral et al., 2003; Lobjois et al., 2004).

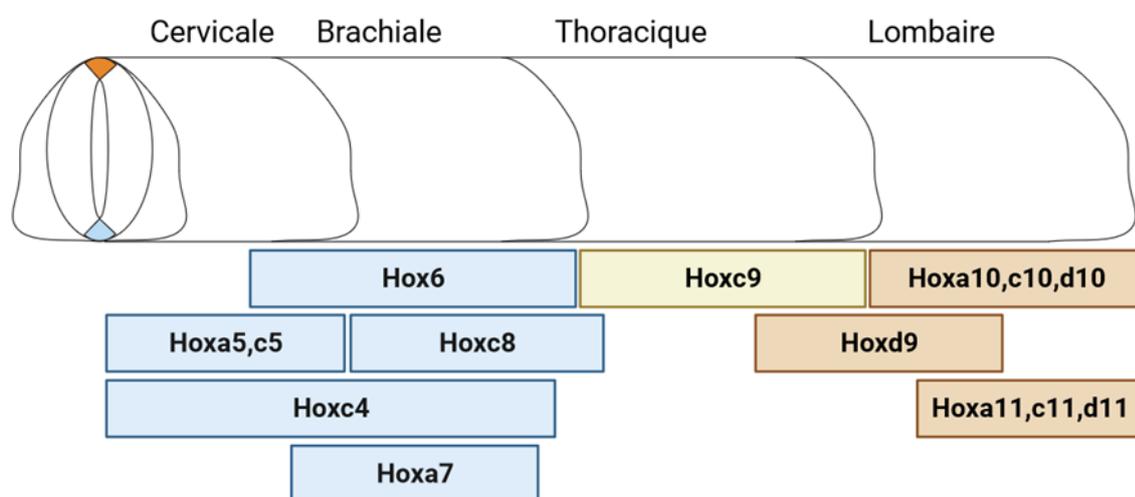


Figure 8. Régionalisation antéro-postérieure du tube neural :

Schématisation de la régionalisation antéro-postérieure du tube neurale médiée par l'expression de gènes Hox. Schéma adapté de la publication (Philippidou and Dasen, 2013)

En parallèle de la modulation des programmes transcriptionnels des progéniteurs neuraux, ces derniers vont développer une identité propre à leur position le long de l'axe antéro-postérieur au cours de l'élongation de la plaque neurale. Les voies Wnt, FGF et AR induisent l'expression de gènes Hox (*Hox5*, *6*, *8*, *9* et *10*), des gènes homéotiques à l'origine de cette identité antéro-postérieure. Ces gènes sont exprimés le long de cet axe de façon régionalisée, mais présentent des domaines d'expression chevauchants, délimitant les différentes régions du tube neural (Brachiale, thoracique et lombaire) (**Figure 8**)(Bel-Vialar et al., 2002; Dasen and Jessell, 2009; Liu et al., 2001; Philippidou and Dasen, 2013). La mise en place de ces domaines est là encore médiée par l'influence de l'antagonisme de FGF et de l'AR et est dépendante de la régulation de l'expression de gènes de la famille des Cdx (Caudal Type Homeo Box Transcription Factor)(Bel-Vialar et al., 2002; Keenan et al., 2006; Shimizu et al., 2006). L'expression de cette famille de gènes dans le tube neural de poulet est dynamique le long de

l'axe antéro-postérieur et au cours de son développement (Bel-Vialar et al., 2002). Leur expression, dépend de la signalisation de FGF et est nécessaire à la transcription des gènes de la famille Hox cités ci-dessus (Bel-Vialar et al., 2002; Diez del Corral and Morales, 2017).

L'organisation antéro-postérieure est également dépendante de la voie Wnt. La combinaison de la signalisation de Wnt et des FGF dans la partie caudale permet l'activation de l'expression de gènes neuraux tels que Sox2 et Sox3 conférant une identité de progéniteurs du tube neural (Diez del Corral and Morales, 2017).

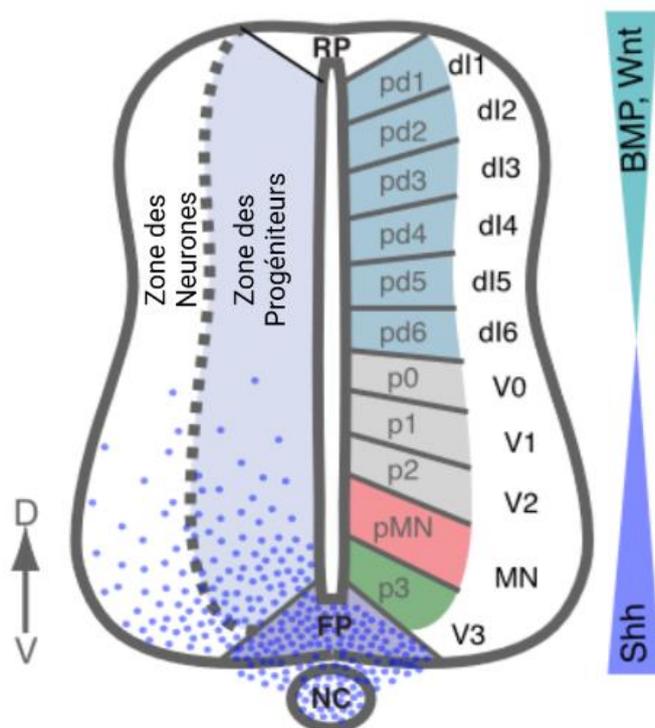


Figure 9. Régionalisation dorso-ventrale du tube neural : Schématisation de la régionalisation dorso-ventrale du tube neural médiée par les voies Shh, BMP et Wnt. Représentation des différents domaines de progéniteurs dorsaux (pD1-pD6) et ventraux (pMN et p0 à p3). Schéma adapté de la publication (Kicheva et al., 2014)

progéniteurs des motoneurons (pMN) et 4 groupes de progéniteurs d'interneurones (pV0 à pV3) (Jessell and Sanes, 2000). Ces domaines de progéniteurs donneront naissance à des neurones spécifiques le long de l'axe dorso-ventral. Dans la partie dorsale, les domaines pD1 à pD6 donnent naissance aux interneurons dl1 à dl6. Dans la partie ventrale, le domaine pMN donne naissance aux motoneurons (MN) et les domaines pV0 à pV3 donnent naissance aux interneurons ventraux V0 à V3 (**Figure 9**) (Liu and Niswander, 2005). Le programme transcriptionnel de chacun de ces groupes est médié par les voies de signalisation : Shh,

d) Régionalisation dorso-ventrale :

Au-delà de son implication dans la régulation de l'élongation de l'axe antéro-postérieur du tube neural, la combinaison de l'expression des acteurs des voies Wnt, AR et Shh va être également à l'origine de la régionalisation dorso-ventrale du tube neural (Nordström et al., 2006).

Cette régionalisation est la résultante d'une expression combinatoire de différents facteurs de transcription.

Dans le tube neural on distingue six groupes de progéniteurs dans la région dorsale (pD1 à pD6) et cinq groupes dans la moitié ventrale comprenant les

produit dans la plaque du plancher, BMP synthétisé par l'épiderme dorsal et la plaque du toit, Wnt, par la plaque du toit et l'AR produit par les somites (Wilson and Maden, 2005).

e) Signalisation Shh et Acide rétinoïque dans la mise en place du domaine ventral :

Shh est un morphogène diffusible et agit de façon dose dépendante sur la spécification des progéniteurs ventraux. La transduction du signal de Shh repose sur les facteurs de transcription de la famille GLI. Ces protéines à doigts de zinc sont au nombre de trois chez les vertébrés (Gli1,2 et 3) et jouent un rôle de coactivateur ou corépresseur transcriptionnel. L'état de coactivateur ou de corépresseur de ces protéines, est déterminé par clivage protéolytique médiée par le protéasome. Gli1 et Gli2, sont principalement des activateurs transcriptionnels, et activent la voie Shh. Gli3 quant à lui est principalement un répresseur transcriptionnel et réprime cette voie (Briscoe and Novitch, 2008; Fuccillo et al., 2006; Ruiz i Altaba et al., 2003). En l'absence de Shh, Gli3 principalement ainsi que Gli2, sont phosphorylés et clivés en forme de répresseurs transcriptionnels, inhibant la transcription des gènes cibles de Shh. En présence de Shh, Gli2 et Gli3 ne sont pas clivés, et jouent un rôle d'activateurs transcriptionnels des gènes cibles de Shh. Gli1 étant une cible directe de cette voie, va permettre par une boucle d'amplification, le maintien de la voie Shh active (Ruiz i Altaba et al., 2003).

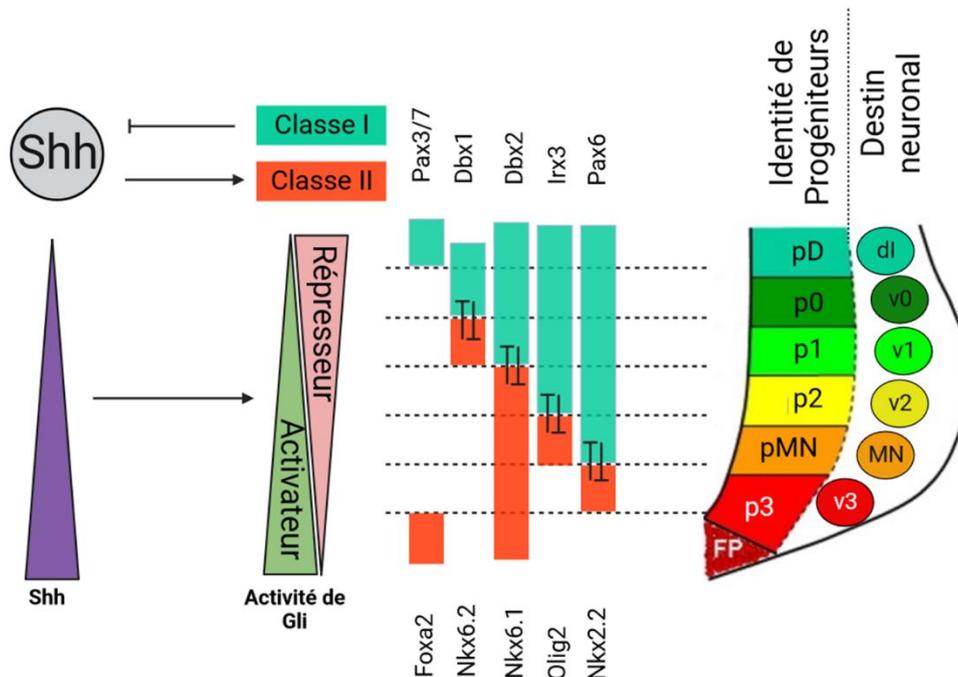


Figure 10. Spécification des domaines de progéniteurs ventraux :

Formation des domaines de progéniteurs ventraux par répression mutuelle des gènes cibles de la voie de Shh, les gènes de classe I et de classe 2. Schéma adapté de la publication (Ulloa and Martí, 2010)

L'identité des cellules du tube neural va être influencée par le gradient d'expression de Shh. A forte dose, Shh induit l'expression des gènes définissant les domaines de progéniteurs les plus ventraux à savoir pV3 et pMN. A faible dose, Shh permet l'expression des gènes définissant les domaines des groupes d'interneurones pV2, pV1 et pV0 (Ericson et al., 1997). La mise en place de ces domaines ventraux est dépendante de l'action de la voie de Shh, puisqu'une déplétion de cette voie empêche la formation de ces différentes familles de progéniteurs (Chiang et al., 1996; Ruiz i Altaba et al., 2003). Par ailleurs, l'action de cette voie dépend de son activité de répresseur de Gli3. Une mutation de Gli3 dans le modèle murin, induit une expansion des domaines de progéniteurs intermédiaires dans la partie dorsale du tube neural (Persson et al., 2002). D'autres expériences, menées sur des souris mutantes pour Shh ou Smoothened (son récepteur) révèlent une absence de motoneurones et d'interneurones ventraux. Ce phénotype est partiellement rétabli lorsque Gli3 est réprimé (Litingtung and Chiang, 2000).

D'un point de vue transcriptionnel, la voie Shh/Gli régule l'expression de la plupart des protéines à homéodomaines (HD) à l'exception de Olig2, un marqueur des progéniteurs du domaine des motoneurones appartenant à la famille des facteurs de transcription à domaine bHLH. Parmi ces protéines on retrouve deux groupes de facteurs de transcription : le groupe de classe I, incluant notamment Pax6, Pax7, Irx3 et Dbx1/2, et le groupe de classe II incluant notamment Nkx2.2 et Nkx6.1 (**Figure 10**) (Ulloa and Martí, 2010). Les facteurs de classe I sont réprimés par la voie Shh/Gli et activés par la voie de l'acide rétinoïque, tandis que ceux de la classe II sont activés par la voie Shh/Gli (Briscoe et al., 2001, 2000; Guillemot, 2007; Jessell and Sanes, 2000). Les gènes des classes I et II vont également être régulés par répression mutuelle (Dessaud et al., 2008). C'est le cas de Pax6 (Classe I) et Nkx2.2 (Classe II) et d'Olig2 et Irx3 (Classe I), dont la répression mutuelle va être responsable de la délimitation des domaines pV3, pV2 et des motoneurones (pMN) (**Figure 10**) (Ericson et al., 1997). Les domaines pV0, pV1 et pV2 sont quant à eux délimités par une répression mutuelle de Nkx6 (Classe II) et de Dbx1/2 (Classe I) (Dessaud et al., 2008).

La voie de l'acide rétinoïque contrôle également l'expression des gènes impliqués dans la formation des domaines ventraux en régulant notamment l'expression de Olig2 (Novitch et 2003). Cette voie va également intervenir plus tard, au cours de la différenciation des

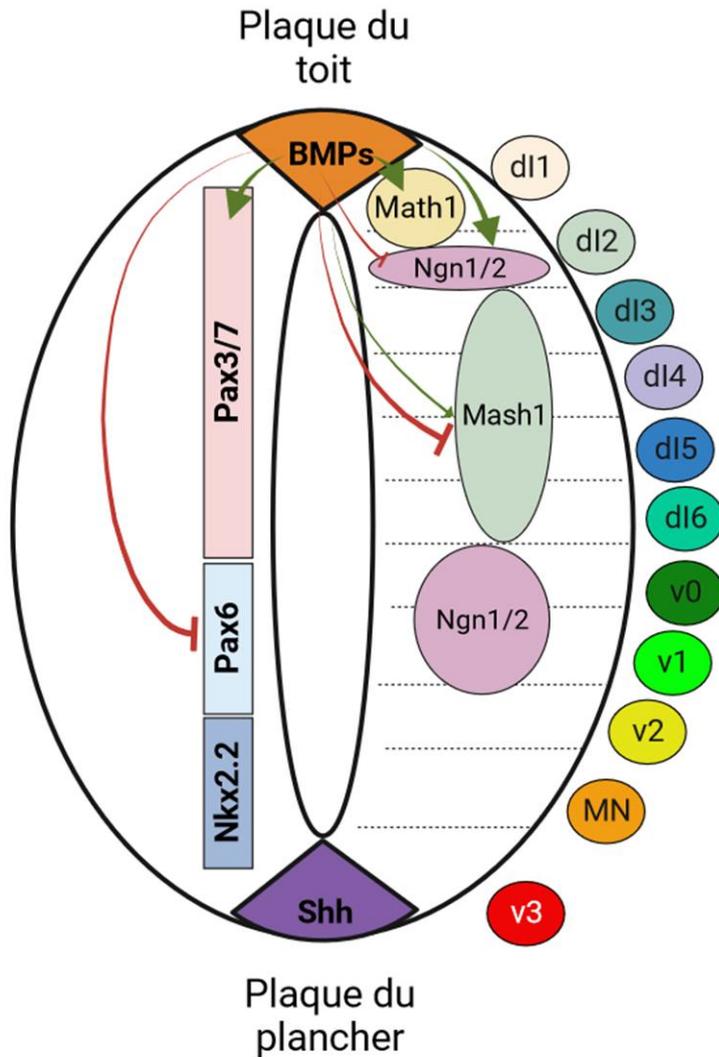


Figure 11. Spécification des domaines de progéniteurs dorsaux :

Formation des domaines de progéniteurs dorsaux par la voie des BMPs. Schéma adapté de la publication : (Liu and Niswander, 2005)

progéniteurs neuraux, en favorisant l'expression de gènes de différenciation des motoneurones tel que hb9, MNR2 et Ilset-1, dont je parlerai plus tard dans ce chapitre (Wilson et al., 2004; Wilson and Maden, 2005).

f) **Signalisation BMP dans la mise en place du domaine dorsal :**

Les protéines de la famille des BMPs quant à elles, participent à la mise en place des domaines dorsaux. Ces protéines, composées de BMP2,4,7 et de GDF7 (Growth differentiation factor), sont sécrétées par l'ectoderme et la plaque du toit (Liu et Niswander 2005). Une ablation chez la souris de ces structures sécrétrices, révèle une absence de dorsalisation du tube neural, confirmant leur rôle essentiel dans la formation des domaines dorsaux (Lee et al., 2000; Millonig et al., 2000). Dans le tube neural de poulet et murin, une activation des récepteurs de BMP (BMPR1A ou BMPR1B) est suffisante pour induire une transformation des cellules des domaines ventraux en modifiant l'expression de gènes et de protéines bHLH spécifiques des interneurons dorsaux (Panchision et al., 2001; Timmer et al., 2002). Comme mentionné ci-dessus, la partie dorsale du tube neural est divisée en 6 domaines dorsaux, ces domaines sont subdivisés en deux classes. La classe A est composée des domaines pD1,2 et 3 et la classe B est composée des domaines pD4, 5 et 6 dont

la formation est respectivement dépendante et indépendante des fonctions sécrétrices de la plaque du toit (Helms and Johnson, 2003).

Comme Shh, les protéines BMP agissent selon un gradient de concentration. De fortes concentrations de BMP induisent l'expression de Math1 à l'origine de la formation du domaine des progéniteurs dorsaux 1 (dP1). Des concentrations plus faibles, vont permettre l'expression de Ngn1/2 à l'origine du domaine dP2 et de Mash1 à l'origine du domaine dP3, dP4, dP5 et dP6. Tout comme dans la partie ventrale, ces différents domaines d'interneurones dorsaux sont régulés par répression mutuelle de ces différents facteurs : Math1 et Ngn1/2 s'inhibant mutuellement et Mash1 inhibant Ngn1/2 (Caspary and Anderson, 2003). D'autres facteurs à homéodomaines tels que Pax3, Pax6, Pax7, Irx3 et Dbx sont également exprimés dorsalement selon le degré d'antagonisme entre BMP et Shh et contribuent à délimiter les différents domaines de progéniteurs dorsaux (**Figure 11**) (Helms et Johnson 2003).

g) Signalisation Wnt :

La voie Wnt, initialement décrite pour jouer un rôle dans la prolifération des progéniteurs du tube neural, en favorisant l'entrée en mitose (Dickinson et al., 1994), a également été décrite pour jouer un rôle dans la spécification cellulaire. Parmi les acteurs de cette voie, on retrouve Wnt1 et Wnt3, dont la sécrétion est médiée par la plaque du toit. Ces acteurs sont connus pour jouer un rôle dans la formation des domaines dorsaux du tube neural (Leung and Shimeld, 2019). Chez la souris, une perte de fonction des gènes *Wnt1* et *Wnt3a*, promeut une perte d'expression de marqueurs des domaines dI1 et dI2 (LH2, Islet1, Math1 et Ngn1) et une augmentation de l'expression de marqueurs du domaine dI3 (Pax2, Lim1/2 et Mash1), ceci sans que l'expression des protéines BMP ne soit affectée, révélant l'importance de la signalisation Wnt dans la formation des domaines les plus dorsaux (Muroyama et al., 2002). Par ailleurs, la voie Wnt participe à la régionalisation dorsale du tube neural en réprimant le programme transcriptionnel spécifique des domaines ventraux médié par Shh, en favorisant notamment l'expression de son inhibiteur Gli3 (Alvarez-Medina et al., 2008).

3. PRODUCTION NEURONALE

a) Divisions neurogéniques :

A l'échelle tissulaire, nous avons vu comment les différentes voies de signalisation citées ci-dessus, participent à la régulation de la mise en place du tube neural et à sa régionalisation. En parallèle, à l'échelle cellulaire, les progéniteurs neuraux composant le tube neural, vont subir différentes étapes de maturation et de différenciation qui vont participer de façon concomitante, à la formation du SNC.

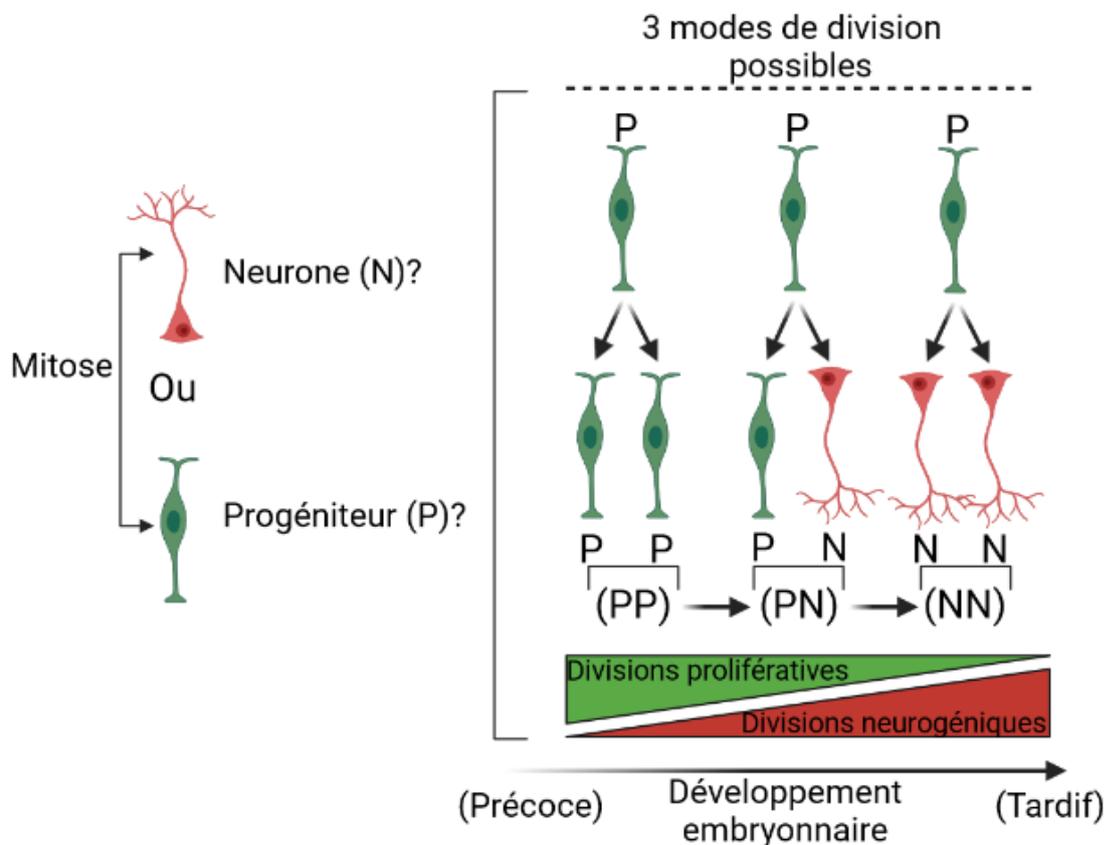


Figure 12. Les progéniteurs neuraux réalisent trois modes de division :

A l'issue de la mitose, un progéniteur neural peut réaliser trois modes de division. Un mode de division prolifératif symétrique (PP), ou asymétrique neurogénique (PN) ou symétrique neurogénique terminal (NN). L'équilibre entre ces trois modes de division est dynamique au cours du développement embryonnaire.

Trois différents modes de division ont été décrits pour avoir lieu à l'issue de la mitose des progéniteurs neuraux lors du développement du système nerveux central (**Figure 12**) (Bonnet et al., 2018; Le Dréau et al., 2014; Saade et al., 2013). Les divisions symétriques prolifératives (PP), donnent naissance à deux cellules filles aux mêmes capacités prolifératives que la cellule mère. Ce mode de division a pour fonction de favoriser l'expansion de la population de progéniteurs neuraux. En deuxième lieu, on retrouve les divisions asymétriques neurogéniques (PN), qui donnent naissance à un progéniteur neural et à un précurseur neural

engagé vers une destinée de neurone (**Figure 12**). Ce mode de division a pour fonction 'assurer l'auto-renouvellement des populations de progéniteurs, mais également de produire les premières cellules au potentiel différenciatif. Enfin, les divisions neurogéniques symétriques terminales, génèrent deux cellules engagées dans la différenciation neuronale et initient une phase de production neuronale (Franco and Müller, 2013; Götz and Huttner, 2005; Lui et al., 2011). Ces trois modes de division, sont régulés à la fois spatialement et temporellement au cours du développement embryonnaire et un équilibre entre ces trois modes de division est essentiel à l'homéostasie tissulaire (**Figure 12**) (Göritz and Frisé, 2012).

(1) DIVISIONS SYMETRIQUES ET ASYMETRIQUES

Depuis quelques années, les mécanismes à l'origine de la régulation de cet équilibre font l'objet de nombreuses études.

Initialement, chez *Drosophila melanogaster*, des études réalisées sur les neuroblastes mettent en avant l'implication de la répartition des centrosomes et l'orientation des fuseaux mitotiques dans l'héritage symétrique ou asymétrique des composants de la cellule mère, aux cellules filles (**Figure 13**) (Gonzalez, 2007; Rebollo et al., 2007; Yu et al., 2006). Des études ultérieures proposent que le mode de division des progéniteurs neuraux pourrait être régulé selon un mécanisme similaire à celui décrit dans les neuroblastes de la drosophile (Das and Storey, 2012; Lesage et al., 2010; Morin et al., 2007; Saadaoui et al., 2017, 2014; Tozer et al., 2017). Bien que cette hypothèse soit répandue, elle reste néanmoins très débattue dans le milieu (Dewey et al., 2015; di Pietro et al., 2016; Paridaen and Huttner, 2014; Peyre and Morin, 2012).

L'orientation des fuseaux mitotiques par rapport à la surface apicale du neuroépithélium serait déterminante pour définir l'axe de la division cellulaire. Une orientation planaire des fuseaux mitotiques (perpendiculaire à la surface apicale) permettrait un héritage symétrique de la signature moléculaire ainsi que des composants membranaires polarisants de la cellule mère. A l'inverse, une orientation oblique des fuseaux mitotiques, provoquerait une répartition asymétrique de ces composants entre les cellules filles (**Figure 13**) (Paridaen and Huttner, 2014).

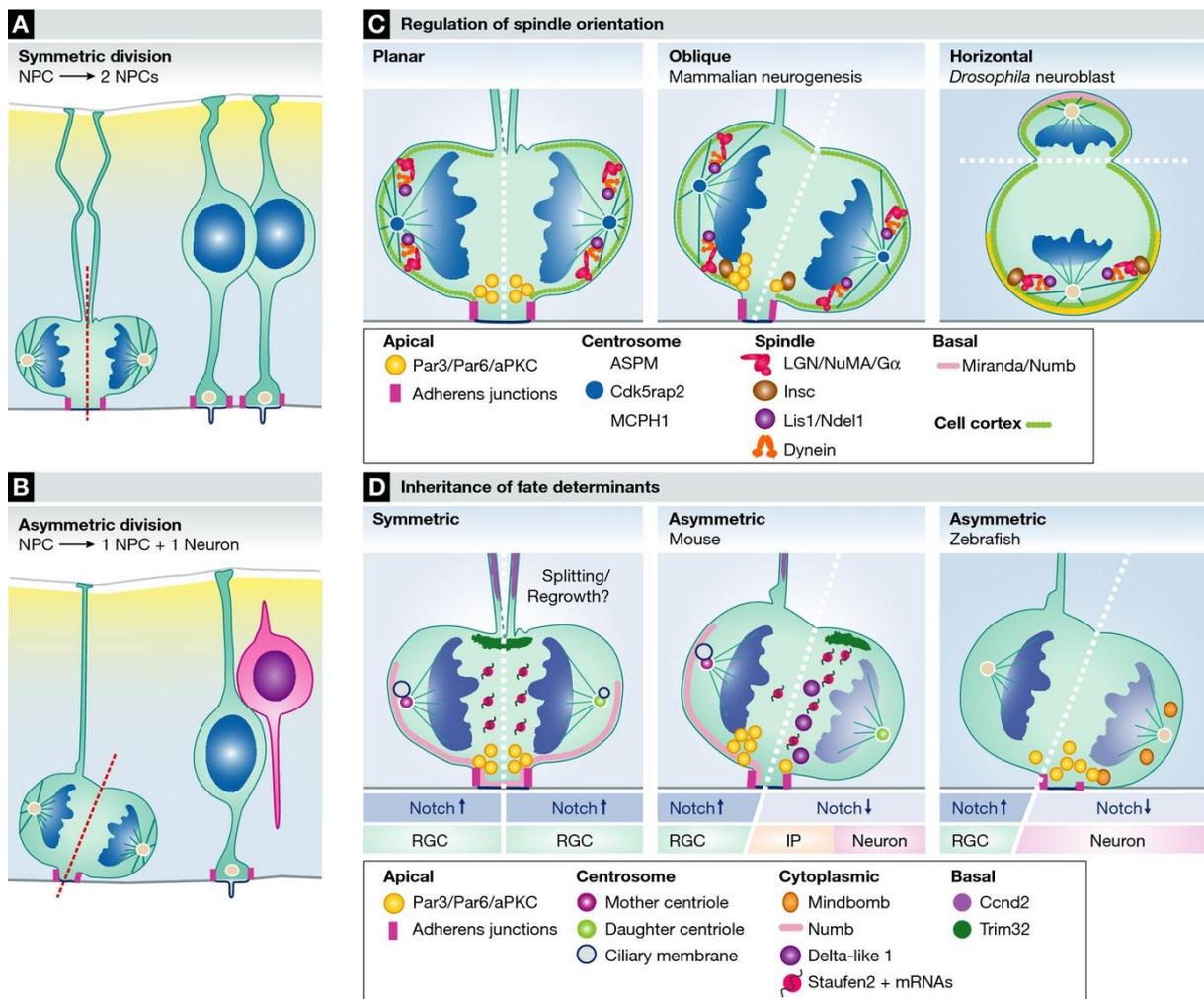


Figure 13. L'orientation des fuseaux mitotiques dans la régulation du destin des progéniteurs :
Rôle de l'orientation des fuseaux mitotiques dans la répartition des composants subcellulaires à l'origine du destin des progéniteurs neurax (Paridaen and Huttner, 2014).

(2) DIVISIONS NEUROGENIQUES DANS LE TUBE NEURAL

Les fuseaux mitotiques sont des structures subcellulaires composées des microtubules formés à partir des centrosomes. Ces fuseaux sont notamment formés et orientés par un complexe nommé LGN composé de LGN/Gai/NuMa (Morin et al., 2007; Saadaoui et al., 2017).

Dans le tube neural en développement de poulet, il a été mis en évidence que la perte de fonction d'un membre du complexe LGN (Gpsm2) induit une randomisation de l'orientation des fuseaux mitotiques et un détachement des progéniteurs neurax de la surface apicale, provoquant leur migration dans la zone du manteau. Mais ces dernières gardent leurs propriétés prolifératives (Morin et al., 2007). Cette étude a permis de mettre en évidence que Gpsm2 est effectivement requise pour orienter les fuseaux mitotiques selon un plan planaire et que cette orientation est essentielle pour le maintien des progéniteurs neurax dans la zone

ventriculaire, mais l'altération de la fonction de Gpsm2 n'a montré aucun effet sur l'équilibre prolifération/différenciation des progéniteurs neuraux (Morin et al., 2007).

Cependant, une étude plus récente met en évidence dans le tube neural du poulet, qu'une dérégulation de l'expression de Inscuteable, une protéine jouant un rôle d'adaptateur liant Par3 au complexe LGN (Izaki et al., 2006), favorise une transition des progéniteurs neuraux, d'un mode de division planaire vers un mode de division oblique. Ce changement de mode de division est concomitant avec une accélération de la neurogenèse (Das and Storey, 2012). Cette étude révèle donc que l'orientation des fuseaux mitotiques influence le destin des progéniteurs neuraux. De façon intéressante, dans cette même étude, il a été mis en évidence que la signalisation de Notch était différenciellement activée dans les cellules filles réalisant des divisions obliques. La cellule fille du côté basal est caractérisée par une forte activité de la voie Notch par rapport à la cellule fille du côté apical, révélant que les divisions asymétriques, remodelent la capacité des cellules filles à répondre à la voie Notch (Das and Storey, 2012).

(3) DIVISIONS NEUROGENIQUES DANS LE CORTEX

De même, au cours du développement cortical murin, l'implication de l'orientation des fuseaux mitotiques dans le destin des progéniteurs neuraux est discutée. Une étude a mis en évidence qu'une perte de fonction de LGN, provoque comme dans le tube le tube neural de poulet (Morin et al., 2007), une randomisation de l'orientation des fuseaux mitotiques, une localisation ectopique des progéniteurs, mais le taux de production neuronale n'est pas affecté (Konno et al., 2008).

Mais plus récemment et dans le même contexte biologique, il a été mis en évidence qu'une taille asymétrique des fuseaux mitotiques entre les pôles est nécessaire pour l'induction de la neurogenèse corticale. En effet, lors de divisions asymétriques, les cellules héritant du fuseau mitotique le plus large deviennent préférentiellement des neurones. D'un point de vue mécanistique, la mise en place de cette asymétrie de taille de fuseau mitotique serait contrôlée par la signalisation Wnt7a et Vangl2 et cette régulation serait médiée par une protéine composant le cortex cellulaire appelée P-ERM (Ezrin, radixin and moesin protein). Une sous-expression des protéines Vangl2 et P-ERM est associée à une diminution de la production de neurones tardifs (Delaunay et al., 2014).

D'un point de vue pathologique, il est connu qu'une dérégulation de gènes impliqués dans l'orientation des fuseaux mitotiques est associée à des défauts neurodéveloppementaux, à l'origine de lissencéphalie ou de microcéphalie (Paridaen and Huttner, 2014). En effet, la plus part des gènes connus pour induire des microcéphalies sont des gènes codant pour des protéines régulant l'orientation des fuseaux mitotiques, on peut mentionner *Aspm*, *CDK5rap2* et *MCPH1* (Paridaen and Huttner, 2014).

b) Régulateurs de la différenciation

Comme nous venons de le voir, même si débattue, l'orientation des fuseaux mitotiques jouerait un rôle dans la régulation de l'équilibre prolifération et différenciation des progéniteurs neuraux. Mais l'identité cellulaire est également régulée par un autre paramètre, la signature transcriptomique. Dans cette partie, nous allons discuter des différents facteurs de transcription, connus pour maintenir l'état de pluripotence des progéniteurs neuraux, ou induire leur différenciation.

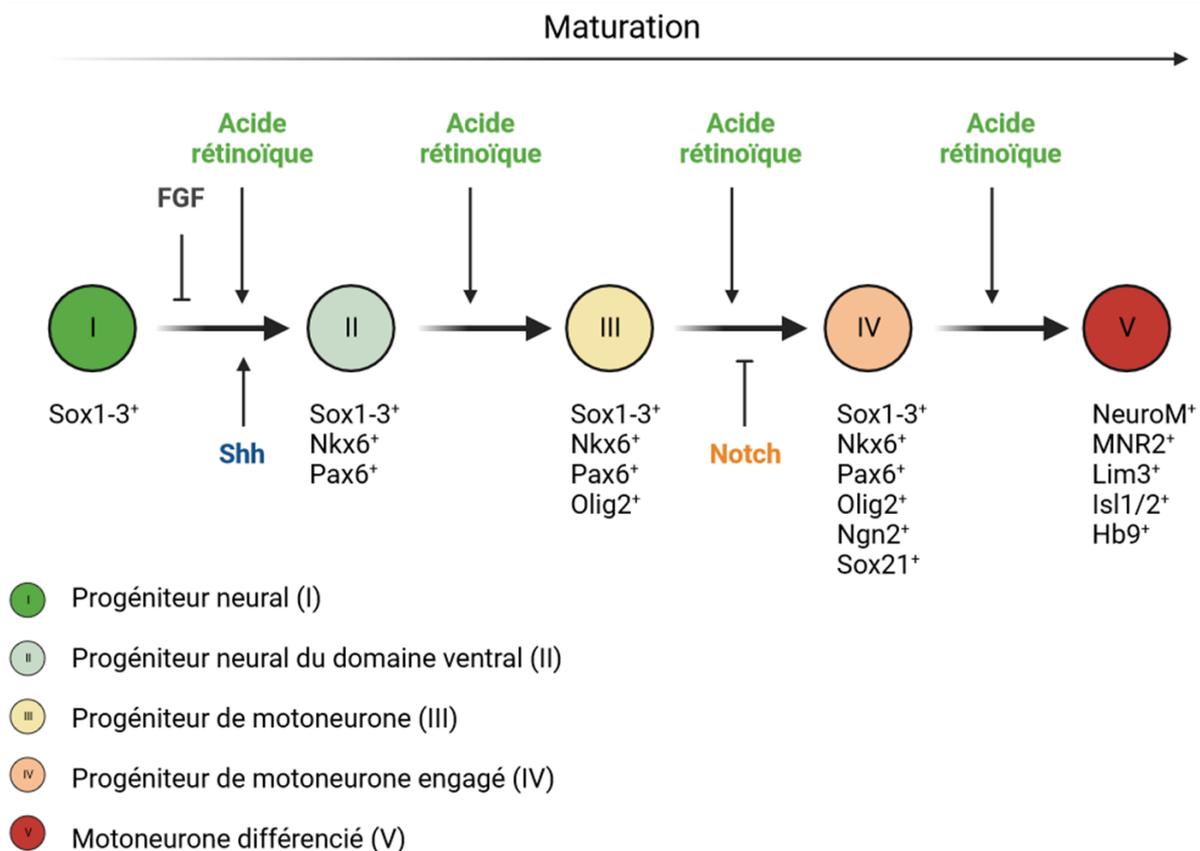


Figure 14. Facteurs de maturation des progéniteurs neuraux :

Remodelage du transcriptome des progéniteurs neuraux ventraux au cours de leur maturation et de leur différenciation. Schéma adapté de la publication (Briscoe and Novitch, 2008)

L'induction neurale est associée à l'expression des facteurs de transcription de la famille des SoxB1, tels que Sox1, Sox2 et Sox3, composés de boîtes SRY (Sry-related box genes) (Pevny and Placzek, 2005). Les gènes de cette famille sont exprimés dans les cellules ectodermiques avant l'induction neurale et continuent d'être exprimés voir surexprimés lorsque les cellules acquièrent une identité de progéniteur neural (**Figure 14**) (Briscoe and Novitch, 2008). Au-delà de leur implication dans l'induction neurale, les gènes de la famille SoxB1 ont également été caractérisés pour jouer un rôle dans la maintenance des cellules dans un état de progéniteurs neuraux mais également dans l'induction de leur différenciation. C'est le cas de Sox1 dont la surexpression dans des cellules souches embryonnaires de carcinome P19 induit leur différenciation neurale (Pevny et al., 1998). Chez le xénope, durant les phases précoces, Sox2 serait requis pour la différenciation de l'ectoderme en tissu neural et dans le maintien de cette identité neurale (Kishi et al., 2000). A l'inverse, dans le tube neural de poulet, il a été montré que l'expression des protéines Sox1-2-3 est requise pour maintenir les cellules dans un état de progéniteurs neuraux indifférenciés en inactivant les fonctions de protéines proneurales de la famille des bHLH. Des études de perte et de gain de fonction, révèlent que cette famille de protéine a des fonctions redondantes et que leur signalisation est à la fois nécessaire et suffisante pour maintenir les cellules dans un état prolifératif et leur inhibition est nécessaire pour favoriser la différenciation des progéniteurs neuraux (Bylund et al., 2003; Graham et al., 2003). Sox21, est également membre de la famille SoxB1, mais à l'inverse des autres membres cités ci-dessus, possède une activité de répresseur transcriptionnel, et favorise la différenciation des progéniteurs neuraux en inhibant la transcription de Sox1-2-3 (Sandberg et al., 2005).

D'autres acteurs, comme Olig2, déjà impliqué dans la formation des domaines de progéniteurs ventraux (vMN), a également été décrite pour jouer un rôle dans la différenciation des progéniteurs neuraux. Dans le tube neural de poulet et chez la souris, il a été mis en évidence que Olig2 favorise l'expression de NeuroG2 (aussi appelé Ngn2), facteur de transcription proneural induisant la sortie du cycle cellulaire des progéniteurs vMN et leur différenciation, mais aussi de Lim3, Islet 1 et Islet 2 impliqués dans la spécification des motoneurones (**Figure 14**). (Mizuguchi et al., 2001; Novitch et al., 2001). De plus, bien que Olig2 soit nécessaire à la régulation de l'expression de ces gènes proneuraux, son extinction est nécessaire à la maturation et à la différenciation des vMN (Lee et al., 2005). En effet, dans les progéniteurs

des motoneurones, Olig2 entre en compétition avec NeuroG2 sur le site de régulation d'une protéine à homéodomaine (HD) appelée Hb9. Olig2 en se fixant sur le promoteur de Hb9 recrute des répresseurs transcriptionnels empêchant son expression. Cette inhibition est transitoire et est levée lorsque le niveau d'expression de NeuroG2 et NeuroM est suffisamment élevé pour se lier à leur tour sur le promoteur de Hb9 et favoriser sa transcription (Lee et al., 2005). Hb9 et Lim3, Islet1, NeuroG2 ou NeuroM vont interagir de façon synergique pour former un complexe d'activation transcriptionnelle et induire l'expression de gènes impliqués dans la différenciation neuronale (**Figure 14**)(Lee and Pfaff, 2003).

La voie Notch quant à elle est connue pour réguler le maintien de la pluripotence cellulaire. Une perte de la signalisation Notch dans différents contextes tel que le tube neural du poisson zèbre ou le cerveau murin, entraîne une expression des protéines proneurales bHLH induisant une différenciation précoce des progéniteurs neuraux (Handler et al., 2000; Hatakeyama et al., 2004; Park and Appel, 2003).

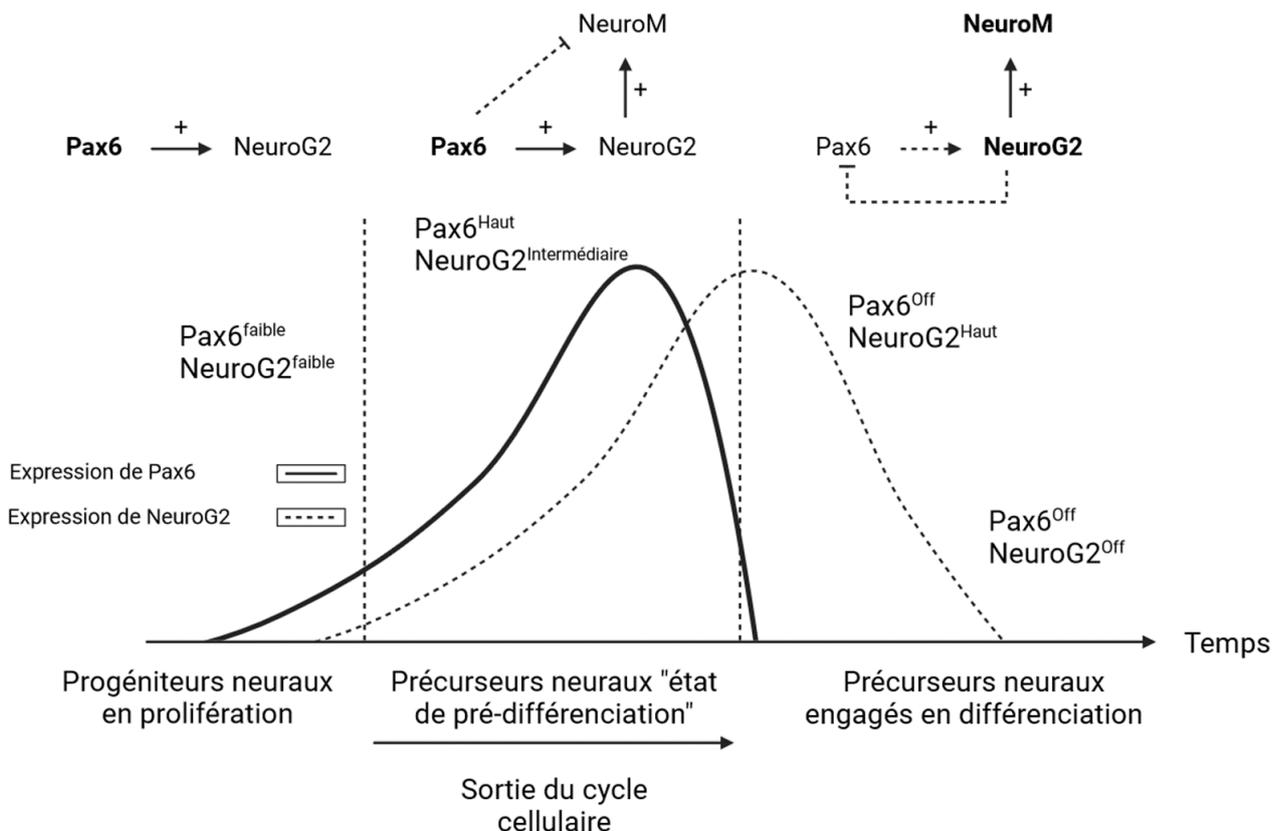


Figure 15. Pax6 et NeuroG2 acteurs de la maturation et de la différenciation des progéniteurs neuraux : Les niveaux d'expression de Pax6 et NeuroG2 participent à la maturation des progéniteurs neuraux vers un état de précurseurs engagés vers la différenciation. La différenciation est engagée par un rétrocontrôle négatif de NeuroG2 sur l'expression de Pax6. Figure reproduite de (Bel-Vialar et al., 2007).

D'autres voies, comme celle de Shh, de l'Acide rétinoïque et de FGF, décrite précédemment pour participer à la régionalisation du tube neural, ont également été décrites pour jouer un rôle dans la régulation de l'expression de NeuroG2 (Ribes et al., 2008). D'une part, FGF régule négativement l'expression de NeuroG2 dans la plaque neurale caudale pour réprimer une différenciation précoce des cellules souches neurales. D'autre part, dans le tube neural, les voies de l'acide rétinoïque et de Shh induisent la transcription de NeuroG2 à l'origine de l'initiation des premières étapes de la neurogenèse (Ribes et al., 2008).

Enfin, Pax6, que l'on retrouve exprimée dans la majorité des progéniteurs en prolifération, mais à faible niveau, est fortement augmentée dans les populations de progéniteurs en cours de différenciation. Cette transition, provoque une augmentation de l'expression de NeuroG2. Néanmoins, l'extinction de Pax6 médiée par un rétrocontrôle négatif de NeuroG2 est nécessaire pour induire la sortie du cycle cellulaire et la différenciation neuronale (**Figure 15**) (Bel-Vialar et al., 2007).

4. DYNAMIQUE DE LA NEUROGENESE DANS LE TUBE NEURAL

Dans la partie précédente, nous avons évoqué une liste non exhaustive d'acteurs impliqués dans le maintien de la pluripotence des progéniteurs neuraux ou dans l'initiation de leur différenciation. Mais au cours du développement du tube neural, la transition d'un état de pluripotence à un état différencié, n'est ni immédiate, ni homogène. En effet, avant de se différencier, les progéniteurs vont subir différentes étapes de maturation qui se reflètent par une modulation de leurs modes de division (Le Dréau et al., 2014; Saade et al., 2013) . Ce processus, est dynamique et est régulé à la fois spatialement et temporellement et sera décrit dans la partie ci-dessous.

La formation du tube neural est progressive le long de l'axe antéro-postérieur. Comme mentionné ci-dessus, la différenciation est initiée dans la partie antérieure du tube neural, par la signalisation de l'AR et progresse en même temps que l'élongation se poursuit (**Figure 7**)(Rhinn and Dollé, 2012). Le long de l'axe dorso-ventral du tube neural, l'initiation de la neurogenèse est également progressive et dynamique au cours du temps (**Figure 16**).

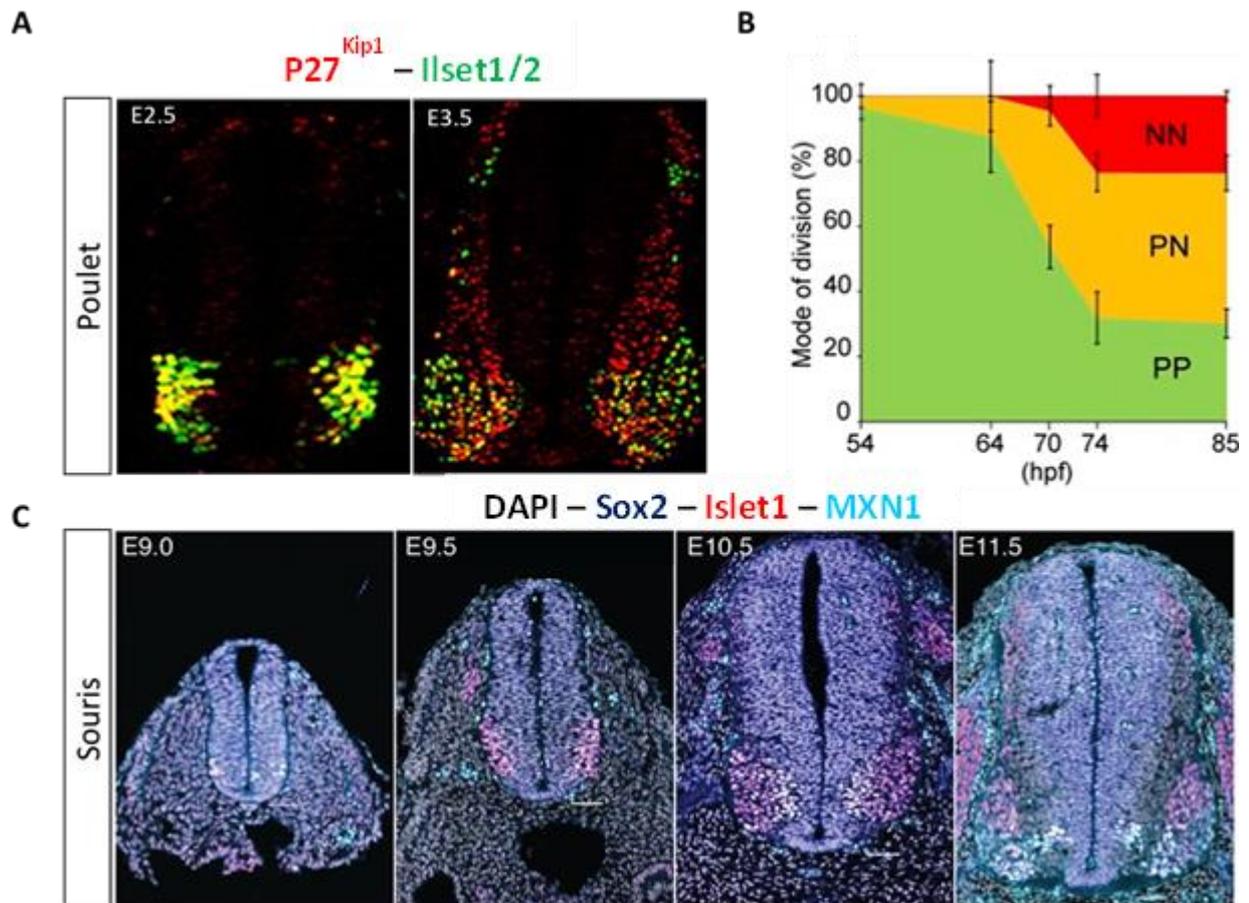


Figure 16. Dynamique de progression de la neurogenèse spinale aviaire et murine :

La neurogenèse est évolutive au cours du temps le long de l'axe dorso-ventral. **(A)** Chez le poulet, la neurogenèse débute en région ventrale à E2.5 ($p27^{kip1}$ marqueur de neurones post-mitotiques) et s'étend en région dorsale à E3.5 (Peco et al., 2012). **(B)** Dans cette même temporalité les progéniteurs neuraux, vont être majoritairement prolifératifs (PP) à E2.5, alors qu'à E3.5, ils mûrissent et réalisent une transition du mode de division PP vers des modes de division neuroniques (PN et NN) (Le Dréau et al., 2014). **(C)** Chez la souris, la dynamique de neurogenèse dorso-ventrale est conservée. Elle débute en ventral à E9.0 (*Isl1* marqueur des motoneurones) et s'étend vers la région dorsale dès E10.5 (Rayon et al., 2020).

Dans l'embryon de poulet, durant les phases précoces du développement du tube neural, la neurogenèse débute dans la partie ventrale. Les progéniteurs neuraux ventraux vont initier leur différenciation pour donner naissance aux premiers neurones dont la majorité sont des motoneurones (Peco et al., 2012) (**Figure 16-A**). Cette dynamique a précisément été décrite dans les travaux de Saade et ses collaborateurs (Saade et al., 2013). Durant les phases précoces du développement du tube neural de poulet, à 48 heures de développement, les progéniteurs ventraux (*Olig2*⁺) sont en pleine expansion et sont majoritaires. A 60 heures, les premiers motoneurones apparaissent, mais les progéniteurs ventraux, sont toujours en expansion et réalisent des divisions asymétriques neurogéniques (PN). Enfin, le pic d'expansion des progéniteurs ventraux est atteint à 72 heures. Dès lors, les progéniteurs

passent d'un mode de division PN à un mode de division neurogénique terminal (NN), le nombre de progéniteurs ventraux diminue alors que celui des motoneurones augmente, jusqu'à atteindre un pic à 130 heures (Saade et al., 2013). La transition d'un mode de division à l'autre dans les domaines ventraux, a directement été corrélée au niveau d'activité de Shh (Saade et al., 2013). En effet, lors des phases d'expansion des progéniteurs ventraux, l'activité de Shh est élevée. Plus tardivement, l'activité de Shh diminue, et les premiers neurones apparaissent. A ce stade, les progéniteurs neuraux réalisent une transition du mode de division PP vers PN. Enfin, lorsque l'activité de Shh est faible, la phase d'expansion des progéniteurs est révolue et le nombre de neurones prend le dessus sur la population de progéniteurs ; ces derniers s'engagent donc vers des divisions NN (Saade et al., 2013). De façon intéressante, dans cette même étude, un raccourcissement de la durée du cycle cellulaire a été décrit pour être concomitant avec la différenciation des motoneurones. Cette étude révèle donc que la dynamique du cycle cellulaire constitue un élément de régulation lors de la maturation et de la différenciation des progéniteurs neuraux. Cet aspect sera développé plus en détail lors du chapitre 2. Certaines populations résiduelles de progéniteurs ventraux continueront d'exprimer Olig2. Ces populations spécifiques donneront naissance aux oligodendrocytes (cellules gliales) durant les phases plus tardives du développement du tube neural (Lu et al., 2000; Zhou et al., 2000). Il est donc important que certaines populations cellulaires restent en état de progéniteur pour induire la gliogenèse, ayant lieu après les premières vagues de neurogenèse (Mizuguchi et al., 2001; Novitch et al., 2001).

Toujours dans l'embryon du poulet, dans la partie dorsale, la neurogenèse est plus tardive qu'en région ventrale puisqu'elle débute entre 72 et 96 heures de développement, pour donner naissance aux premiers interneurones dorsaux (Peco et al., 2012) (**Figure 16-A**).

La différenciation des progéniteurs neuraux est la conséquence directe d'un changement de leur mode de division. La transition d'un mode de division prolifératif à un mode de division différenciatif est progressive au cours du développement du tube neural. Chez le poulet, durant les phases précoces, plus de 90% des progéniteurs réalisent des divisions symétriques prolifératives (PP). Durant les phases plus tardives, ces divisions PP sont remplacées progressivement par des divisions neurogéniques asymétriques (PN) et symétriques (NN) qui deviennent majoritaires. L'engagement des progéniteurs vers un destin neuronal est donc initié (Le Dréau et al., 2014) (**Figure 16-B**). Dans le tube neural murin, la dynamique de

progression de la neurogenèse est comparable à celle décrite dans l'embryon de poulet. A E9,5, la neurogenèse débute dans la partie ventrale du tube neural où les premiers motoneurones sont produits. A E10,5 la neurogenèse s'étend de la partie ventrale vers la partie dorsale, donnant naissance aux premiers interneurones dorsaux (Bonnet et al., 2018; Rayon et al., 2020) (**Figure 16-C**).

5. DEVELOPPEMENT DU CORTEX

a) Origine et régionalisation du cortex :

Le néocortex, issu du pallium dorsal, est la structure la plus représentée et élaborée du cerveau des mammifères. Cette structure est impliquée dans de nombreuses fonctions cognitives complexes qui peuvent être altérées lors de malformations ou de lésions (Medina and Abellán, 2009). Pour la suite de ce chapitre, nous allons caractériser le néocortex et discuter des différentes voies de signalisation et acteurs qui régulent son développement.

b) Le néocortex : diversité cellulaire et régionalisation :

Chez les mammifères le cortex cérébral est constitué d'une structure appelée, le néocortex qui est constitué de six couches parallèles, dont les fonctions et la composition ainsi que la densité cellulaire sont distinctes. D'un point de vue cellulaire, le cortex est composé de près de 16 milliards de neurones qui constituent 80% de la masse du cerveau (Azevedo et al., 2009). L'ensemble de ces neurones ont une même origine : les cellules Neuroépithéliales (NEC) (Agirman et al., 2017; Cadwell et al., 2019).

Durant les phases précoces du développement du cortex, les NECs sont les premiers progéniteurs présents. Tout comme les progéniteurs neuraux du tube neural, ces cellules sont polarisées le long de l'axe apico-basal et forment un tissu pseudostratifié. Les noyaux des NECs migrent également le long de cet axe durant la progression du cycle cellulaire. Durant les premières étapes de la corticogenèse, lors de la pré-neurogenèse, les NECs réalisent exclusivement des divisions prolifératives symétriques pour étendre le pool de progéniteurs corticaux. Plus tard, ces cellules vont réaliser des divisions asymétriques donnant naissance à des cellules de la glie radiaire appelées **RGCs** (aussi appelés **aRG** : apical radial glia). Ces dernières vont former la première couche du cortex, la zone ventriculaire (VZ) (Taverna et al., 2014). Les aRGs sont également polarisés le long de l'axe apico-basal. D'un point de vue temporel, chez les rongeurs comme la souris, la fenêtre temporelle de neurogenèse s'étend

du 10^{ème} (E10,5) au 18^{ème} E(18,5) jour de développement et précède la gliogenèse qui se poursuit après la naissance (Götz and Huttner, 2005).

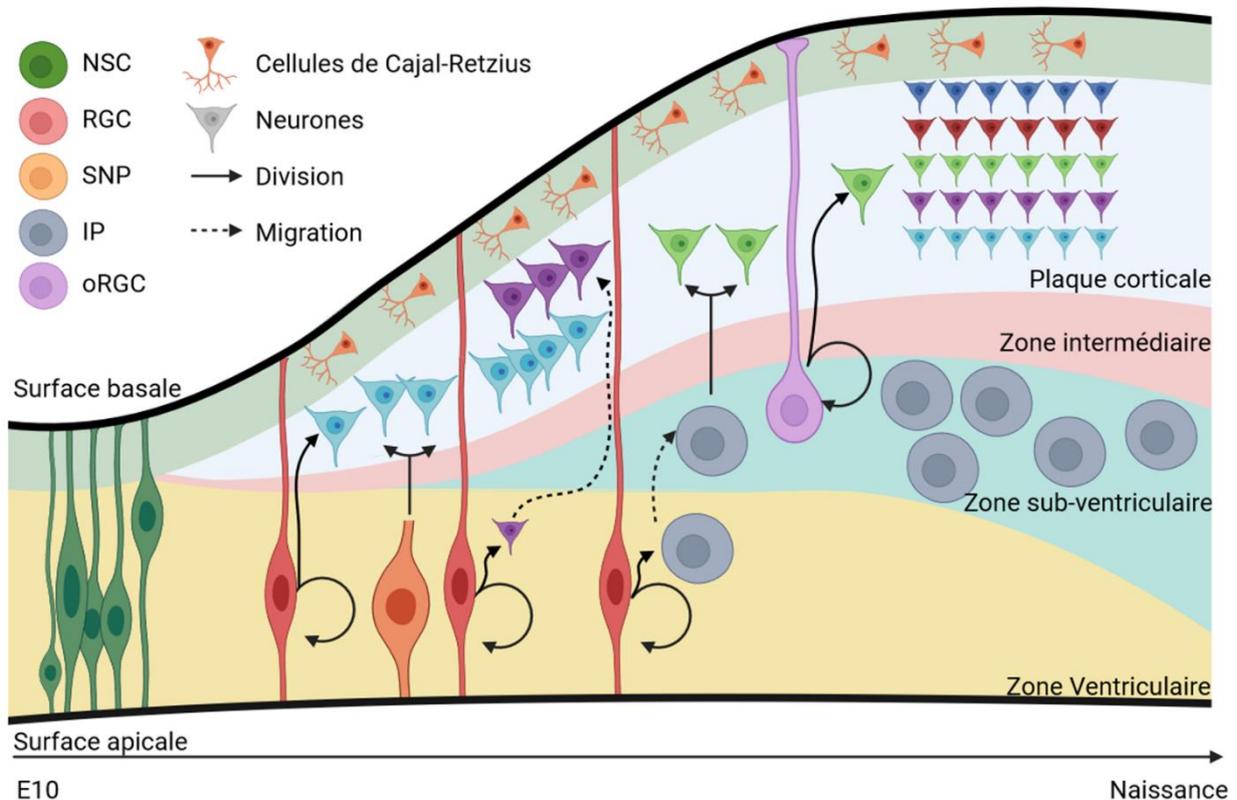


Figure 17. La corticogenèse :

Diversité cellulaire du néocortex en développement, et dynamique de maturation et de différenciation des progéniteurs. Schéma reproduit de (Agirman et al., 2017).

Lors de la neurogenèse précoce, les aRGs sont majoritairement prolifératifs et vont produire par neurogenèse directe les neurones des couches profondes; durant les phases plus tardives, ils vont produire les neurones des couches superficielles (Oberst et al., 2019). Plus tard, les aRGs vont donner naissance à des progéniteurs plus matures, les progéniteurs intermédiaires appelés **IP** (aussi appelés **bIP** : basal intermediate progenitor). Ces progéniteurs perdent leur polarité apicale et bien qu'ayant la capacité de s'auto-renouveler, ils sont majoritairement connus pour être fortement neurogéniques en réalisant principalement des divisions neurogéniques symétriques terminales (neurogenèse indirecte) et participent à la formation de la zone sub-ventriculaire (SVZ)(Paridaen and Huttner, 2014). Durant les phases intermédiaires, les bIPs vont produire les neurones des couches profondes et superficielles. Durant les phases tardives, les bIPs sont restreints uniquement à la production de neurones des couches superficielles (Kowalczyk et al., 2009; Mihalas et al., 2016; Mihalas and Hevner, 2018; Vasistha et al., 2015) (**Figure 17**).

Les neurones produits par neurogenèse directe ou indirecte vont projeter leur cytoplasme jusqu'à la couche la plus basale du cortex, la plaque corticale (CP). Les neurones produits durant les étapes précoces du développement du cortex vont migrer vers la partie basale pour former les couches profondes, alors que les neurones produits plus tardivement vont peupler les couches superficielles du cortex (Cooper, 2008; Englund et al., 2005). D'autres populations mineures de progéniteurs neuraux sont également retrouvées dans le cortex de la souris, notamment les progéniteurs apicaux intermédiaires **aIP** (aussi connus sous le nom de **SNP** ; Short neural precursors), et les cellules de la glie radiaire externe, **oRGC/bRGC** (outer Radial Glia Cells/Basal Radia Glia Cells) (Arai and Taverna, 2017). Les aIPs résident comme les RGC dans la zone ventriculaire, mais ne possèdent pas de polarité basale et sont uniquement neurogéniques en réalisant des divisions neurogéniques terminales. Les bRGs quant à eux, n'ont pas de polarité apicale et sont situés à l'extérieur de la SVZ et sont retrouvés principalement chez les mammifères gyrencéphaliques (Agirman et al., 2017) (**Figure 17**).

Malgré la diversité des progéniteurs corticaux, ces derniers comportent des caractéristiques similaires. Les NEC, aIPs et aRGs sont regroupés sous le terme de progéniteurs apicaux (AP). Les progéniteurs bIPs et les bRGs sont regroupés quant à eux sous le terme de progéniteurs basaux (BP).

c) Morphogènes impliqués dans le développement du cortex

Comme dans le tube neural, le cerveau est soumis à la régulation des différentes voies de signalisation FGF, Wnt, BMP et Shh. Ces différentes voies participent à la spécification cellulaire et à la régionalisation de ce tissu. Les signaux de FGF (notamment FGF8) sont rostraux et sécrétés notamment par les crêtes neurales. La voie Shh quant à elle est une signalisation ventrale, et est sécrétée initialement par la plaque chordale, puis plus tard par le prosencéphale. Dans la région dorso-caudale on retrouve les voies des BMPs et des Wnts sécrétées respectivement par la plaque du toit et l'ourlet cortical (Medina and Abellán, 2009) (**Figure 18**).

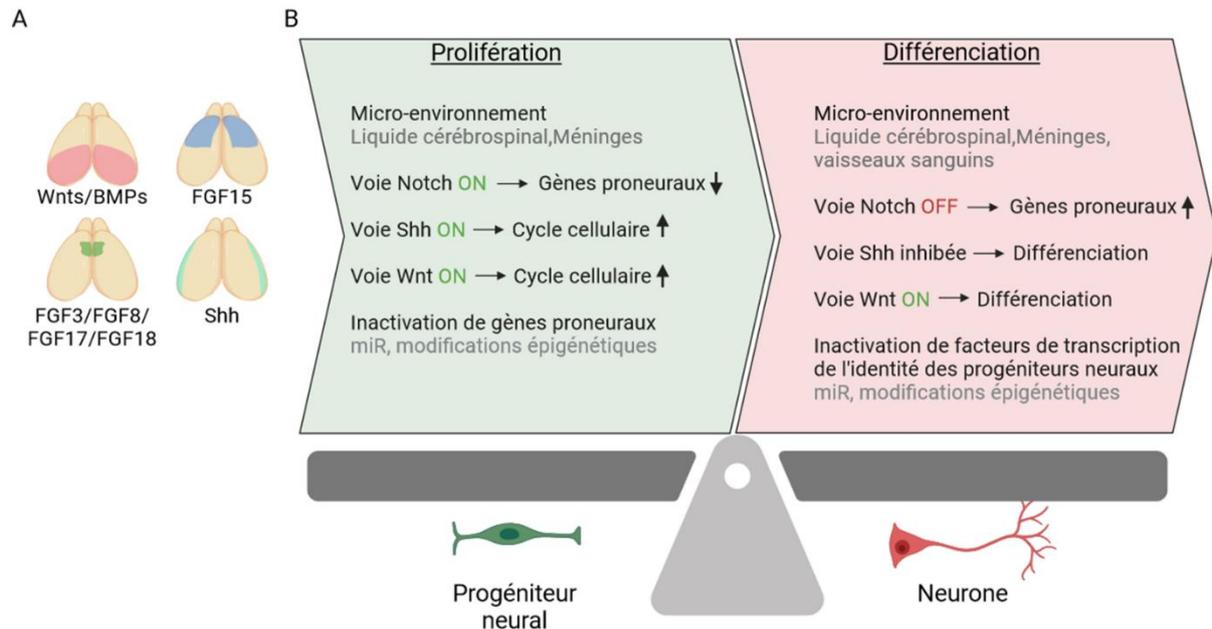


Figure 18. Voies de signalisation impliquées dans le développement cortical :

(A) Régionalisation de l'expression des morphogènes dans le cortex en développement. Schéma adapté de (Agirman et al., 2017). **(B)** Facteurs intracellulaires et extracellulaires modulant l'équilibre prolifération/différenciation des progéniteurs corticaux. Schéma adapté de (Paridaen and Huttner, 2014)

d) Voies de signalisations durant la neurogenèse corticale

(1) ROLE DE LA VOIE SONIC HEDGEHOG

Parmi ces morphogènes on retrouve le ligand Shh, dont la voie a été décrite précédemment et dépend de sa régulation des facteurs Gli. Cette protéine est produite notamment par le télencéphale et est sécrétée dans le liquide cérébrospinal.

Plusieurs études ont mis en évidence dans le tube neural, le cortex en développement, mais également dans le contexte des cellules souches neurales adultes, que la voie Shh est au cœur de la régulation de la prolifération et de la survie des progéniteurs (Komada et al., 2008; Lai et al., 2003; Shikata et al., 2011). Mais des dérégulations de cette voie sont reportées pour être responsables de défaut neurodéveloppementaux associés à l'apparition de microcéphalies ou d'holoprosencéphalies (défaut de séparation des hémisphères) (Dupé et al., 2017).

La voie Shh jouerait donc un rôle central au cours du développement du cerveau. Plus récemment, cette voie a justement été décrite pour jouer un rôle dans la maturation des progéniteurs neurales corticaux. Dans le cortex de la souris, il a été mis en évidence qu'une activation constitutive de la signalisation de Shh provoque une expansion de la population de progéniteurs basaux bRGs et bIPs. A l'inverse une perte de la signalisation de Shh induit une

diminution du nombre de progéniteurs basaux et une diminution de la taille du cortex (Wang et al., 2016; Yabut et al., 2015). D'autre part, il a été montré également qu'une inhibition de la signalisation de Shh réalisée dans des organoïdes cérébraux humains, induit une diminution de la quantité de bRGs (Wang et al., 2016). Ainsi, les fonctions de Shh dans la maturation des progéniteurs neuraux sont également conservées chez l'humain.

(2) ROLE DE LA VOIE WNT

La voie Wnt a également été reportée pour jouer un rôle dans le développement du cerveau en participant aux processus de régionalisation du cortex et de régulation de l'équilibre prolifération et différenciation des progéniteurs corticaux (Backman et al., 2005; Chenn and Walsh, 2002; Hirabayashi et al., 2004; Machon et al., 2007; Wrobel et al., 2007).

Dans le cortex murin, l'activité de Wnt est assez hétérogène à E8,5. Mais à partir de E10,5, l'activité de Wnt est distribuée selon un gradient médio-latéral restreint dorsalement et ce gradient est concomitant avec une initiation de la neurogenèse le long de l'axe antéro-postérieur et médio-latéral (Machon et al., 2007; Takahashi et al., 1999).

Durant les phases précoces de la corticogenèse, Wnt retarderait la transition des aRGs en bIPs en maintenant l'expression du facteur Pax6 (Woodhead et al., 2006; Wrobel et al., 2007). Une étude complémentaire révèle que la voie Wnt maintient les progéniteurs aRGs dans un état prolifératif et qu'une diminution de la stabilisation de la β -caténine est critique pour induire la transition des progéniteurs aRGs vers des progéniteurs plus matures bIPs (Woodhead et al., 2006).

Mais les fonctions de la voie Wnt sont dynamiques au cours de la corticogenèse. Une hyperactivation de cette signalisation dans les progéniteurs aRGs au cours de la neurogenèse précoce et intermédiaire, provoque une expansion de la SVZ induite par une augmentation du pool de bIPs et de la production neuronale (Hirabayashi et al., 2004; Kuwahara et al., 2010; Munji et al., 2011). Cette maturation des progéniteurs corticaux est médiée par la voie Wnt grâce à une régulation positive de l'expression de *N-Myc* et *Ngn1*, deux gènes codant pour des protéines pro-neurogéniques (Munji et al., 2011). A l'inverse, une répression de cette voie au cours de la neurogenèse intermédiaire, altère l'expression de *Pax6*. Cette déplétion est concomitante avec une diminution du pool de progéniteurs aRGs, bIPs et des projections

neuronales, mais provoque une augmentation de l'astrogliogenèse (processus ayant lieu lors de la corticogenèse tardive) (Gan et al., 2014; Munji et al., 2011).

Ces études mettent en évidence que la voie canonique de Wnt est une voie clé du développement corticale mais son action est dynamique au cours de la corticogenèse. Durant les phases précoces, la voie Wnt participe à l'expansion des progéniteurs corticaux. Lors des phases intermédiaires, Wnt va réguler d'une part, la maturation des progéniteurs neuraux en favorisant la transition des aRGs en bIPs, et d'autre part, favoriser leur différenciation en neurones. Enfin, durant les phases tardives, la voie Wnt va induire la gliogenèse en induisant la différenciation des aRGs en oligodendrocytes.

(3) ROLE DE LA VOIE DES BMPS

Les BMPs jouent également un rôle dans la corticogenèse (Le Dréau, 2022). Ces facteurs de croissance se fixent sur leurs récepteurs membranaires et induisent la phosphorylation des effecteurs SMAD1/5, qui s'associent à SMAD4 pour former un complexe qui sera transloqué au noyau pour activer l'expression des gènes cibles de cette voie (Manzari-Tavakoli et al., 2022). Les protéines BMPs composées de BMP-2,4,5,6 et 7 sont sécrétées par l'ourlet cortical et coopèrent avec la voie Wnt en promouvant la régionalisation médio-dorsale du télencéphale (Furuta et al., 1997).

Initialement, BMP-2 et BMP-4 qui sont les principaux effecteurs de la voie des BMPs, ont été déterminés pour favoriser la différenciation des aRGs. En effet, il a été mis en évidence à la fois *in vitro* sur des cultures de cellules neuroépithéliales de cortex et *in vivo* dans le cerveau murin, qu'une augmentation de la signalisation de la voie BMP (par phosphorylation de Smad1-5 et 8) est concomitante avec une augmentation des divisions neurogéniques et promeut donc la différenciation neuronale (Li et al., 1998; Martynoga et al., 2005).

Plus récemment il a été mis en évidence que la perte de la fonction de BMP7 chez la souris est associée au développement de microcéphalies (Segkilia et al., 2012). Une étude plus récente met en évidence que les facteurs de transcriptions canoniques de la voie BMP, SMAD1/5 sont essentiels dans le contrôle de la neurogenèse et la croissance corticale. Chez la souris, une perte de fonction de SMAD1 et de SMAD5 dans les progéniteurs neuraux au cours de phases précoces, induit le développement de microcéphalies. Ce phénotype est causé par une augmentation accrue des neurones corticaux précoces au détriment des neurones tardifs.

Cette altération est causée par une différenciation précoce à l'origine d'une déplétion du pool des progéniteurs aRGs (Najas et al., 2020). De plus, dans cette même étude, des expériences de gain et de perte de fonction, réalisées durant les phases précoces de la corticogenèse chez le poulet (hyperpallium), ont mis en évidence que l'activité SMAD1/5 était essentielle pour maintenir l'auto-renouvellement des aRGs et restreint leur différenciation (Najas et al., 2020). De façon additionnelle, il a été mis en évidence que SMAD1/5 régule l'auto-renouvellement des aRGs en régulant positivement l'expression de YAP et son recrutement (Najas et al., 2020). Cette protéine est un cofacteur transcriptionnel de la voie Hippo, connue pour réguler de nombreux processus, comme la prolifération et pluripotence cellulaire (Yu et al., 2015).

La voie des BMPs constitue donc une voie majeure de la neurogenèse chez les vertébrés et orchestre finement le développement du système nerveux central à la fois spatialement et temporellement (Le Dréau, 2022).

(4) RÔLE DE LA VOIE FGF

La voie des FGFs est également une voie clé de la régulation de la neurogenèse dans le tube neural et le cortex en développement (Manzari-Tavakoli et al., 2022). Les facteurs FGFs en se liant à leurs récepteurs, vont induire l'activation de nombreuses voies de signalisation, comme celle des MAPKs (aussi appelée RAS/ERK1/2/MAP) (Gantner et al., 2021), connue pour réguler de nombreux processus, comme la prolifération, la différenciation, la survie et la mort cellulaires (Liu et al., 2018).

La voie des FGFs a été caractérisée en plus de ses fonctions dans la régionalisation du cortex, pour jouer un rôle dans la différenciation des progéniteurs corticaux. En effet, une déplétion de l'ensemble des récepteurs FGFR dans la région dorsale du télencéphale à E10,5 provoque une différenciation précoce des progéniteurs neuraux et une diminution de la surface corticale (Kang et al., 2009; Rash et al., 2011). Un sauvetage partiel de ce phénotype peut être médié par un gain de fonction de la signalisation de Notch (Rash et al., 2011). Par ailleurs, FGF10 a été décrit pour jouer un rôle dans le maintien de l'auto-renouvellement des aRGs au détriment de leur transition en bIPs (Kang et al., 2009; Sahara and O'Leary, 2009). De même, FGF2 maintient l'état prolifératif des aRGs en réprimant l'expression de p27^{kip1} et en favorisant l'expression de Cycline D2 (Govindan and Jabaudon, 2017).

Plus récemment, il a été mis en évidence *in vitro*, sur des cultures de cellules souches corticales humaines, qu'une activation prolongée de FGF2, permet de maintenir les cellules souches corticales dans un état prolifératif et de leur pluripotence *via* le maintien de l'activité de la voie MAPK. Une inhibition de cette dernière, provoque une initiation de la différenciation et de la production des neurones des couches profondes (Gantner et al., 2021). Dans cette même étude, une initiation de la différenciation est associée à une modulation de la dynamique du cycle cellulaire. Nous évoquerons plus en détail cet aspect au cours du deuxième chapitre.

e) Conclusion chapitre 1 :

Tout au long de ce chapitre, nous avons vu que le système nerveux central est formé au cours du développement embryonnaire sous le contrôle de nombreux facteurs extracellulaires et intracellulaires. De façon intéressante, bon nombre de ces facteurs sont communs au développement du tube neural et au cortex et participent à la génération d'une forte diversité cellulaire. Ces facteurs extracellulaires et intracellulaires orchestrent finement la mise en place des tissus embryonnaires et leur régionalisation par des processus de spécification et de différenciation cellulaires. L'ensemble de ces mécanismes sont régulés à la fois spatialement et temporellement et suivent un schéma ordonné pour former un système nerveux central complexe et fonctionnel. Les cellules souches passent par différentes étapes de maturation. D'abord elles prolifèrent pour participer à l'expansion du pool de progéniteurs, puis peu à peu, elles sortent du cycle cellulaire marquant le début de la différenciation. Cependant, un équilibre étroit entre prolifération et sortie du cycle cellulaire doit être maintenu tout au long du développement embryonnaire.

De nombreuses études se sont penchées sur l'importance de la machinerie du cycle cellulaire dans la régulation de cet équilibre et nous allons justement en discuter au cours du chapitre suivant.

C. **CHAPITRE 2 : CYCLE CELLULAIRE ET NEUROGENESE**1. **LE CYCLE CELLULAIRE ET SES ACTEURS**a) **Le cycle cellulaire**

Le cycle cellulaire, est un processus complexe impliqué dans de nombreux mécanismes physiologiques, telles que la croissance cellulaire, la prolifération, la régénération et la réparation de l'ADN, mais également pathologiques tel que le développement de cancers. Il est composé de 4 phases progressives et cycliques : la phase G₁, la phase S de réplication de l'ADN, puis la phase G₂ et enfin la mitose appelée phase M (Schafer, 1998).

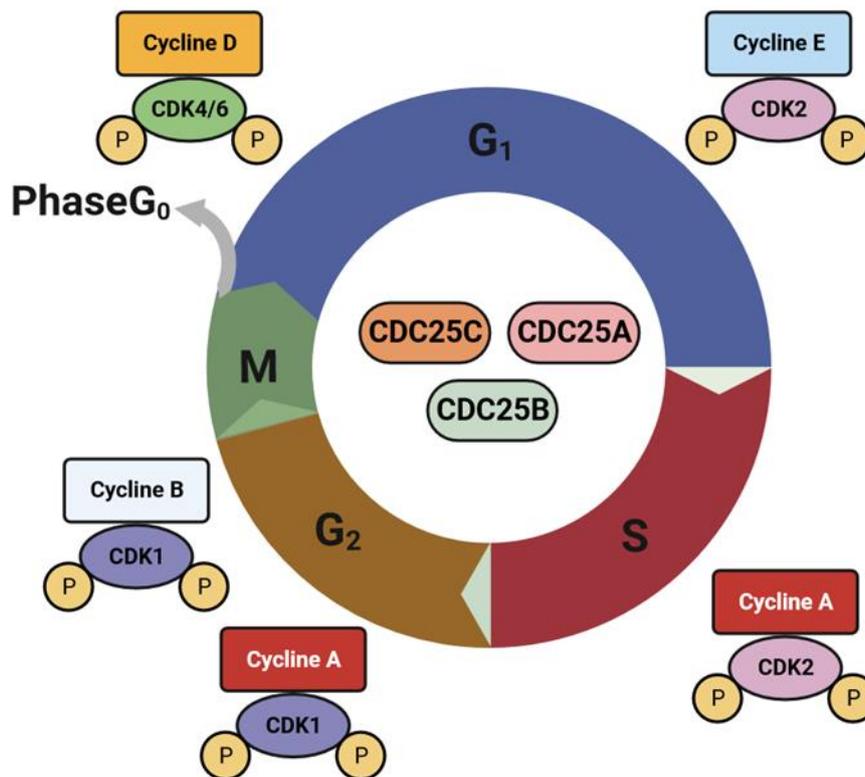


Figure 19. Le cycle cellulaire et ses acteurs

Les phases G₁ et G₂ sont des phases dites « gap ». La phase G₁ est une phase de croissance cellulaire et de préparation à la phase S, phase de synthèse de l'ADN, durant laquelle la cellule duplique son ADN pour le transmettre à ses deux cellules filles. Par la suite débute la phase G₂, seconde phase de « gap », au cours de laquelle la cellule se prépare pour la mitose, durant laquelle la cellule mère se divise en deux cellules filles (**Figure 19**). A la fin de cette mitose, les cellules ont deux destins possibles. Elles peuvent entrer en phase G₀, phase indiquant un arrêt définitif ou ponctuel du cycle cellulaire, ou entrer à nouveau dans le cycle cellulaire (Schafer,

1998). Dans le cas de figure où les cellules sortent du cycle cellulaire, elles peuvent rentrer dans une phase dite de quiescence. C'est le cas des cellules souches adultes comme les cellules souches épithéliales ou les cellules souches hématopoïétiques, qui peuvent entrer à nouveau dans le cycle cellulaire pour renouveler ou régénérer le tissu et participer à la réponse immunitaire ou à l'hématopoïèse (Li and Bhatia, 2011; Sagot and Laporte, 2019). Les cellules peuvent également quitter définitivement le cycle cellulaire pour se différencier (Schafer, 1998).

Au cours du développement embryonnaire et à l'âge adulte, les cellules sont soumises à un équilibre entre prolifération, quiescence et différenciation. Cet équilibre est primordial pour permettre d'une part le développement d'un organisme complexe et fonctionnel au cours du développement embryonnaire et d'autre part, pour jouer un rôle de « maintenance » et de réponse au stress en renouvelant les tissus et en participant notamment à la réponse immunitaire après la naissance.

Pour que cet équilibre soit maintenu tout au long de la vie de l'organisme, une régulation spatio-temporelle de la machinerie du cycle cellulaire est nécessaire.

b) Les acteurs du cycle cellulaire

Cette machinerie est finement régulée par des « points de contrôle », appelés points de restriction ou points de non-retour, permettant à la cellule de s'engager irréversiblement vers la phase suivante du cycle cellulaire (Harashima et al., 2013; Pommier and Kohn, 2003). Cette transition d'une phase à l'autre est orchestrée par les complexes formés des CDKs (Cyclin-Dependant-Kinases), protéines appartenant à la famille des sérines/thréonines kinases et des Cyclines (Vermeulen et al., 2003). Chaque phase du cycle cellulaire est régulée par des protéines CDK spécifiques. CDK4 et CDK6 sont activées au cours de la phase G1, CDK2 est activée lors de la transition G1/S et durant la phase S et CDK1 lors de la phase G2 et la phase M (Vermeulen et al., 2003). Chacune de ces protéines CDK, interagit avec un partenaire de la famille des Cyclines spécifique (**Figure 19**).

Dans le tube neural, les Cyclines D1 et D2 sont régulées transcriptionnellement par les voies FGF et Shh (Lobjois et al., 2004). Cycline D2 est activée par la voie FGF alors que la Cycline D1 est réprimée par la voie FGF et est activée par Shh (Lobjois et al., 2004).

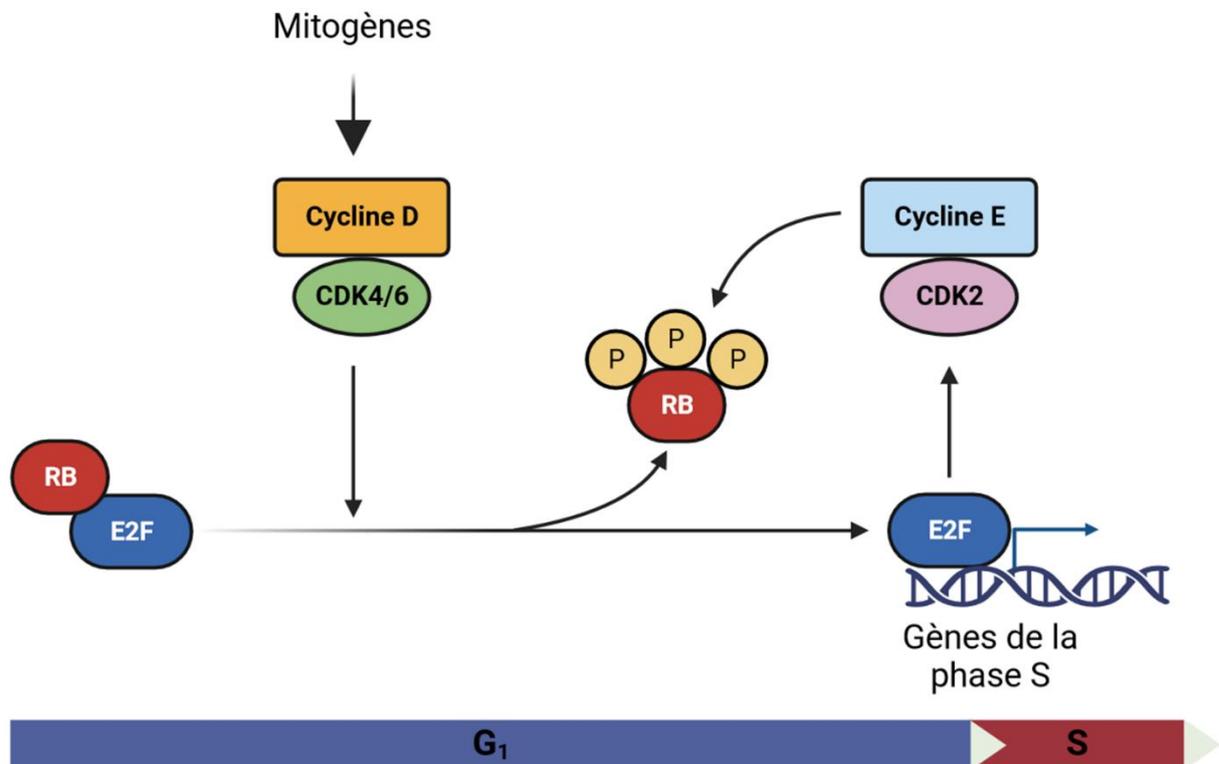


Figure 20. La voie Rb est essentielle à la transition G1/S :

Régulation de la transition G1/S par phosphorylation graduelle de la protéine du rétinoblastome Rb. Schéma adapté de (Ballatori and Hinds, 2016)

Les cyclines de type D, incluant les Cyclines D1, D2 et D3, sont transcrites et stabilisées lors de la phase G1 et interagissent avec CDK4 et CDK6 pour former un complexe actif, favorisant la progression en phase G1 (Ballatori and Hinds, 2016)(**Figure 20**). Ces complexes CyclineD-CDK4/6 vont permettre l'initiation de la phosphorylation partielle d'un membre de la famille des protéines du rétinoblastome, appelées Rb. Cette dernière, interagit avec E2F, un facteur de transcription essentiel à la transition G1/S et inhibe son activité transcriptionnelle. La phosphorylation de Rb, favorise un relargage de la protéine E2F et ainsi une levée de l'inhibition de son activité transcriptionnelle, favorisant la transcription de Cyclines essentielles à la transition G1/S à savoir la Cycline E et la Cycline A. La Cycline E en se liant à CDK2 va permettre de renforcer la phosphorylation de Rb et donc son inhibition (**Figure 20**). La protéine Rb va subir plusieurs étapes de phosphorylations au cours de la phase G1, jusqu'à atteindre un état dit de phosphorylation totale, indiquant le passage du premier point de

restriction. Ce point est irréversible et provoque l'entrée de la cellule vers un nouveau cycle cellulaire. Le complexe Cycline A/CDK2 permet l'accomplissement de la phase S et l'entrée en phase G2. La progression en phase G2 va quant à elle, être régulée par le complexe Cycline A/CDK1 et la progression vers la mitose requiert l'action du complexe Cycline B/CDK1 (Sherr et al., 2016; Vermeulen et al., 2003) (**Figure 20**).

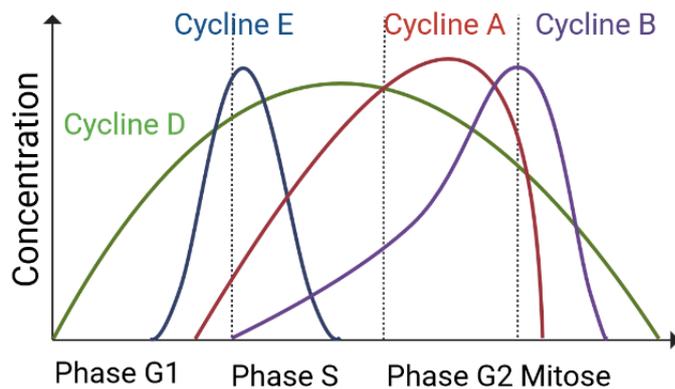


Figure 21. Expression oscillatoire des Cyclines tout au long du cycle cellulaire

Les protéines de la famille des Cyclines, contrairement aux CDK dont l'expression est ubiquitaire tout au long du cycle cellulaire, sont instables (Boutros et al., 2007; Murray, 2004; Sur and Agrawal, 2016) (**Figure 21**). Elles sont dégradées par protéolyse ou stabilisées de façon cyclique lors de chaque phase du cycle cellulaire. La

Cycline E par exemple est stabilisée lors des étapes tardives de la phase G1 pour atteindre un pic lors de la transition G1/S et est totalement dégradée lors de la phase S. La cycline A quant à elle, est stabilisée au cours des phases S et G2 et est dégradée lors de la mitose. Enfin, la cycline B atteint son pic d'expression lors de la transition G2/M et est dégradée par protéolyse lors de la mitose (Boutros et al., 2007) (**Figure 21**).

L'activité des protéines CDK peut être régulée par des CKI (CDK inhibitors), qui en se liant aux protéines CDK ou aux complexe CDK/Cyclines, inhibent leur activité. Deux familles de CKI sont connues, la famille des INK4 (CDKN2) et la famille des Cip/Kip (CDKN1A) (Sherr and Roberts, 1995) (**Figure 22**).

La famille des INK4 comprends 4 membres (INK4a, INK4b, INK4c, INK4d) qui inactivent spécifiquement les CDK4/6 impliqués dans la régulation de la phase G1 en entrant en compétition avec les cyclines D (Carnero and Hannon, 1998). Les Cip/Kip sont composées de 3 membres, p21^{Cip1}, p27^{Kip1} et p57^{Kip2} qui inactivent les complexes Cyclines E/CDK2, Cycline A/CDK2 et Cycline B/CDK1, intervenant respectivement en G1 tardive, lors de la phase S et lors de la transition G2/M (Hengst and Reed, 1998) (**Figure 22**).

Par ailleurs, les CDKs sont également régulées par phosphorylation/déphosphorylation (Harashima et al., 2013). Cette régulation a lieu sur des sites thréonines et tyrosines hautement conservés au cours de l'évolution (Boutros et al., 2007; Sur and Agrawal, 2016).

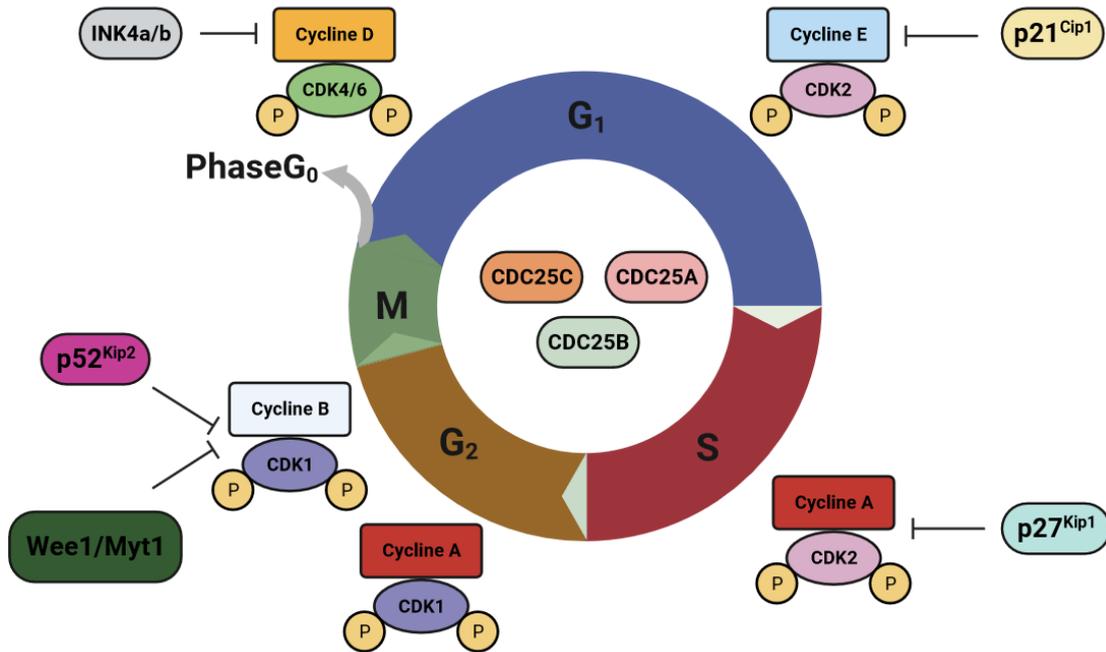


Figure 22. Les CKI et les phosphatases CDC25 régulateurs de la progression dans le cycle cellulaire : Les CKIs sont des régulateurs négatifs des complexes Cycline/CDK. Les membres de la famille des CDC25 sont des régulateurs positifs des complexes Cycline/CDK.

Les protéines Wee1 et Myt1 appartenant à la famille des Ser/Thr kinases font partie des protéines inhibant les CDKs en phosphorylant les résidus Thréonine 14 (T14) et Tyrosine 15 (Y15) conservés de CDK1 (Adhikari et al., 2016; Boutros et al., 2007) (Figure 23).

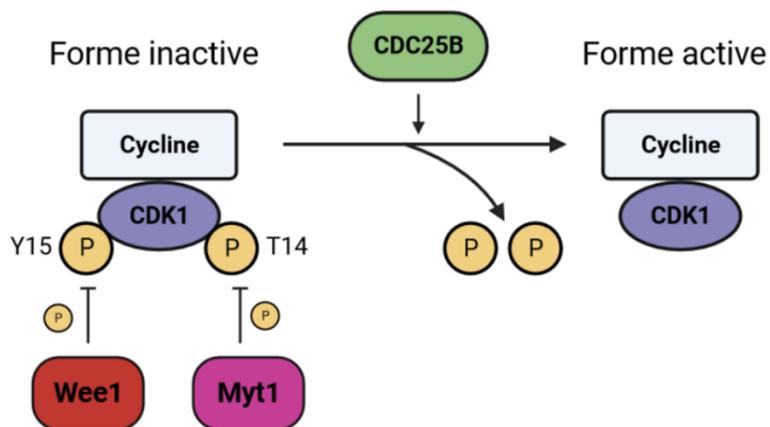


Figure 23. Wee1/Myt1 régulateurs négatifs de CDK1 : Boucle de rétrocontrôle de Wee1/Myt1 et CDC25B sur l'activité de CDK1.

Les protéines phosphatases CDC25 (Cell Division Cycle) jouent quand elles un rôle d'activateurs des protéines CDK en déphosphorylant ces dernières. Il existe 3 membres de

cette famille chez les mammifères ; CDC25A, CDC25B et CDC25C. CDC25A est principalement impliqué dans la transition G1/S, CDC25A, CDC25B et CDC25C sont impliqués dans la transition G2/M (**Figure 22**).

Lors de la phase G2, le complexe Cycline B/CDK1 est déphosphorylé par CDC25B pour favoriser la progression en phase G2 (Cazales et al., 2005; Theis-Febvre et al., 2003). CDC25B et CDC25C sont à leur tour activés par phosphorylation par le complexe Cycline B/CDK1 à l'origine d'une boucle de rétrocontrôle positif favorisant le passage en mitose (Gabrielli et al., 1996; Lammer et al., 1998). Polo-Like kinase 1 (PLK1) phosphoryle et active CDC25C permettant ainsi l'amplification de la boucle de rétrocontrôle favorisant l'activation de Cycline B/CDK1 (Barr et al., 2004). Un mécanisme similaire est décrit pour CDC25A dont l'activation est médiée par le complexe Cycline E/CDK2 lors de la transition G1/S (Hoffmann et al., 1994). La régulation de l'activité de CDC25B sera décrite plus en détail dans la suite de ce chapitre (**Figure 22**).

Ces acteurs du cycle cellulaire sont régulés de façon spatiotemporelle et se coordonnent pour assurer la dynamique et la progression de chaque phase du cycle. A l'issue de chaque cycle, à la fin de la mitose, les cellules filles sont confrontées à différents destins. Elles ont la possibilité de rester en état prolifératif, en entrant à nouveau dans le cycle cellulaire, d'entrer en quiescence ou de se différencier. Mais ces trois destins ne sont pas tous possibles et dépendent du contexte cellulaire. Au cours du développement embryonnaire notamment, les cellules souches passent par différentes étapes de maturation qui restreignent peu à peu les cellules vers un destin spécifique. Lors des phases précoces du développement embryonnaire, les cellules sont fortement prolifératives et réalisent principalement des divisions prolifératives symétriques. Lors des phases intermédiaires, les cellules réalisent des divisions asymétriques permettant l'auto-renouvellement et l'apparition des premières cellules différenciées. Lors des phases tardives en revanche, les cellules sortent du cycle cellulaire et initient leur différenciation terminale. Cette dynamique de l'équilibre entre la prolifération et la différenciation est régulée par de nombreux processus intracellulaires et extracellulaires comme mentionné dans le chapitre 1, mais depuis de nombreuses années, la machinerie du cycle cellulaire a également été décrite pour être un acteur majeur dans la régulation de cet équilibre.

2. DYNAMIQUE ET ACTEURS DU CYCLE CELLULAIRE ET L'ÉQUILIBRE PROLIFÉRATION ET DIFFÉRENCIATION

Au cours du développement embryonnaire, la régulation de la dynamique du cycle cellulaire et de ses acteurs se révèle cruciale pour aboutir au développement d'un organisme complexe et fonctionnel. Ainsi la prolifération et la différenciation cellulaire sont deux processus étroitement liés à la coordination et à la régulation d'acteurs du cycle cellulaire. C'est le cas notamment des protéines de la famille des cyclines et des CDKs, individuellement ou en complexe et de leurs antagonistes les CKIs (Lim and Kaldis, 2012).

a) Les Cyclines/CDK, acteurs du cycle cellulaire et régulation de la maintenance de la pluripotence et de la différenciation cellulaire

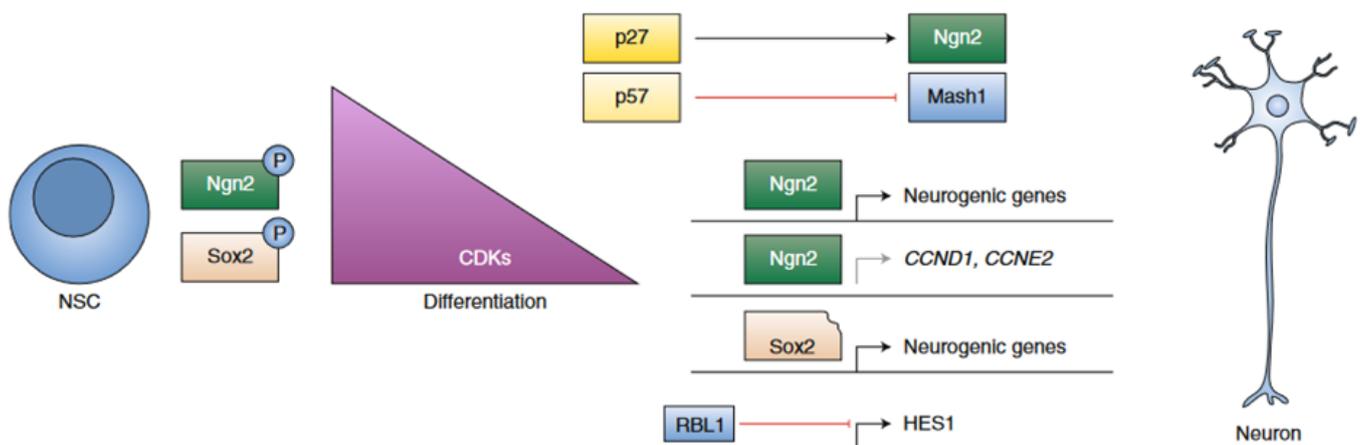


Figure 24. l'activité des CDKs au cœur de la régulation de l'équilibre prolifération/différenciation :

La diminution de l'activité des CDKs lors de divisions neurogéniques, permet par l'intermédiaire de NeuroG2 et d'une forme tronquée de Sox2, de favoriser la transcription de gènes proneuraux et d'inhiber l'expression de gènes pro-prolifératifs et impliqués dans le cycle cellulaires (Liu et al., 2019).

(1) CYCLINES/CDK REGULATEURS DU DESTIN CELLULAIRE

La modulation de l'expression de certains membres de la famille des CDKs et des Cyclines est associée à un changement de l'équilibre prolifération/différenciation.

En effet, la perte de fonction de CDK1, CDK2 et des Cyclines E et B1 est associée à une induction de la différenciation précoce (Coronado et al., 2013; Neganova et al., 2009; Wang et al., 2017). Dans le contexte des cellules souches embryonnaires (ESC), la surexpression de Cycline E, provoque la maintenance de leur pluripotence et inhibe leur différenciation. La maintenance de cet état de pluripotence est corrélée à une diminution de la durée de la phase G1. A l'inverse, lors d'une perte de fonction de Cycline E, les ESCs ont une phase G1 plus longue

et engage leur différenciation (Coronado et al., 2013). CDK2 serait également un régulateur de la pluripotence cellulaire puisqu'une perte de fonction de cette kinase, provoque un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et la différenciation des ESCs en lignage extra-embryonnaire. (Neganova et al., 2009).

Enfin, dans le contexte des cellules souches embryonnaires humaines, il a été montré que CDK1 est également un régulateur du destin cellulaire. Une forte expression de CDK1 est associée au maintien de la pluripotence cellulaire. De façon intéressante, une diminution précise et contrôlée de l'activité de CDK1 à un niveau où les paramètres du cycle cellulaire ne sont pas affectés est malgré tout suffisante pour induire la différenciation des ESCs. Ainsi, les fonctions de CDK1 dans la régulation de l'équilibre prolifération/différenciation seraient médiées, au moins en partie, indépendamment de ces fonctions de régulateur du cycle cellulaire (Wang et al., 2017). D'autre part, les cyclines A et B ont été décrites pour réguler la progression dans le cycle cellulaire alors que les cyclines D et E contribuent à la maintenance de l'état prolifératif des cellules souches en agissant via leur interaction avec leur CDK respectives (Liu et al., 2019) (**Figure 24**).

(2) CYCLINES/CDK REGULATEURS DE LA SIGNATURE TRANSCRIPTOMIQUE DES CELLULES SOUCHES

D'un point de vue fonctionnel on sait que les cyclines/CDK ont la capacité de moduler le programme transcriptionnel des progéniteurs, en agissant directement sur des facteurs de transcription.

Il a été mis en évidence dans les cellules souches embryonnaires humaines, que CDK1 participe à la maintenance de la pluripotence cellulaire en régulant la voie des PI3K/AKT par l'intermédiaire de PDK1 (phosphoinositide-dependent protein kinase 1)(Wang et al., 2017). Cette voie de signalisation est connue pour réguler de nombreux processus cellulaires, telles que la croissance, la prolifération et la survie cellulaire. CDK1 en activant par phosphorylation PDK1, active la voie des PI3K/AKT induisant une transduction de signal faisant intervenir ses effecteurs ERK et GSK3 β , essentiels à la prolifération cellulaire (**Figure 25**).

En parallèle Cycline B1 va stimuler l'expression de LIN28A (Lin-28 Homolog A) connue pour être impliquée dans l'auto-renouvellement cellulaire en jouant un rôle de régulateur post-transcriptionnel de nombreux gènes de la pluripotence (Wang et al., 2017). Les cyclines D et E en interagissant avec leur CDK respectives, vont également activer par phosphorylation des facteurs de maintenance de la pluripotence tel que Oct4, Sox2 et Nanog (Liu et al., 2017). Nanog, étant connu pour favoriser l'expression des gènes codant CDK6 et CDC25B (Zhang et al., 2009) et Oct4, connu pour réprimer $p21^{Cip1}$ (Zhao et al., 2014), vont maintenir les cellules souches dans un état prolifératif.

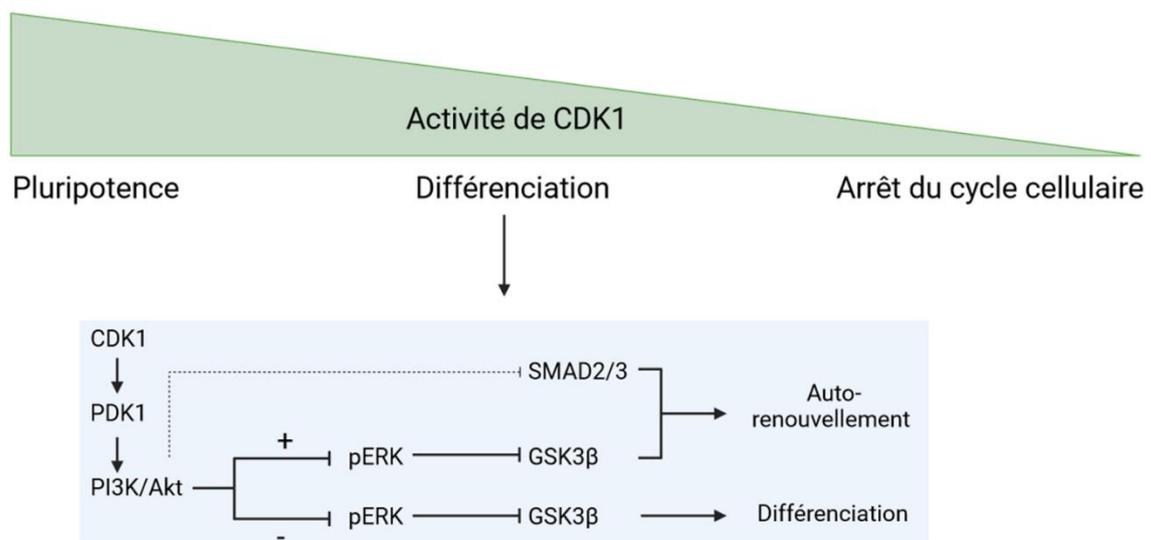


Figure 25. CDK1 régule la voie des PI3K/Akt :

L'activité de CDK1 régule l'équilibre prolifération/différenciation. Lorsque l'activité de CDK1 est élevée PDK1 est maintenu dans un état phosphorylé, favorisant l'activation de la voie PI3K/Akt à l'origine de l'auto-renouvellement cellulaire. Une faible activité, réduit l'état phosphorylé de PDK1 induisant une inhibition de la voie PI3K/Akt et la différenciation cellulaire. Schéma reproduit de (Wang et al., 2017).

Cycline D1 peut également jouer un rôle dans la spécification cellulaire indépendamment de son interaction avec ses partenaires CDK4/6, en recrutant directement des coactivateurs transcriptionnels (SP1) ou des corépresseurs transcriptionnels (E2F) (Bienvenu et al., 2010; Liu et al., 2019; Lukaszewicz and Anderson, 2011; Pauklin et al., 2016). En effet, dans les cellules souches embryonnaires, Cycline D1 se lie à SP1 et recrute p300, une histone acétylase transférase au niveau des locus des gènes conférant une identité neuroectodermique, favorisant leur transcription. En parallèle, Cycline D1 en se liant à E2F, va recruter HDAC1, une histone désacétylase, au niveau des locus des gènes conférant une identité endodermique, inhibant leur transcription (**Figure 26**). Dans le contexte de la rétine d'embryon de souris, il a été montré également qu'elle pouvait agir au niveau transcriptionnel en recrutant l'histone

acétyltransférases CBP (CREB binding protein) au niveau du promoteur de *Notch1* favorisant sa transcription, et le maintien des cellules dans un état prolifératif (Bienvenu et al., 2010).

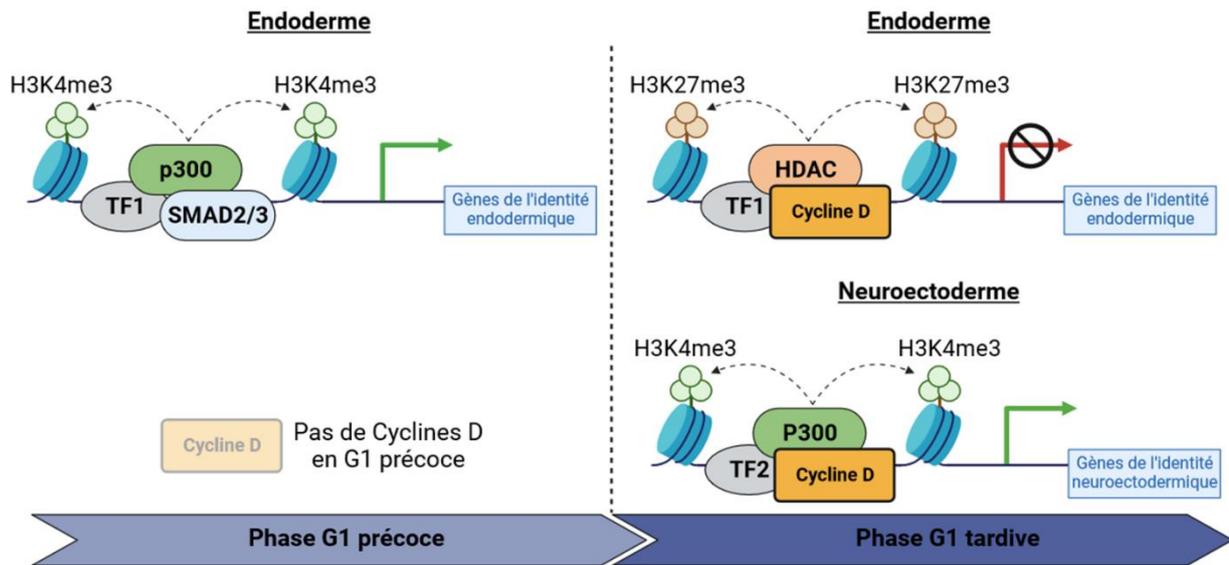


Figure 26. Cycline D1 un régulateur transcriptionnel :

Régulation transcriptionnelle des Cyclines D lors de la spécification cellulaire. Lors de l'induction de l'endoderme en neuroectoderme, les Cyclines D répriment l'expression des gènes d'identité endodermique en recrutant HDAC et activent l'expression des gènes d'identité du neuroectoderme en recrutant p300. Schéma adapté de (Pauklin et al., 2016).

Dans d'autres contextes, les protéines Rb et E2F, ont également été décrites pour jouer un rôle dans la régulation de l'équilibre prolifération/différenciation des cellules souches. Chez la drosophile il a été mis en évidence que le facteur de transcription E2F activé durant la phase G1 après levée de l'inhibition médiée par Rb est composé de deux membres : E2F1 et E2F2 dont les activités sur le contrôle du cycle cellulaire sont antagonistes. E2F1 promeut la prolifération cellulaire en favorisant l'expression notamment de la cycline E, la cycline A et des gènes impliqués dans la synthèse de l'ADN. E2F2 quant à lui réprime l'expression de gènes pro-prolifératifs et favorise la différenciation cellulaire indépendamment de ses fonctions de régulateur du cycle cellulaire (Dimova et al., 2003). Dans d'autres contextes, Rb est également connue pour jouer un rôle dans la différenciation cellulaire, en interagissant avec Runx2 un facteur de transcription favorisant l'expression de gènes régulant la différenciation des ostéoblastes en ostéoclastes (Thomas et al., 2001).

b) CKI, corrélation entre sortie du cycle cellulaire et différenciation neuronale ?

En contraste avec les CDKs et les Cyclines dont le rôle est majoritairement de maintenir les cellules dans un état prolifératif, les régulateurs négatifs du cycle cellulaire, les CKIs, sont quant à eux impliqués dans la sortie du cycle cellulaire et l'inhibition de la prolifération.

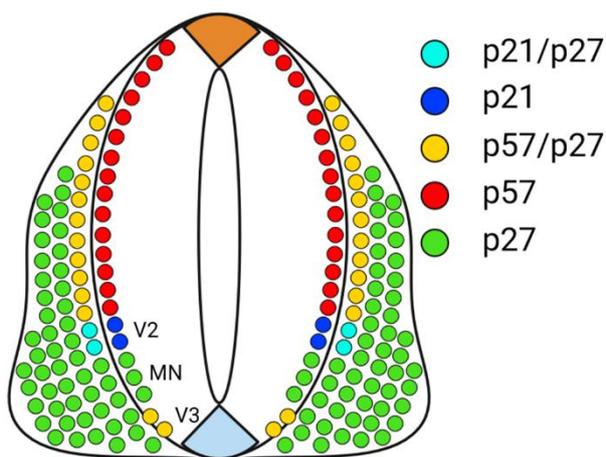


Figure 27. Régionalisation des CKIs au sein du tube neural :

Figure reproduite de (Gui et al., 2007)

Dans le tube neural en développement l'expression des CKIs est régionalisée. L'expression de $p21^{Cip1}$ est restreinte aux interneurons ventraux, $p57^{kip2}$ est exprimée le long de l'axe dorso-ventral à l'exception des domaines ventraux V2 et MN. Enfin $p27^{kip1}$ est majoritairement exprimée dans les jeunes motoneurons et les interneurons ventraux V3. L'ensemble de ces CKIs sont décrites pour agir seules ou en combinaison pour réguler et maintenir la

sortie du cycle cellulaire de différentes populations neuronales (Gui et al., 2007) (**Figure 27**).

Mais de nombreuses études n'ont établi aucun lien causal entre la sortie du cycle cellulaire et l'initiation de la différenciation des progéniteurs neuraux. En effet, une étude réalisée dans le tube neural de poulet, a mis en évidence que malgré le maintien de l'état prolifératif des progéniteurs neuraux, en forçant l'expression des cyclines D, la migration des progéniteurs dans la zone du manteau et leur différenciation n'est pas affectée (Lobjois et al., 2008). De même, des expériences de gain et de perte de fonction de $p27^{kip1}$ et $p57^{kip2}$, dans le tube neural murin, mettent en évidence que ces CKI contrôlent en effet une sortie du cycle cellulaire des progéniteurs neuraux, mais sont insuffisants pour induire leur différenciation (Gui et al., 2007). Dans cette même étude, il a été mis en évidence qu'une perte de fonction de $p57^{kip2}$, dans les populations de neurones post-mitotiques, induit leur réentrée dans le cycle cellulaire. D'autres études similaires arrivent à la même conclusion, puisque la sous-expression de Cycline D1, induit effectivement une diminution de la prolifération des progéniteurs du tube neural, mais sans pour autant promouvoir leur différenciation (Lacomme et al., 2012).

Ainsi, dans certains contextes, la sortie du cycle cellulaire à elle seule, n'est pas suffisante pour induire la différenciation neuronale. Celle-ci serait donc sous le contrôle d'une combinaison de gènes, comme montré dans le tube neural de poulet avec NeuroG2, dont l'action favorise l'expression du répresseur Sox21 et réprime l'expression de Pax6 (Lacomme et al., 2012; Molina and Pituello, 2017; Sandberg et al., 2005).

Mais d'autres études ont mis en évidence que les CKIs jouent un rôle dans la différenciation des progéniteurs.

C'est le cas de p27^{kip1} dont la perte de fonction dans le cortex provoque une diminution de neurones post-mitotiques, alors que son gain de fonction promeut la différenciation des progéniteurs corticaux (Nguyen et al., 2006). Les fonctions neurogéniques de p27^{kip1} dépendent de son rôle dans la stabilisation de NeuroG2. Cette stabilisation est indépendante de l'interaction de p27^{kip1} avec les cyclines/CDK (Nguyen et al., 2006). Une autre étude, met également en évidence que p27^{kip1} joue un rôle de répresseur transcriptionnel de Sox2, gène connu pour maintenir la pluripotence des progéniteurs neuronaux (Li et al., 2012). Dans d'autres contextes comme chez le xénope, la surexpression de p27^{Xic1}, l'orthologue de p27^{kip1} induit la différenciation des progéniteurs de la rétine en favorisant leur sortie du cycle cellulaire et leur différenciation en cellules gliales (Ohnuma et al., 1999). Dans le tube neural du xénope, il a été mis en évidence que p27^{Xic1} est nécessaire pour promouvoir la spécification et la différenciation. De plus, p27^{Xic1} agirait en aval de X-NGR-1 (un orthologue de Ngn1), mais en amont de NeuroD. Suggérant que les fonctions neurogéniques de p27^{Xic1} ont lieu lors des étapes de l'engagement vers un destin neuronal, plutôt qu'au cours des dernières étapes de la différenciation. En effet, l'engagement des progéniteurs vers une différenciation terminale en réponse à NeuroD est médiée indépendamment de la présence de p27^{Xic1} (Carruthers et al., 2003; Vernon et al., 2003).

Chez les mammifères, au cours de la corticogenèse, il a été mis en évidence que p27^{kip1} et p57^{kip2} jouent un rôle complémentaire. D'un point de vue temporel, p57^{kip2} est exprimé plus précocement que p27^{kip1} dans les aRGs et les bIPs. La perte de fonction p57^{kip2} induit une augmentation de la prolifération des progéniteurs aRGs et aIPs à E14,5 alors qu'une perte de fonction de p27^{kip1}, provoque une augmentation de la prolifération des aIPs à E16,5 (Mairet-Coello et al., 2012). Ces modifications de proportions de progéniteurs induisent une

dérégulation de la production neuronale. La perte de fonction de $p57^{kip2}$ entraîne une augmentation de la production neuronale des couches V et VI spécifiquement, alors que la perte de fonction de $p27^{kip1}$ augmente la production des neurones des couches II à V spécifiquement. L'altération de l'équilibre prolifération/différenciation médiée par $p57^{kip2}$ particulièrement est associée au développement de macrocéphalies chez les souris mutantes. Ce défaut neurodéveloppemental est associé à une hyper-prolifération des aRGs et des aIPs et une diminution globale de la neurogenèse. De façon intéressante, dans cette étude, une altération des paramètres du cycle cellulaire des aRGs a été constatée. Nous développerons ce point plus tard dans la suite de ce chapitre (Mairet-Coello et al., 2012).

Concernant $p21^{Cip1}$, peu d'études ont établi son lien avec la différenciation cellulaire, mais ce CKI serait nécessaire pour la différenciation des oligodendrocytes (Hardwick et al., 2015).

Pour finir, un autre gène candidat a été proposé pour coordonner la sortie du cycle cellulaire et la différenciation neuronale. Il s'agit du gène (*Mnb/Dyrk1a*) dont la surexpression dans le tube neural de poulet et le télencéphale murin induit une augmentation de l'expression de $p27^{kip1}$ et de *Delta1*, à l'origine d'une inhibition de la voie Notch provoquant d'une part, une sortie du cycle cellulaire et d'autre part, la différenciation neuronale (Hämmerle et al., 2011).

3. ROLE DE LA DYNAMIQUE DU CYCLE CELLULAIRE DANS UN CONTEXTE DE NEUROGENESE

Ainsi nous venons de voir que les CDKs, les Cyclines et les CKIs participent activement dans de nombreux contextes cellulaires au maintien de l'état prolifératif ou à l'initiation de la différenciation cellulaire. Ceci en agissant directement ou indirectement sur les programmes transcriptionnels des cellules, en réponse à des facteurs extracellulaires. Ces acteurs sont donc au cœur de la régulation du destin des progéniteurs. Mais depuis quelques années, une nouvelle notion est prise en compte dans la régulation de l'équilibre prolifération/différenciation des cellules souches. Il s'agit de la dynamique du cycle cellulaire et plus précisément la durée de certaines phases du cycle.

a) La dynamique de la phase G1

Comme mentionné précédemment, le contrôle du cycle cellulaire et l'équilibre entre prolifération et différenciation sont deux processus étroitement liés. Il est établi que les cellules souches embryonnaire (ESC) pluripotentes sont caractérisées par une phase S et M

rapides séparées par des phases gaps très courtes (Becker et al., 2006; Burdon et al., 2002; Singh and Dalton, 2009). Ces cycles cellulaires relativement courts, permettent une expansion massive du nombre de cellules nécessaire lors des phases précoces du développement embryonnaire. Au cours des phases tardives, la progression dans les phases du cycle cellulaire est ralentie, majoritairement due à un allongement de la durée de la phase G1 (Becker et al., 2010; Boward et al., 2016; Coronado et al., 2013; Filipczyk et al., 2007; Liu et al., 2019). Cet allongement est accompagné par une restriction du destin des cellules qui s'engagent de plus en plus vers un destin de différenciation et de sortie du cycle cellulaire. Ainsi la durée de la phase G1 constituerait une fenêtre temporelle d'engagement cellulaire (Harashima et al., 2013). Ce nouveau paramètre a majoritairement été exploré dans le contexte de la neurogenèse.

En effet, il a été montré qu'un allongement de la phase G1 est suffisant et causal pour induire la différenciation des progéniteurs neuraux et la production neuronale (Lim and Kaldis, 2012). Comme mentionné dans le premier chapitre, une étude réalisée par Saade et ses collaborateurs a mis en évidence dans le tube neural de poulet sur tissu fixé, qu'une diminution globale de la durée du cycle cellulaire était concomitante avec la différenciation des progéniteurs ventraux en passant de 16h dans les progéniteurs précoces à 10h pour les progéniteurs plus matures. De façon intéressante, bien que la durée de la phase G1 ne soit pas différente entre les progéniteurs précoces et matures, puisqu'elle reste aux alentours de 5h, la phase G1 représente plus de 50% de la durée totale du cycle cellulaire sur des progéniteurs plus matures, contre 30% pour les progéniteurs plus précoces (Saade et al., 2013). Une étude parallèle a également mis en évidence dans le tube neural de la souris que l'initiation de la différenciation des progéniteurs des domaines ventraux est concomitante avec un allongement de la durée de la phase G1 des progéniteurs (Kicheva et al., 2014). Plus récemment dans notre équipe, le suivi de cellules uniques par vidéo-microscopie dans le tube neural d'embryons de poulets, a permis de montrer que la durée de la phase G1 augmente progressivement lors de la maturation du tube neural à chaque cycle cellulaire. Les cellules filles post-mitotiques présentent une durée de phase G1 plus élevée que celle de la cellule mère (Molina et al., 2022). Mais, à l'inverse des observations faites sur tissus fixés (Saade et al., 2013), la durée totale du cycle cellulaire des progéniteurs est augmentée au cours leur maturation .

Le rôle central de la durée de la phase G1 dans la régulation de l'équilibre prolifération/différenciation a plus largement été décrit au cours du développement cortical (Hardwick et al., 2015; Salomoni and Calegari, 2010). Il a été montré qu'un allongement de la durée de la phase G1 est concomitant avec une maturation des progéniteurs aRGs vers un destin de progéniteurs bIPs plus matures (Arai et al., 2011; Calegari et al., 2005; Lange et al., 2009). Une surexpression du complexe Cycline D1/CDK4 dans le cortex murin, induit une diminution de la durée de la phase G1 associée à un retard de la neurogenèse et une augmentation de la prolifération des progéniteurs bIPs. A l'inverse une perte de fonction de ce complexe, induit une augmentation de la production neuronale associée à une déplétion du pool de progéniteurs bIPs (Lange et al., 2009). De même, et comme cité précédemment, la perte de fonction de p57^{kip2} dans le cortex murin est associée au maintien de l'état prolifératif des progéniteurs corticaux et une diminution de la production neuronale. Cette altération de l'équilibre prolifération/différenciation est concomitante avec une diminution de la durée totale du cycle cellulaire des progéniteurs de la zone ventriculaire, principalement due à un raccourcissement de la phase G1 (Mairet-Coello et al., 2012). Plus récemment, il a été mis en évidence dans le cortex murin, qu'une diminution de la durée de la phase G1 est associée à une entrée prématurée en phase S et induit une altération de la différenciation neuronale à l'origine de l'apparition de microcéphalies (Lanctot et al., 2017).

Cette modulation de la durée de la phase G1 et de l'équilibre prolifération/différenciation est étroitement corrélée aux niveaux d'expression et d'activation des protéines de la famille des Cyclines et des CDKs.

L'augmentation de la durée de la phase G1 est notamment connue pour être modulée par une augmentation de l'expression des Cyclines D et une hypo-activation des CDK1 et CDK2 *via* une augmentation de l'expression des inhibiteurs de CDK de la famille Cip/Kip (Bar-On et al., 2010; Fluckiger et al., 2006; Fujii-Yamamoto et al., 2005; Savatier et al., 1996; Wang et al., 2017; White et al., 2005; Zhang et al., 2011). Par ailleurs, le destin des progéniteurs peut être déterminé au début ou en fin de la phase G1. Dans les ESCs, durant les étapes précoces de la phase G1, lorsque les Cyclines de la famille des Cyclines D ne sont pas encore exprimées, les facteurs de transcriptions SMAD2 et SMAD3 favorisent l'expression de gènes impliqués dans la spécification de l'endoderme. Durant les étapes tardives de la phase G1, l'expression des complexes Cycline D/CDK4/6 étant élevée va favoriser l'inhibition de l'activité

transcriptionnelle de SMAD2/3 par phosphorylation, empêchant la spécification vers un destin endodermique et orientant les cellules souches embryonnaires uniquement vers un destin neuroectodermique (Liu et al., 2019; Pauklin et al., 2016). D'autres études réalisées sur le cortex murin mettent également en évidence que la durée de la phase G1 est modulée par la surexpression de protéines comme la Cycline D1, E1 ou CDK4 et que ces acteurs favorisent le maintien de l'état prolifératif des cellules souches neurales et inhibent leur différenciation (Artegiani et al., 2011; Lange et al., 2009; Pilaz et al., 2009). A l'inverse, une perte de fonction de CDK2/4 chez la souris induit une différenciation précoce dans le cerveau des embryons (Lim and Kaldis, 2012).

D'autres études se sont intéressées à un gène candidat, la protéine kinase MNB/DYRK1A, à l'origine du développement de microcéphalies chez les personnes atteintes du syndrome de Down. Il a été mis en évidence, à la fois dans le tube neural de poulet et dans le télencéphale murin, que ce gène est à la fois nécessaire et suffisant pour réguler l'expression de p27^{kip1} favorisant la sortie du cycle cellulaire des progéniteurs du système nerveux central. De plus, MNB/DYRK1A inhibe la signalisation Notch, et un gain de fonction transitoire de ce gène provoque une sortie du cycle cellulaire et une initiation de la différenciation neuronale (Hämmerle et al., 2011). Plus récemment une autre étude s'est intéressée également au rôle de DYRK1A et a précisé son rôle dans la régulation du destin cellulaire. Il a été mis en évidence qu'une surexpression prolongée de ce gène entraînait un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et la différenciation neuronale et ce, en régulant la stabilité des protéines régulatrices du cycle cellulaire. En effet, DYRK1A promeut la dégradation de Cycline D1 *via* le protéasome par phosphorylation sur la Thr286. A l'inverse DYRK1A, favorise la stabilisation de p27^{kip1} par phosphorylation sur la Ser10 (Soppa et al., 2014).

b) La dynamique de la phase S

La modulation de la cinétique de la phase S a également été caractérisée pour être concomitante avec un changement du destin des progéniteurs neuraux. Dans le tube neural de poulet, comme mentionné précédemment, une diminution globale de la durée du cycle cellulaire de l'ordre de 6h est concomitante avec la différenciation des pMN (Saade et al., 2013). Cet impact sur la durée du cycle cellulaire est principalement dû à une diminution drastique de la durée de la phase S, en passant de 8 heures pour les progéniteurs précoces à 3 heures pour les progéniteurs plus tardifs et plus engagés vers un destin neuronal (Saade et

al., 2013). Dans une étude ultérieure, cette diminution de la durée de la phase S lors de l'initiation de la différenciation, a également été rapportée dans l'ensemble des progéniteurs le long de l'axe dorso-ventral du tube neural de poulet (Le Dréau et al., 2014). Dans ces deux études, la modulation de la phase S a directement été corrélée à la voie Shh et à ses effecteurs, SMAD1/5 et une perte de fonction de cette signalisation est associée à une initiation de la différenciation des progéniteurs neurax spinaux (Le Dréau et al., 2014; Saade et al., 2013). Par ailleurs, la dynamique de la phase S des progéniteurs neurax a également été reportée pour être variable le long de l'axe antéro-postérieur (Olivera-Martinez et al., 2014). Toujours dans le tube neural de poulet, il a été reporté que la durée de la phase S est allongée de 30 minutes dans les progéniteurs du tube neural caudal par rapport aux cellules du mésoderme pré-somitique et du mésoderme pré-somitique caudal. Cet allongement de la durée de la phase S est encore plus marqué dans la région la plus antérieure du tube neural, mais la proportion de la phase S par rapport au cycle total est nettement plus faible en comparaison avec les régions les plus postérieures (Olivera-Martinez et al., 2014). Comme mentionné dans le premier chapitre, les zones du mésoderme pré-somitique sont majoritairement composées de cellules souches fortement prolifératives, alors que les zones du tube neural caudal et antérieur sont majoritairement composés de progéniteurs neurax déjà restreints vers un destin neurogénique. Ainsi une modulation de la durée totale du cycle cellulaire et de la durée de la phase S est concomitante avec un changement de l'état de maturation des cellules souches/progéniteurs neurax (Olivera-Martinez et al., 2014). Cette modulation des paramètres du cycle cellulaires s'accompagne d'un remodelage de l'expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire le long de l'axe antéro-postérieur (par exemple ; *CDC7*, *Wee1*, *P57*, *P27* et *Cycline D1*) (Olivera-Martinez et al., 2014).

Au cours du développement cortical, il a également été mis en évidence qu'une diminution de la durée de la phase S (associée à un allongement de la phase G1) est corrélée à une augmentation de la différenciation. Cette diminution de la durée de phase S est associée à un enrichissement des gènes inhibant la phase S (*E2f1* et *CDC25C*), à une surexpression de gènes impliqués dans la différenciation des progéniteurs corticaux (*Neurod*), et à une sous-expression de gènes impliqués dans l'auto-renouvellement des progéniteurs corticaux (*Wnt7a* et *Notch3*) (Arai et al., 2011). Un raccourcissement de la durée de la phase S concomitant avec

une augmentation de la production neuronale a également été reportée dans le cortex des furets (Turrero García et al., 2016).

c) La dynamique de la phase G2

C'est au cours de la phase G2 que sont régulés les processus qui permettent la mise en place des fuseaux mitotiques dont le rôle dans la régulation du destin des progéniteurs a déjà été décrit dans le chapitre précédent. En effet, dans le néocortex murin, une formation incomplète des centrosomes peut provoquer une activation précoce de CDK1 à l'origine d'une entrée prématurée en mitose, ce phénomène a pour conséquence de provoquer une mauvaise orientation des fuseaux mitotiques à l'origine de divisions neurogéniques (Gruber et al., 2011).

D'autres études mettent en évidence un lien plus direct de la dynamique de la phase G2 et la régulation du destin des progéniteurs neuraux. En effet, chez la drosophile, au cours du développement des organes sensoriels, les progéniteurs passent par une phase d'arrêt ponctuel et précis du cycle en phase G2. Cette pause marque le début de la mise en place de mécanismes induisant la différenciation des progéniteurs. L'entrée prématurée en mitose via une surexpression de CDK1 ou de CDC25^{string} (analogue de CDC25B) provoque un maintien de l'état prolifératif des cellules et inhibe leur différenciation. Dans ce contexte, la pause ponctuelle en G2 serait nécessaire pour la mise en place de voies de signalisations impliquées dans l'initiation de la différenciation de ces progéniteurs (Ayeni et al., 2016). Par ailleurs, dans les cellules souches embryonnaires humaines (hESC), il a été mis en évidence qu'une augmentation de la durée de la phase G2 et de la phase S est liée au maintien de leur état prolifératif (Gonzales et al., 2015). La maintenance de la pluripotence cellulaire lors de ces phases serait médiée par la voie ATM/ATR-CHEK2. Cette dernière permet l'activation transcriptionnelle de p53 et de la cycline B1 lors de l'allongement des phases S et G2. Ces acteurs vont à leur tour favoriser l'expression de gènes connus pour exercer un maintien de la signature cellulaire de pluripotence (Gonzales et al., 2015).

De façon intéressante, la voie Shh connue initialement pour réguler la prolifération et la maintenance de la pluripotence cellulaire dans de nombreux tissus a également été reportée pour jouer un rôle dans la sortie du cycle cellulaire. Au cours de développement de la rétine chez le xénope, il a été mis en évidence que la signalisation Shh joue un rôle transitoire. Durant

les phases précoces, les progéniteurs rétiniens ont un cycle cellulaire lent, mais durant les phases plus tardives, Shh induit une accélération des durées des phases gap G1 et G2 à l'origine d'une sortie du cycle cellulaire et d'une initiation de la différenciation. A l'inverse, une inhibition de la signalisation Shh induit un allongement des phases G1 et G2 et le maintien des progéniteurs rétiniens dans un état prolifératif. La dynamique de ces phases G1 et G2, au cours de ce changement de destin, serait médiée par la régulation d'activateurs du cycle cellulaire comme Cycline D1, Cycline A2, B1 et CDC25C (Agathocleous et al., 2007; Locker et al., 2006).

Dans le tube neural de poulet en développement, la dynamique de neurogenèse est progressive. Elle débute dans la partie ventrale à deux jours de développement et s'étend jusqu'à la partie dorsale à quatre jours de développement. Notre équipe a mis en évidence qu'à deux jours de développement, les progéniteurs ventraux plus fortement engagés dans la différenciation neuronale ont une durée de la phase G2 plus courte que les progéniteurs neuraux dorsaux n'ayant pas encore débuté leur différenciation neuronale (Peco et al., 2012). De même, dans les pMN matures, un raccourcissement de la durée de la phase G2 a également été observé (Saade et al., 2013). Plus récemment, notre équipe a montré dans le cortex murin, qu'un raccourcissement de la durée de la phase G2 par des inhibiteurs pharmacologiques, permettait de favoriser la maturation des progéniteurs corticaux en favorisant la production de progéniteurs basaux intermédiaires (bIPs), progéniteurs plus matures et fortement neurogéniques par rapport aux progéniteurs apicaux (aRGs) moins matures et fortement prolifératifs dont ils sont issus (Roussat et al., 2023).

Ainsi, la dynamique du cycle cellulaire et notamment la dynamique des phases G1, S et G2 sont au cœur de la régulation l'équilibre prolifération et différenciation des progéniteurs neuraux (Figure 28).

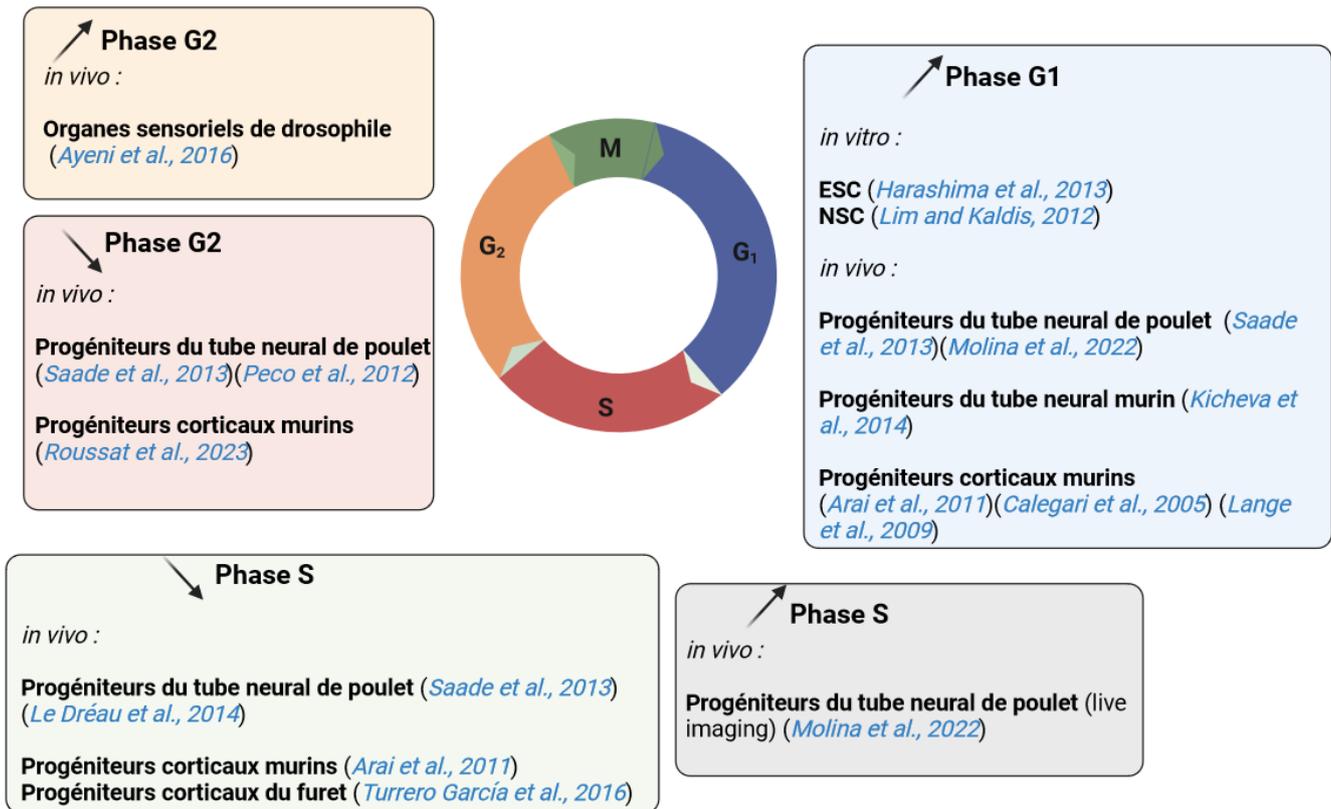


Figure 28. Dynamiques des phases du cycle cellulaire décrites pour être concomitantes avec la différenciation des cellules souches/progéniteurs :

4. LA PHOSPHATASE CDC25B, UN REGULATEUR DE L'EQUILIBRE PROLIFERATION/DIFFERENCIATION AU COURS DE LA NEUROGENESE

L'un des acteurs impliqués dans la régulation de la dynamique des phases du cycle cellulaire est un membre de la famille des phosphatases CDC25, CDC25B. **Notre équipe a montré que la phosphatase CDC25B, initialement connue pour jouer un rôle dans la transition G₂/M en activant CDK1, joue un rôle majeur dans la régulation de l'équilibre prolifération/différenciation des progéniteurs neuraux.**

a) La famille des phosphatases CDC25

La famille des protéines CDC25 a initialement été découverte chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, qui ne possède qu'un gène CDC25. Cette protéine est essentielle à la transition G₂/M chez ces organismes, puisque sa déplétion provoque un arrêt du cycle en phase G₂ (Russell and Nurse, 1986). D'un point de vue phylogénétique, cette famille de protéines est fortement conservée et est retrouvée dans de nombreuses espèces. Chez les invertébrés, cette famille est retrouvée notamment chez la drosophile avec les gènes *String*

et *Twine* et chez *C. Elegans* on retrouve 4 membres *cdc25.1* à *cdc25.4* (Boutros et al., 2007). On retrouve 3 orthologues CDC25A, B et C, chez tous les vertébrés à l'exception des Néognathes (dont le poulet fait partie) où CDC25C est absente. Enfin, chez d'autres vertébrés comme le xénope ou le poisson zèbre on retrouve une quatrième phosphatase CDC25D. Ces phosphatases, bien que faisant partie de la même famille, sont régulées et agissent différemment au cours du cycle cellulaire (**Figure 29-a**).

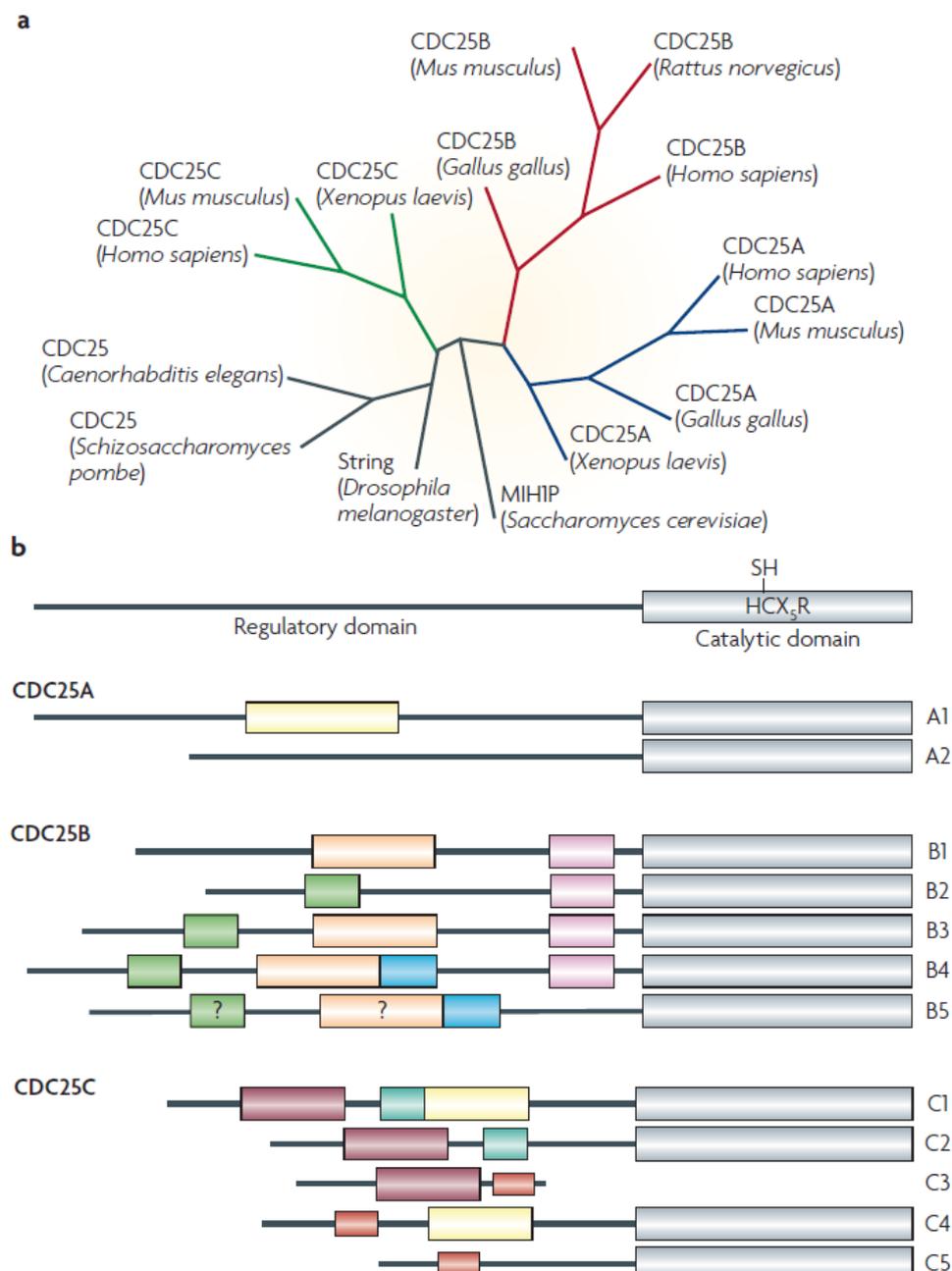


Figure 29. (a) Arbre phylogénétique des orthologues des phosphatases CDC25. (b) Structures protéiques et variants d'épissage :
(Boutros et al., 2007)

b) Régulation et fonctions des phosphatase CDC25

CDC25A, CDC25B et CDC25C sont des protéines formées de respectivement de 524, 580 et 473 acides aminés (Sur and Agrawal, 2016). Elles sont composées d'un domaine catalytique en C-Terminal, fortement conservé au cours de l'évolution et d'un domaine régulateur en N-Terminal, soumis à des évènements d'épissages alternatifs provoquant la synthèse de différents variants, deux pour CDC25A et cinq pour CDC25B et CDC25C (**Figure 29-b**).

Dans le domaine régulateur sont retrouvées des séquences NLS et NES permettant respectivement l'externalisation et l'internalisation nucléaire de ces protéines et ainsi la régulation de leur localisation intracellulaire. Par ailleurs, dans le domaine régulateur, on retrouve également des sites de phosphorylation conservés et impliqués dans la régulation de l'activité enzymatique de ces phosphatases ainsi que de leur stabilité (Boutros et al., 2007) (**Figure 29-b**).

D'un point de vue fonctionnel, les protéines de la famille des CDC25 sont connues pour jouer un rôle de régulateurs positifs de la progression dans le cycle cellulaire en activant les complexes Cyclines/CDK *via* déphosphorylation des sites Thréonines et des Tyrosine des protéines CDK (Boutros et al., 2006).

Ces phosphatases sont régulées transcriptionnellement au cours des phases du cycle cellulaire. CDC25A est principalement exprimée en phase G1 tardive et son expression est stabilisée jusqu'à la mitose (Agius et al., 2015; Kakizuka et al., 1992; Körner et al., 2001). CDC25C est quant à elle, exprimée tout au long du cycle cellulaire mais atteint un pic d'expression lors de la phase G2/M (Wickramasinghe et al., 1995). Enfin, CDC25B commence à être exprimée au milieu de la phase S, pour atteindre un pic maximal d'expression lors de la transition G2-M et décroît rapidement après la mitose (Boutros et al., 2007).

Ces protéines sont également régulées post-traductionnellement par des phosphorylation activatrices ou inhibitrices comme mentionné précédemment. En effet, CDC25A est dégradée par le protéasome *via* ubiquitination médiée en phase S et en G2 par SKP1-CUL1-Fbox (SCF^{βTRCP}) et en fin de mitose par APC/C (He et al., 2005). Cette dégradation est régulée par deux protéines kinases CHK1 et CHK2 qui phosphorylent CDC25A sur un groupe des Sérines. A l'inverse, CDC25A est stabilisée par le complexe Cycline B/CDK1 par phosphorylation des groupes Sérines17 et 115. CDC25B est également dégradée par les voies du protéasome par

SCF^{βTRCP} après phosphorylation de médiée par le complexe Cycline A/CDK1 (Baldin et al., 1997; Kanemori et al., 2005). CDC25C quant à elle reste relativement stable tout au long du cycle cellulaire (Garner-Hamrick and Fisher, 1998) (**Figure 30**).

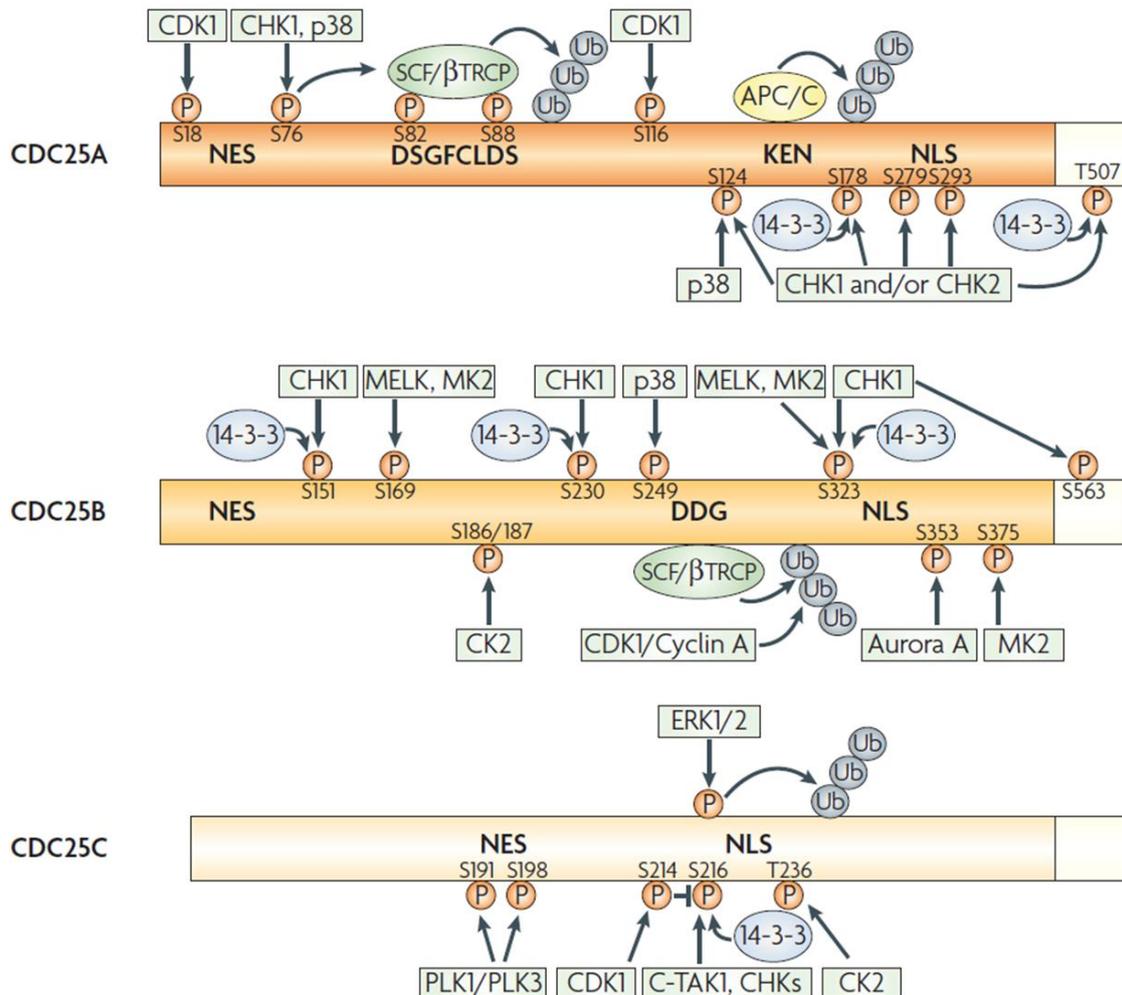


Figure 30. Sites de phosphorylations activatrices ou inhibitrices des protéines de la famille des CDC25 : (Boutros et al., 2007)

c) Modèles murins mutants pour CDC25s

Afin de caractériser les fonctions des protéines de cette famille au cours du développement embryonnaire, plusieurs modèles murins de perte de fonction ont été réalisés. Dans cette partie, je vais décrire les phénotypes observés.

La perte de fonction de CDC25C^{-/-} n'affecte pas la viabilité et aucun phénotype majeur n'est observé (Chen et al 2001). La perte de fonction de CDC25B^{-/-}, n'affecte pas non plus la viabilité des souris mutantes, mais provoque néanmoins la stérilité de ces individus en affectant l'ovogenèse (Lincoln et al., 2002; Wu and Wolgemuth, 1995). Ce phénotype est rétabli partiellement en réexprimant CDC25B (Lincoln et al., 2002). Mais l'absence de phénotype

majeur en l'absence de CDC25B et CDC25C suggère l'hypothèse d'une redondance fonctionnelle entre ces deux phosphatases. Un double mutant, CDC25B^{-/-} CDC25C^{-/-} (BCKO) a donc été réalisé pour étudier cette hypothèse (Ferguson et al., 2005). Les souris, BCKO, ont un poids inférieur aux souris sauvages, mais des analyses réalisées sur des fibroblastes embryonnaires murins (MEF) issues de ces souris BCKO, ne révèlent aucune altération des paramètres du cycle cellulaire, de réponse aux dommages à l'ADN ou de variation de l'expression de CDC25A (Ferguson et al., 2005). La phosphatase CDC25A quant à elle est essentielle au développement embryonnaire puisque sa perte de fonction est embryonnaire létale à cause d'un défaut de post-implantation (Solc et al., 2008).

Ainsi, CDC25A serait essentielle au développement embryonnaire précoce, mais pas CDC25B et CDC25C. A l'âge adulte, la perte de fonction conditionnelle de CDC25A a été liée à des défauts de développement intestinaux, mais ses défauts sont compensés par CDC25C et CDC25B (Lee et al., 2009). Ces différentes études suggèrent donc une redondance fonctionnelle entre ces trois phosphatases.

La régulation de l'expression et de la stabilité des phosphatases de la famille des CDC25 est donc finement régulée au cours du cycle cellulaire et permet une activation adéquate des complexes Cycline / CDK à l'origine du bon déroulement du cycle cellulaire. L'absence de phénotypes majeurs sur le développement embryonnaire lors de la perte de fonction de ces phosphatases (à l'exception de CDC25A), serait due à une redondance fonctionnelle des membres de cette famille. Mais un des membres, CDC25B a depuis une dizaine d'années été décrit pour jouer un rôle de régulateur de l'équilibre prolifération/différenciation des progéniteurs au cours de la neurogenèse.

d) La phosphatase CDC25B, un acteur modulant la dynamique du cycle cellulaire et la neurogenèse

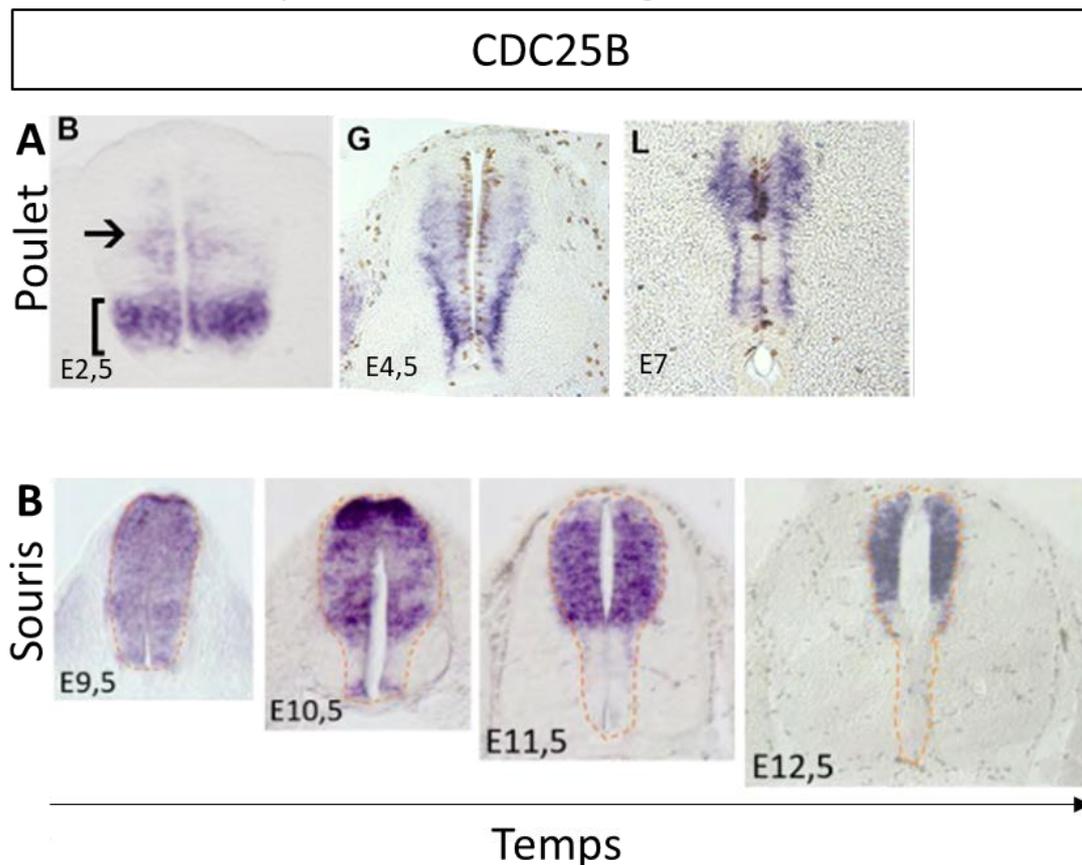


Figure 31. L'expression de CDC25B corrèle avec la dynamique de progression de la neurogenèse :

Hybridation *in situ* révélant le profil d'expression de *CDC25B* au sein du tube neural du poulet (A) et de la souris (B) à différents stades de développement embryonnaire. L'expression de *CDC25B* corrèle avec l'initiation de la neurogenèse et suis la dynamique de neurogenèse. Les images (A) proviennent de (Peco et al., 2012) et les images (B) proviennent de (Manuscrit de thèse : Mélanie Roussat 2020)

Comme décrit précédemment, Shh joue un rôle central au cours du développement des vertébrés. De façon intéressante, la voie Shh/Gli a été décrite dans le tube neural de poulet et murin, pour être un acteur majeur de la régulation de l'entrée en mitose en régulant transcriptionnellement *CDC25B* (Bénazéraf et al., 2006). Dans cette même étude, il a été mis en évidence que l'expression de *CDC25B* est régionalisée et dynamique. En effet, cette protéine n'est pas exprimée dans le mésoderme pré-somitique, mais est exprimée dans les régions plus antérieures, en allant du tube neural caudal jusqu'au tube neural antérieur. De plus, l'expression de *CDC25B* est également dynamique le long de l'axe ventro-dorsal (Figure 31). Son expression est majoritairement ventrale lors des phases précoces du développement et s'étend vers la partie dorsale durant les phases plus tardives. Ce gradient d'expression de *CDC25B* suit la dynamique de neurogenèse qui elle aussi progresse le long de l'axe dorso-ventral (Bénazéraf et al., 2006; Peco et al., 2012). Ce patron d'expression est spécifique de

CDC25B, puisque les autres régulateurs de la transition G2-M, CDK1 et CDC25A sont exprimés de façon ubiquitaire le long de l'axe antéro-postérieur et dorso-ventral (Bénazéraf et al., 2006).

Chez la souris, l'expression de CDC25B, est également initiée au début de la neurogenèse, son expression débute à E9,5, stade où débute la neurogenèse ventrale et se restreint dans la région dorsale du tube neural à E10,5, au début de la production des interneurons dorsaux (Bonnet et al., 2018). La perte de fonction de CDC25B est associée à une diminution de la durée de la phase G1 et à une augmentation de la durée de la phase G2 des progéniteurs neuronaux. Cette modification de la durée des phases du cycle est concomitante avec une diminution de la production neuronale (Bonnet et al., 2018; Peco et al., 2012). Plus récemment, des expériences de gain de fonction de CDC25B ont révélé un phénotype inverse, en provoquant un allongement de la durée de la phase G1 et une diminution de la durée de la phase G2 des progéniteurs neuronaux. Ces modulations des durées de phases sont concomitantes avec un changement de l'équilibre prolifération/différenciation des progéniteurs neuronaux et sont associées à une diminution de la proportion des divisions prolifératives et une augmentation de la proportion des divisions neurogéniques. En aval de ces modifications une augmentation de la production neuronale est constatée (Bonnet et al., 2018). Par ailleurs, la surexpression d'une protéine mutante de CDC25B, incapable d'interagir avec son substrat CDK1 (CDC25B^{ΔCDK}), induit une augmentation de la proportion des cellules réalisant des divisions neurogéniques asymétriques, mais n'impacte pas la proportion de cellules réalisant des divisions neurogéniques terminales. Ainsi, l'interaction de CDC25B avec CDK1 est essentielle pour induire des divisions neurogéniques terminales, mais ne l'est pas pour induire des divisions neurogéniques asymétriques. Par conséquent, il semblerait qu'une partie des fonctions neurogéniques de CDC25B serait régulée de façon cycle cellulaire indépendante (Bonnet et al., 2018).

Les fonctions neurogéniques de CDC25B ont également été précisées sur tissu vivant. Il a été mis en évidence en condition sauvage, que la durée totale du cycle cellulaire est hétérogène d'un progéniteur neural à l'autre. Cette hétérogénéité de la durée totale du cycle cellulaire est le reflet d'une hétérogénéité de la durée de la phase G1 et de la phase S. Une surexpression de CDC25B induit un allongement de la durée de la phase G1 par l'intermédiaire de son interaction avec CDK1, mais CDC25B étant dégradée en fin de mitose, son action sur la durée

de la phase G1 serait indirecte (Molina et al., 2022). De façon intéressante, le gain de fonction de cette phosphatase induit une augmentation de la proportion de progéniteurs neuraux ayant une protéine Rb dans un état non phosphorylé et cela expliquerait cette hétérogénéité et cet allongement de la phase G1 au sein des progéniteurs. Pour finir, dans cette même étude, l'allongement de la durée de la phase G1 et de son hétérogénéité ont également été décrits pour être progressivement augmentés à chaque nouvelle génération cellulaire après la mitose. Ainsi, l'expression de CDC25B dans les progéniteurs neuraux restreindrait peu à peu, à chaque génération, les progéniteurs neuraux vers un destin neurogénique (Molina et al., 2022).

Plus récemment, il a été mis en évidence dans le cortex murin, qu'une perte de fonction de CDC25B durant les phases précoces de la corticogénèse induisait une augmentation transitoire de la production neuronale, associée à une diminution du nombre de progéniteurs basaux (bIPs) (Roussat et al., 2023). Comme mentionné en chapitre 1 les progéniteurs apicaux participent à la production neuronale par deux processus. Soit par neurogenèse directe, en donnant directement naissance à des neurones, soit par neurogenèse indirecte en donnant d'abord naissance à des progéniteurs basaux (bIPs), qui à leur tour vont participer à la production neuronale (Govindan and Jabaudon, 2017). Un équilibre entre ces processus de neurogenèse directe et indirecte est crucial pour participer au développement d'un cortex fonctionnel. De façon intéressante, l'augmentation transitoire de la production neuronale, à la suite d'une perte de fonction de CDC25B, n'est pas due à l'induction de différenciation terminale des progéniteurs apicaux, puisque le nombre de ces derniers n'est pas modifié. Par ailleurs, ces modifications du destin cellulaire sont concomitantes avec un allongement de la durée de la G2 et à une diminution de la durée de la phase G1 des progéniteurs corticaux. De façon intéressante, par traitement pharmacologique, un rétablissement d'une durée normale de la phase G2 dans un contexte perte de fonction pour CDC25B est suffisant pour restaurer un phénotype sauvage.

Ces données suggèrent que CDC25B, en modifiant la dynamique du cycle cellulaire, favorise la mise en place de mécanismes moléculaires et de voies de signalisations qui restreignent de plus en plus, à chaque cycle cellulaire, les progéniteurs neuraux vers un destin neurogénique.

a) Conclusion générale Chapitre 2 :

Dans le chapitre précédent, nous avons évoqué comment les voies des morphogènes et les facteurs de transcriptions induits par ces voies de signalisation sont cruciaux pour à la fois contrôler la régionalisation tissulaire, la spécification et la différenciation cellulaire. Dans ce chapitre, nous avons également vu que les acteurs du cycle cellulaire, au-delà de leurs fonctions dans la progression dans le cycle, ont la capacité de réguler l'équilibre entre prolifération et différenciation des progéniteurs, et qu'une modulation de cet équilibre est concomitante avec une variation de la durée de certaines phases du cycle cellulaire.

L'hypothèse la plus répandue, est que le choix d'une cellule à s'auto-renouveler ou à se différencier serait réalisé lors de la mise en place des centrosomes et des fuseaux mitotiques. Lors de la mitose, une répartition symétrique ou asymétrique des composants de la cellule mère détermine si cette dernière donne naissance à deux cellules filles identiques ou au contraire à des cellules aux programmes opposés et dont la capacité proliférative aurait évolué.

Mais depuis de nombreuses années, des liens étroits entre acteurs de la machinerie du cycle cellulaire et régulation du destin des cellules souches/progéniteurs ont été déterminés dans de nombreux contextes biologiques à la fois *in vitro* et *in vivo*. De même, un changement de la durée de certaines phases du cycle cellulaire est concomitant avec une modulation de la capacité des cellules à s'auto-renouveler ou à se différencier. Cependant un lien causal du changement de la dynamique de ces phases et une modulation de l'équilibre prolifération/différenciation n'a pas encore été clairement défini.

Ces liens entre acteurs de la machinerie du cycle cellulaire, dynamique du cycle et destin des cellules souches/progéniteurs, suggèrent que certains évènements moléculaires peuvent être mis en place au cours de phases spécifiques du cycle cellulaire, et qu'un changement de la dynamique de ces phases, favoriserait l'activation ou l'inhibition de certaines voies déterminantes pour le destin cellulaire. L'autre possibilité, concernant ces changements de dynamique de phase du cycle cellulaire, serait que le passage plus rapide ou plus lent des différents points de restrictions, serait prédéterminé par le « patrimoine » génétique, transcriptomique et protéomique transmis de génération en génération cellulaire.

Des études se sont justement penchées sur la question, et notamment une publication, mettant en évidence à l'échelle cellulaire, une hétérogénéité de l'activité de CDK2 lors de la sortie de la mitose (Spencer et al., 2013). Des sous-populations de cellules ayant une forte activité de CDK2 et une protéine Rb dans un état hyper-phosphorylé dès la sortie de la mitose, passent plus rapidement le point de restriction G1/S et initient un nouveau cycle. A l'inverse, lorsque l'activité de CDK2 est faible, la protéine Rb est dans un état hypo-phosphorylé, les cellules sont donc dans un état de pré-point de restriction non engagé et entrent en quiescence. De façon intéressante, le niveau d'activité de CDK2 et l'état de phosphorylation de Rb sont définis dès la phase G2 de la cellule mère, par l'activation ou l'inactivation de l'expression d'un inhibiteur de CDK, comme p21. Les cellules exprimant fortement p21 vont donner naissance à des cellules filles à faible activité de CDK2. Cet état est réversible, puisqu'une dégradation de p21 permet un passage du point de restriction et donc l'entrée à nouveau dans le cycle cellulaire (Moser et al., 2018).

De plus, une étude plus récente a confronté le modèle classique selon lequel les cellules sont sensibles aux mitogènes uniquement durant la phase G1 et propose un autre modèle, selon lequel la signalisation des mitogènes serait intégrée tout au long du cycle cellulaire par la voie des MAPKs (Mitogen-activated protein kinase). Cette dernière, en activant Erk, va permettre la transcription de nombreux acteurs du cycle cellulaire, comme les Cyclines D, et CDK4/6 et CDK2, composant « l'historique » cellulaire. Cet historique sera stocké dans les cellules sous forme de signature traductomique spécifique, qui lors de la phase G2 va être déterminante pour contrôler la décision de prolifération/quiescence des cellules filles après la mitose (Min et al., 2020).

Ainsi, l'historique des cellules mères et l'héritage symétrique ou asymétrique aux cellules filles du patrimoine épigénétique, transcriptomique et traductomique lors de la mitose seraient déterminants pour définir le destin des cellules souches/progéniteurs.

D. **CHAPITRE 3 : LA MACHINERIE TRADUCTIONNELLE ET LA REGULATION DE L'EQUILIBRE PROLIFERATION/DIFFERENTIATION DES CELLULES SOUCHES**

1. NOUVEAUX MECANISMES A L'ORIGINE DE L'EQUILIBRE PROLIFERATION/DIFFERENTIATION

De plus en plus d'études montrent qu'au-delà de l'action de facteurs extracellulaires (morphogènes) ou des facteurs intracellulaires (facteurs de transcription et acteurs du cycle cellulaire), la machinerie traductionnelle fait également partie intégrante de la régulation de l'équilibre prolifération et différenciation des cellules souches/progénérateurs.

a) **Acteurs de la machinerie traductionnelle :**

La traduction correspond à l'étape où un ARNm est traduit en protéine. Cette étape a lieu dans le cytoplasme et est médiée par les ribosomes qui sont au cœur de la machinerie traductionnelle. Ces ribosomes sont composés, dans toutes les espèces du vivant, de deux sous-unités qui jouent un rôle complémentaire. La petite sous-unité assure l'encrage aux ARNm et leur lecture, tandis que la grande sous-unité catalyse la synthèse des liaisons peptidiques entre les acides aminés apportés par les ARNt (ARN de transfert)(Hershey et al., 2012; Wilson and Doudna Cate, 2012).

Les ribosomes des bactéries et des eucaryotes, bien que composés de deux sous-unités et ayant des fonctionnements similaires, diffèrent par le nombre de leurs composants, leur taille et leur séquence (Hershey et al., 2012; Wilson and Doudna Cate, 2012). Pour ce chapitre, nous allons uniquement nous intéresser aux ribosomes eucaryotes.

Le ribosome 80S chez les eucaryotes, est composé d'une grande et d'une petite sous-unité respectivement 60S et 40S (Sonenberg and Hinnebusch, 2009). La 40S est composée de 33 protéines ribosomiques (RP) et d'un ARNr (ARN ribosomique) appelé 18S. La grande sous-unité 60S est, quant à elle, composée de 47 protéines ribosomiques et de 3 ARNr (28S, 5.8S et 5S). La formation de ces complexes moléculaires est coûteuse en énergie et nécessite différentes étapes de synthèse et d'assemblage. La biogenèse des ribosomes est initiée dans le nucléole, puis est poursuivie dans le noyau et se termine dans le cytoplasme.

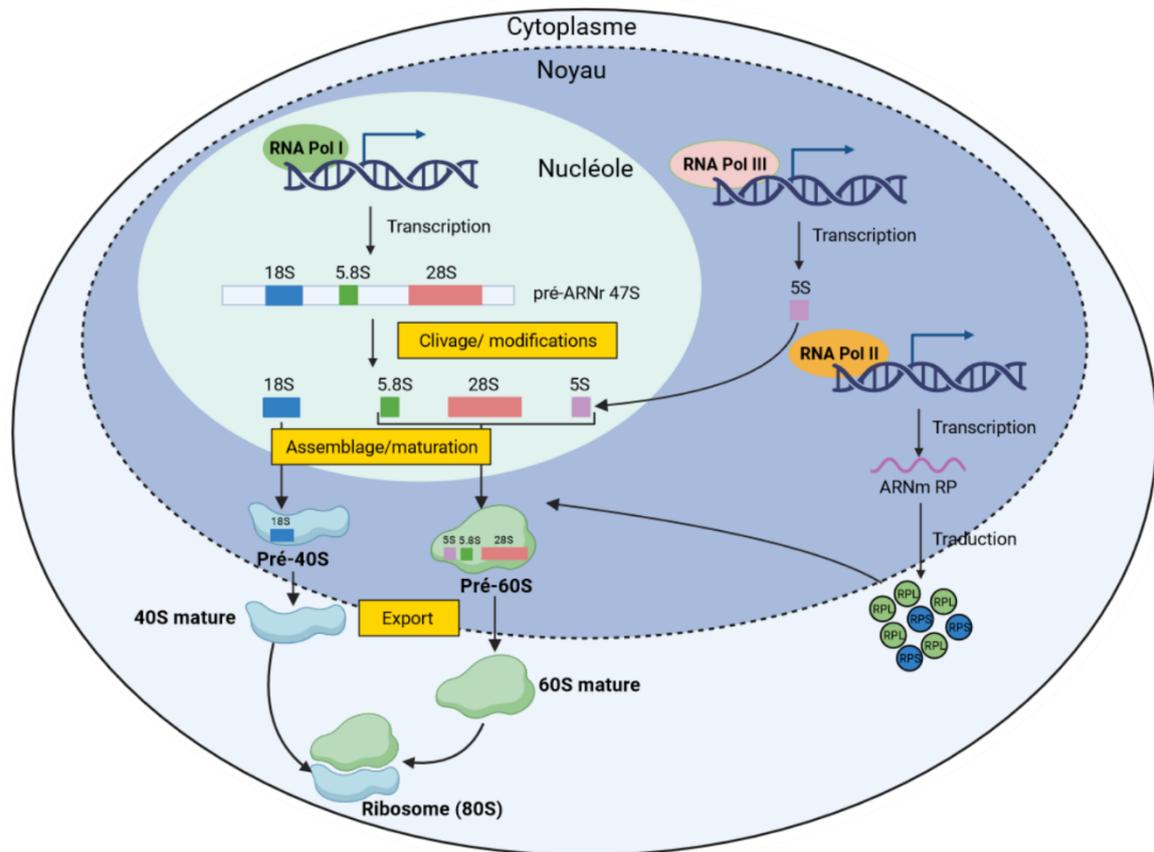


Figure 32. La biogenèse des ribosomes :

Schématisation de la biogenèse des ribosomes. Schéma adapté de (Ferreira et al., 2020)

L'assemblage et la maturation des ribosomes font intervenir plus de 200 facteurs protéiques et ARN non codant appelés snRNA. Les gènes codant pour les protéines ribosomiques (RP) sont transcrits dans le noyau par l'ARN Polymérase II, puis traduits dans le cytoplasme et réinternalisés dans le nucléoplasme. Les ARNr 5.8S, 18S et 28S sont issus d'une seule et même séquence d'ADN et cette dernière est transcrite par l'ARN polymérase I (Pol I) pour donner le transcrit primaire pré-ARNr 47S. L'ARNr 5S est quant à lui transcrit par l'ARN polymérase III (Pol III) à partir d'un locus génomique indépendant. Ces ARNr constituent le cœur des ribosomes et ce sont eux qui portent leur activité enzymatique, on parle alors de ribozymes. Ils possèdent une activité catalytique qui assure la formation de liaisons peptidiques au cours de la synthèse protéique. Ainsi, la maturation et la restructuration du pré-ARNr 47S pour donner les ARNr matures est réalisée par des étapes ordonnées et synchronisées. Le long pré-ARNr 47S subit donc de nombreuses étapes de modification au cours desquelles, les facteurs d'assemblages et les protéines ribosomiques vont s'associer pour former une pré-particule appelée 90S qui sera ensuite clivée pour donner naissance aux pré-particules pré-60S et pré-

40S qui vont suivre d'autres étapes de maturation dans le noyau et le cytoplasme pour former les sous-unités matures qui prennent le nom de 40S et 60S. Ces deux sous-unités vont être assemblées pour former les ribosomes matures appelés 80S (Ferreira et al., 2020; Pelletier et al., 2018) (**Figure 32**).

Ces ribosomes vont être au cœur de la machinerie traductionnelle et permettre le contrôle et la coordination de l'expression génique dans les cellules.

2. MACHINERIE TRADUCTIONNELLE, BIOGENESE DES RIBOSOMES ET DESTIN CELLULAIRE

Durant près de 10 ans, de nombreuses études ont mis en évidence que la biogenèse des ribosomes et la synthèse protéique jouent un rôle crucial dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules souches. Dans de nombreux contextes biologiques, il a été montré que la biogenèse des ribosomes et l'intensité de la traduction sont dynamiques et évoluent selon le statut prolifératif ou différenciatif des cellules (Gabut et al., 2020).

Au cours du développement embryonnaire les cellules passent par différents états de maturation qui restreignent progressivement leur destin. L'ensemble de ces étapes de maturation est contrôlé par une modulation des signatures épigénétiques, transcriptomiques et protéomiques spécifiques qui sont finement régulées à la fois spatialement et temporellement pour déterminer le destin cellulaire, et permettre le développement d'un organisme fonctionnel.

Les cellules souches doivent, pour rester à l'état « souche », activer un programme transcriptionnel spécifique à la pluripotence et en parallèle inactiver l'expression de gènes de spécification et de différenciation cellulaire. Mais ces cellules sont également permissives à la transduction de signaux induisant un changement d'identité et sont capables de remodeler rapidement leur programme d'expression génique. La machinerie qui permet à la cellule souche de moduler rapidement ces changements de programme, est la machinerie traductionnelle. Cette machinerie, intervenant en aval des étapes de maturation des ARNm, pourrait moduler la synthèse de protéines spécifiques, sans passer par des étapes de modulation de l'épigénome et des voies transcriptionnelles. Ainsi, la traduction pourrait être un mécanisme crucial régulant d'une part l'identité des cellules souches, et d'autre part

permettant la transition vers une identité cellulaire plus mature (Ingolia et al., 2011; Liu et al., 2016; Lu et al., 2009; Saba et al., 2021a) (**Figure 33**).

Chez la drosophile, les cellules souches germinales ont un taux de transcription d'ARNr plus élevé que leurs descendances différenciées. Dans ce système, la transcription des ARNr est contrôlée par un complexe régulateur de l'ARN polymérase I composé des facteurs TAF1B et TAF1C et UDD (Under-developed). Ce complexe est fortement exprimé dans les cellules souches germinales par rapport aux cellules différenciées et une altération de l'activité transcriptionnelle de la PolI entraîne la diminution des populations souches germinales, alors qu'une augmentation de son activité entraîne un maintien des populations germinales et retarde leur différenciation (Sanchez et al., 2016; Zhang et al., 2014). De même, dans le contexte de cellules souches embryonnaires humaines (hESCs), il a été mis en évidence qu'une diminution de la synthèse des ARN ribosomiques de l'ordre de 50% précédait leur spécification en lignage endodermique. Par ailleurs, une diminution de la transcription d'ARNr par traitement pharmacologique entraîne une diminution de l'expression de gènes de pluripotence tels que OCT4, Sox2 ou Nanog (Woolnough et al., 2016).

Cependant, l'impact du taux de synthèse d'ARNr sur le destin cellulaire semble être contexte dépendant. En effet, à l'inverse des hESCs et des cellules germinales de drosophiles, les cellules souches hématopoïétiques de souris mHSCs, ont une plus faible activité traductionnelle que des progéniteurs hématopoïétiques plus matures. Cette variation de l'activité traductionnelle, corrèle avec une modulation de la transcription d'ARNr. De façon intéressante, cette étude a révélé également que ces variations de transcription d'ARNr ne sont pas corrélées au taux de prolifération des cellules, puisque certaines sous-populations de progéniteurs comme les GMP (Granulocytes and macrophage progenitors), ayant le plus fort taux de prolifération des progéniteurs hématopoïétiques, ont pourtant, le plus faible niveau d'expression d'ARNr. A l'inverse, les progéniteurs MEPs (Megakaryocyte and erythrocyte progenitors), ont le plus faible taux de prolifération, mais ont le plus haut taux de synthèse d'ARNr. Ainsi la régulation de la biogenèse des ribosomes dans ce contexte bien spécifique serait médiée de façon type-cellulaire spécifique et ne corrèlerait pas avec les capacités prolifératives de ces dernières (Jarzebowski et al., 2018).

Par ailleurs, d'autres études mettent en évidence que des cellules souches embryonnaires, différenciées en corps embryoïdes (EB), présentent des caractéristiques structurales spécifiques d'une efficacité de traduction accrue. En effet, dans ces cellules, les appareils de golgi et les réticulums endoplasmiques rugueux sont plus abondants et le ratio cytoplasme/noyau est plus élevé que dans les ESCs dont ils sont issus. L'abondance de ces structures est directement corrélée à une augmentation de l'efficacité traductionnelle et la densité des polysomes (fraction de ribosomes en cours de traduction) est plus élevée de 60% dans les EBs par rapport au ESCs (Easley et al., 2010; Friend et al., 2015; Guzzi et al., 2018). A l'inverse dans les IPSs, une diminution de l'efficacité de la traduction causée par une altération de la voie mTOR, connue pour être au cœur de la biogenèse des ribosomes, favorise leur expansion et limite leur reprogrammation (He et al., 2012). De même, les cellules souches de l'épiderme murin ont une synthèse protéique plus faible que leur descendance plus mature (Blanco et al., 2016) (**Figure 33**).

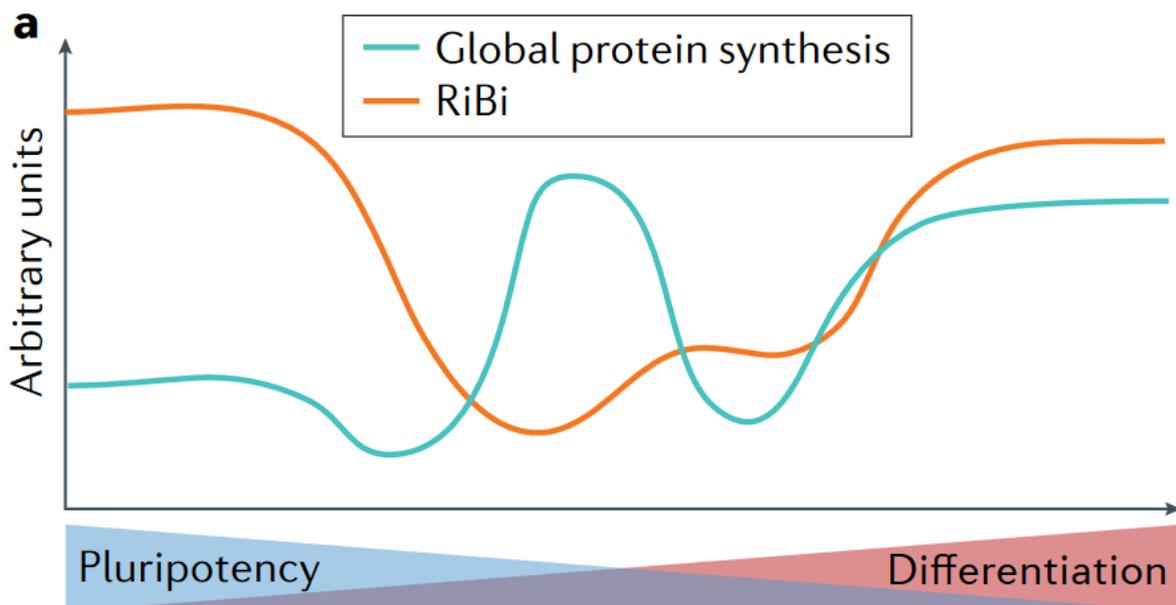


Figure 33. La biogenèse des ribosomes et la synthèse protéique sont dynamiques au cours de la maturation des cellules souches :

La biogenèse des ribosomes (RiBi) et la synthèse globale protéique sont dynamiques au cours de la maintenance à l'état prolifératif, lors de la maturation et la différenciation des cellules souches. La RiBi et la synthèse globale protéique ne corrèlent pas systématiquement (Saba et al., 2021a).

Dans le contexte des cellules souches neurales, il a été montré chez la souris, qu'une diminution de l'activité de mTORC1 ou une activation constitutive du répresseur traductionnel 4E-BP1 favorise un état d'auto-renouvellement des cellules souches neurales et inhibe leur différenciation, provoquant une diminution de la production neuronale (Hartman et al., 2013). Chez l'adulte, des sous-populations de cellules souches neurales ont été identifiées pour être en dormance en conditions physiologiques et sortent de cet état lors de dommages au cerveau. Ces cellules souches sont caractérisées par une expression combinatoire de facteurs de transcriptions spécifiques et lors de dommages au cerveau, ces cellules répriment les voies Notch et BMP et activent la transcription de gènes favorisant la différenciation neuronale, ces modifications sont concomitantes avec une augmentation du niveau de synthèse protéique (Llorens-Bobadilla et al., 2015).

De façon intéressante, une observation générale dans ces nombreux modèles est que les cellules post-mitotiques ont une diminution drastique de leur taux de traduction (Wang and Amoyel, 2022).

L'ensemble de ces études mettent en évidence que la dynamique globale de la traduction est régulée durant la maintenance des cellules souches, leur maturation et leur différenciation. Le taux de traduction est directement corrélé à la synthèse d'ARNr et suit un schéma particulier dans les cellules souches : lors de la maintenance de l'état prolifératif et lors de la maturation des progéniteurs, le taux de synthèse protéique est élevé. Lors de la différenciation post-mitotique le taux de traduction diminue. Ainsi la régulation du traductome dans de nombreux contextes biologiques jouerait un rôle dans la régulation de l'identité cellulaire et de nombreuses études se sont donc intéressées aux mécanismes régulant ce paramètre.

a) La voie mTOR, acteur majeur dans la régulation de la traduction

L'un des régulateurs majeurs de la traduction est la voie mTOR (mammalian Target of Rapamycin) (Albert and Hall, 2015; Ma and Blenis, 2009). Les principaux effecteurs de cette voie sont la protéine ribosomale S6K1 (S6 kinase 1) et le facteur 4E-BP (eIF4E-Binding Protéine) qui sont phosphorylés après l'activation de la voie mTOR (Saba et al., 2021a)(Figure 34).

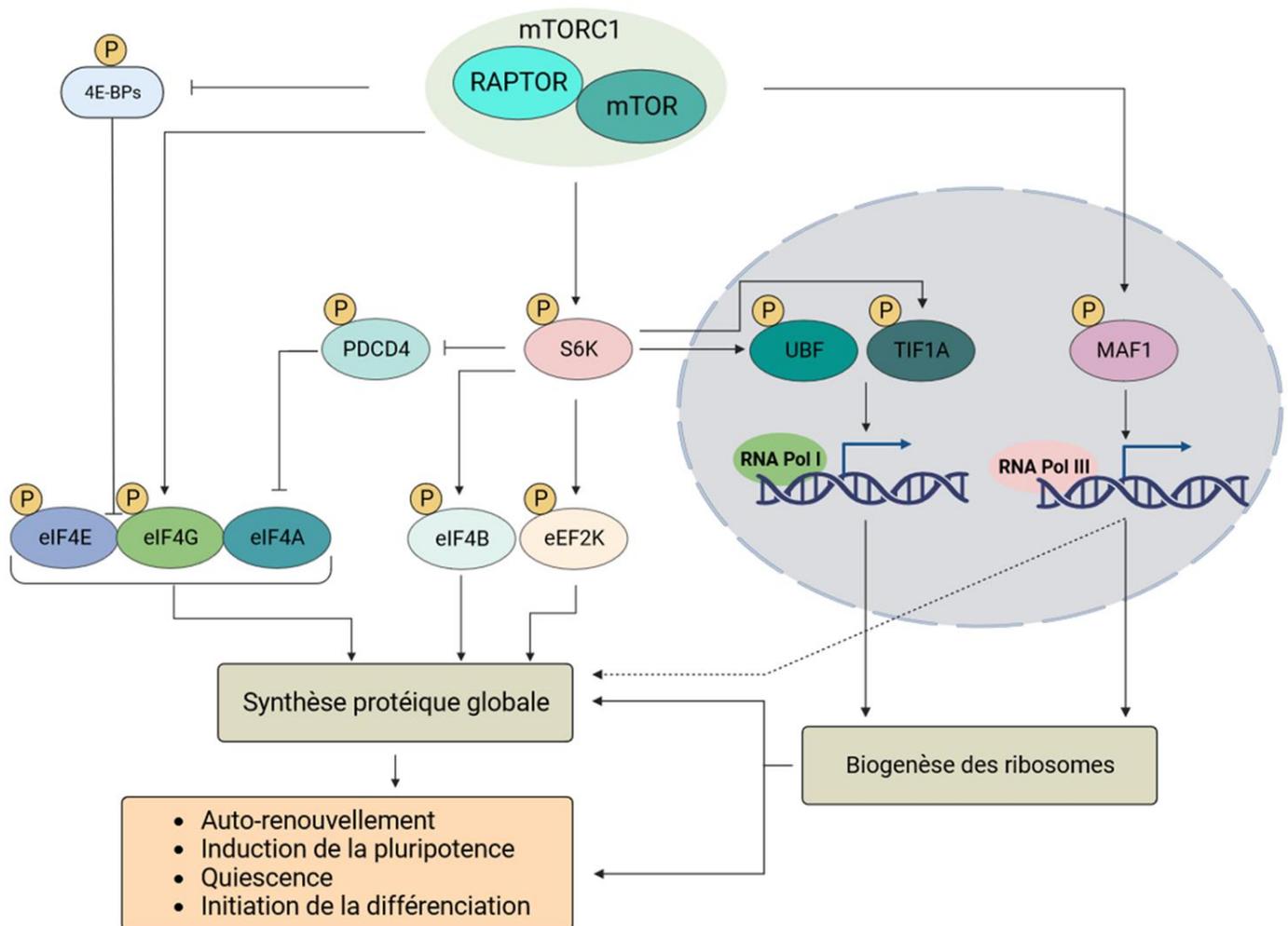


Figure 34. La voie mTOR au cœur de la régulation de nombreux processus :
Schéma adapté de (Saba et al., 2021a).

Lorsque la voie mTOR est inactive, 4E-BP séquestre un facteur d'initiation de la traduction eIF4E, empêchant son interaction avec la coiffe 5'UTR de l'ARNm et inhibant par conséquent l'initiation de la traduction. A l'inverse, lorsque la voie mTOR est active, 4E-BP est inhibé par phosphorylation libérant eIF4E, promouvant l'initiation de la traduction (Brunn et al., 1997; Gingras et al., 1999; Hara et al., 1997). La protéine S6K1 quant à elle, est activée par phosphorylation médiée par mTOR. S6K1 favorise l'activation de nombreuses protéines impliquées dans la traduction d'ARNm incluant eIF4B et RPS6, et l'inactivation de répresseurs

traductionnels tels que eEF2K (eukaryotic elongation factor-2 Kinase), PDCD4 (programmed cell death 4) et Larp1 (La ribonucleoprotein 1) (Fonseca et al., 2015; Hong et al., 2017; Wang et al., 2001).

Dans le contexte de la reprogrammation cellulaire, une diminution de l'activité de mTOR est concomitante avec une reprogrammation de cellules somatiques en cellules souches pluripotentes induites (iPSC). A l'inverse une hyperactivation de la voie mTOR, inhibe la reprogrammation des cellules somatiques en iPSCs (Wang et al., 2013). De plus, une activation de la voie mTOR ou d'un de ses effecteurs S6K promeut la différenciation des ESCs (Easley et al., 2010)

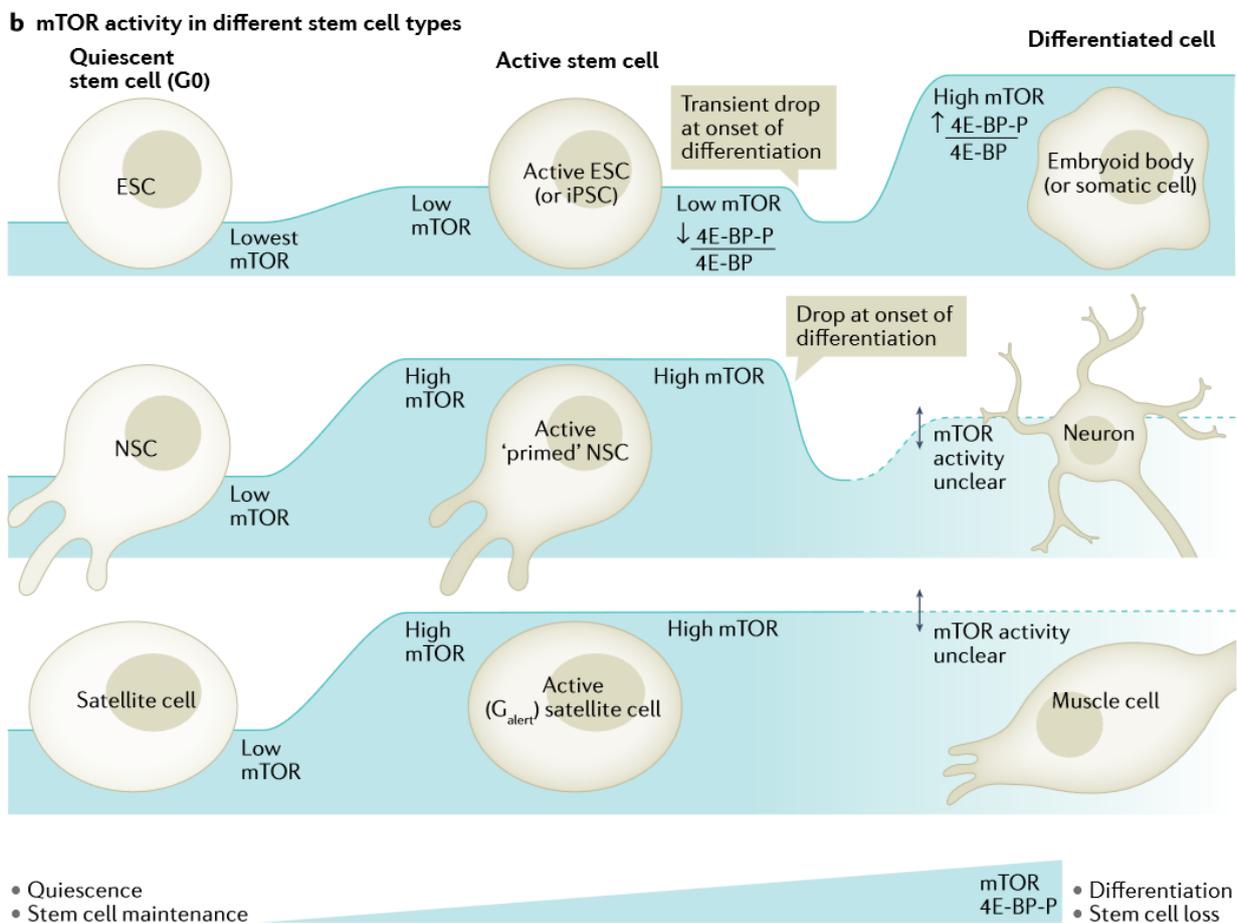


Figure 35. L'activité de la voie mTOR augmente pour favoriser la maturation et la différenciation de nombreux types cellulaires :

(Saba et al., 2021a)

De façon intéressante, une augmentation de l'activité de la voie mTOR a été caractérisée pour être suffisante à l'induction de la différenciation des cellules souches embryonnaires et adultes. Dans les cellules souches hématopoïétiques murines (mHCS), l'hyperactivation de la voie mTOR induit une augmentation de l'expression des inhibiteurs de CDK, p16^{Ink4a}, p19^{Arf}, et

p21^{Cip1} et ces modifications sont associées à une inhibition de l'auto-renouvellement des mHSCs (C. Chen et al., 2009). Toujours dans le contexte des HSC, une perte de fonction chez la souris de Pten, un régulateur négatif de la voie mTOR (Matsumoto et al., 2016), induit une augmentation du taux de traduction (Signer et al., 2014). Dans cette même étude, le phénotype est rétabli en générant une mutation du gène codant la protéine ribosomique RPL24 (membre de la grande sous-unité des ribosomes 60S), provoquant une diminution de la synthèse protéique et un rétablissement des propriétés d'auto-renouvellement des HSC (Signer et al., 2014). Dans cette même lignée, des travaux plus récents ont également identifié que 4E-BP1 et 4E-BP2, deux répresseurs traductionnels sont essentiels au maintien de l'auto-renouvellement des HSC (Signer et al., 2016) (**Figure 35**).

Dans les cellules souches de drosophiles, une hyperactivation de la voie TORC1, induit une différenciation précoce des GSCs (Sun et al., 2010). *In vitro*, sur des cellules souches neurales de télencéphales murins, une hyperactivation de la voie mTOR est associée à une diminution de l'auto-renouvellement et à une augmentation de la production neuronale et astrogliale (Magri et al., 2011).

Dans le cerveau, la voie mTOR a également été caractérisée pour jouer un rôle dans la régulation de la quiescence et de la différenciation des cellules souches neurales (NSC). Après la naissance et chez l'adulte, dans les cellules souches de la zone sous-ventriculaire (SVZ), l'activation de la voie mTOR par inhibition de son régulateur négatif TSC1, induit une augmentation de la production neuronale et une diminution de leurs propriétés d'auto-renouvellement (Hartman et al., 2013; Magri et al., 2011).

In vivo, l'activité de la voie mTOR est requise pour la maturation de ces cellules souches en progéniteurs et leur différenciation (**Figure 35**). De façon intéressante dans cette même étude, il a été mis en évidence que les deux effecteurs de la voie mTOR, à savoir 4E-BP et S6K1/S6K2 ont des fonctions distinctes dans ce contexte. La répression de 4E-BP en aval de l'activation de la voie mTOR induit une augmentation de la traduction coiffe-dépendante et cette modification est cruciale pour favoriser la différenciation des NSCs au dépend de leur auto-renouvellement. A l'inverse, la perte de fonction de S6K1/S6K2 en aval de la voie mTOR n'affecte pas la différenciation des NSCs, mais leur taille, indiquant que les fonctions de 4E-BP et S6K1/S6K2 sont distinctes au sein des NSCs (Hartman et al., 2013). Une autre étude, met en

évidence *in vivo*, qu'une hyperactivation de la voie mTOR dans le neuroépithélium du télencéphale dorsal de souris provoque l'apparition de mégalencéphalie et *in vitro*, l'activation de cette voie dans les NSCs, par déplétion de TSC1 provoque une dérégulation de leurs propriétés prolifératives et favorise leur maturation et leur différenciation (Magri et al., 2011).

En résumé, la voie mTOR, médiée par ses effecteurs 4E-BP et S6K, est dans de nombreux contextes cellulaires associée à l'engagement des cellules souches vers un destin de différenciation et une activation prolongée de cette voie diminue les propriétés d'auto-renouvellement des cellules souches.

Cependant, il est à noter que bien que le taux global de traduction soit directement corrélé à l'activité de la voie mTOR lors de l'induction de la différenciation des cellules souches neurales, ce n'est pas le cas dans tous les contextes cellulaires (Baser et al., 2019; Cloëtta et al., 2013; Paliouras et al., 2012). Dans le contexte des cellules souches hématopoïétiques et notamment dans les progéniteurs myéloïdes, mTOR est dégradé par le protéasome, pourtant le taux de traduction reste régulé par un effecteur de la voie mTOR, 4E-BP1 (Spevak et al., 2020). Dans ce cas de figure, il a été montré que CDK1 participe à la phosphorylation de 4E-BP1 et donc à son inhibition pour maintenir un taux élevé de traduction. Ainsi, l'activité de la voie mTOR ne corrèle pas systématiquement avec le taux de traduction, et d'autres régulateurs interviennent pour réguler cette machinerie.

b) Autres acteurs majeurs dans la régulation de la traduction des cellules souches

La voie MEK (Mitogen-Activated Protein Kinase), est une autre voie connue pour être impliquée dans la régulation de la traduction et participe à la régulation de processus cellulaires variés, telles que la croissance, la survie et la prolifération. La voie MEK active ERK (Extracellular signal-regulated kinase) et p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase). Ces kinases vont activer par phosphorylation MNK1/2 (MAPK-interacting kinases), qui activent à leur tour la traduction en se liant aux facteurs d'initiation eIF4F et eIF4E (Gabut et al., 2020).

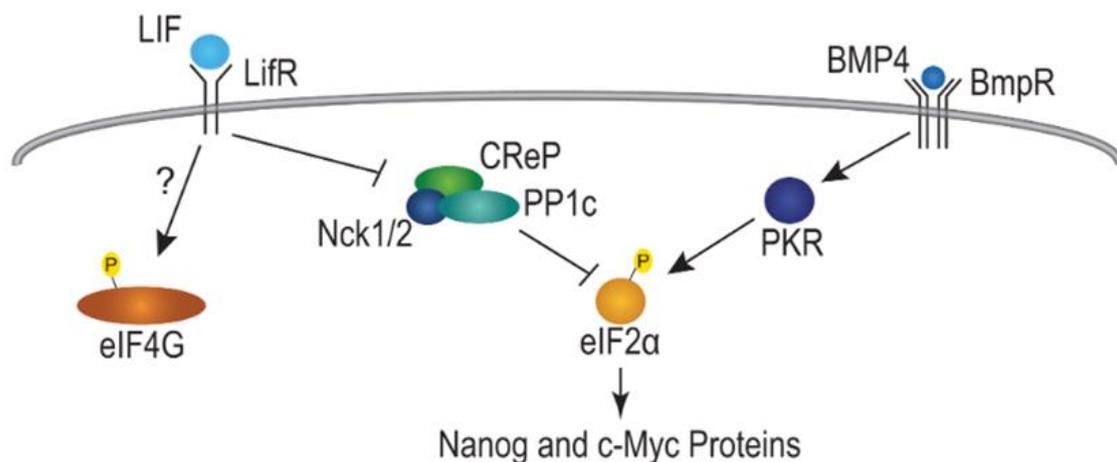


Figure 36. Phosphorylation de eIF2α et maintien de la pluripotence cellulaire :

La forme phosphorylée de eIF2α favorise la traduction de Nanog et de c-Myc deux protéines impliquées dans le maintien de la pluripotence cellulaire (Friend et al., 2015).

Par ailleurs, eIF2α, est un facteur d'initiation de la traduction, qui est hautement phosphorylé dans les cellules souches embryonnaires humaines et murines, alors que leurs descendances différenciées ont un faible niveau de eIF2α phosphorylée (Friend et al., 2015). L'état de phosphorylation de eIF2α est régulé par les voies LIF et BMP4, deux voies cruciales pour maintenir la pluripotence des cellules souches. D'une part, la voie LIF inhibe l'expression de la phosphatase CReP (Constitutive repressor of eIF2α phosphorylation) et d'autre part, BMP4 favorise l'action de la kinase PKR (protein kinase regulated by RNA). Ces deux voies agissent de façon synergique pour inhiber eIF2α par phosphorylation. De façon intéressante, la phosphorylation de eIF2α est associée à une diminution globale du taux de traduction cellulaire, mais cette forme favorise néanmoins la traduction d'ARNm spécifiques comme ATF4 (Asano, 2021). Ces ARNm contiennent des cadres de lectures ouverts en amont (uORF), et ces sites sont connus pour réguler la stabilité des ARNm et limiter leur traduction. Mais dans certains contextes, comme on vient de le voir avec ATF4, les sites uORF permettent la

traduction de ces ARNm par la forme phosphorylée de eIF2 α . De façon intéressante, des gènes comme *NANOG* ou *C-MYC*, connus pour maintenir la pluripotence des cellules souches sont aussi connus pour avoir des sites uORF sur leurs ARNm respectifs (Ingolia et al., 2011) . Cependant, les liens directs entre la forme phosphorylée ou non phosphorylée de eIF2 α et la différenciation des cellules souches ne sont pas encore bien établis (**Figure 36**).

Un autre acteur a été décrit pour moduler la biogenèse des ribosomes et la traduction (Kasteri et al., 2018). Il s'agit du suppresseur de tumeur p53, qui est majoritairement connu chez les mammifères pour promouvoir la transcription de gènes antiprolifératifs et pro-apoptotiques (Kasthuber and Lowe, 2017). Mais il est également connu et bien caractérisé, que p53 restreint la biogenèse des ribosomes, en réprimant l'activité transcriptionnelle de la PolII. Cette répression est médiée par une inhibition de l'interaction du complexe SL1 et du facteur UBF, des composants essentiels de la machinerie transcriptionnelle des ARNr, dont je reparlerai dans la partie suivante (Budde and Grummt, 1999; Zhai and Comai, 2000). La protéine p53 joue aussi un rôle dans l'inhibition de la synthèse globale protéique, en régulant des effecteurs de la voie mTOR, via l'inactivation de S6K et l'activation de 4E-BP1 (Horton et al., 2002). De façon intéressante, il a été mis en évidence *in vitro*, qu'une répression transcriptionnelle de *c-Myc* médiée par p53 est requise pour induire l'arrêt des cellules en G1 du cycle cellulaire et leur différenciation (Ho et al., 2005) Mais ces fonctions dans la régulation du destin cellulaire seraient contexte dépendant (Gonzales et al., 2015; Liu et al., 2016). En effet, il a été montré dans le contexte des cellules souches humaines, que l'induction du point de contrôle de dommage à l'ADN, induit une stabilisation de p53 qui va réguler l'expression des gènes cibles de la voie des TGF- β connue pour maintenir la pluripotence (Gonzales et al., 2015). Il est intéressant de mentionner également que certaines protéines ribosomiques, notamment la particule 5S, sont elles-mêmes capables de réguler la stabilisation et les fonctions de p53, afin de promouvoir la sortie du cycle cellulaire lorsque celles-ci subissent un stress (Hannan et al., 2022)

3. CYCLE CELLULAIRE ET TRADUCTION : DEUX MACHINERIES ETROITEMENT LIEES

a) Régulation oscillatoire de la biogenèse des ribosomes au cours du cycle cellulaire

Chez les mammifères, la transcription des ARNr oscille durant les phases du cycle cellulaire. Leur transcription est maximale durant les phases S et G2 et diminue drastiquement dès la mitose, pour reprendre lentement au cours de la phase G1. Comme mentionné ci-dessus la synthèse des ARNr dépend de l'ARN polymérase I. Cette dernière est régulée par deux facteurs : le facteur de transcription UBF (Upstream binding factor) et le complexe SL1 (Selective Factor 1) composé de TAF1A, TAF1B et TAF1C. Ces deux facteurs, se lient aux promoteurs des gènes des ARNr et agissent de façon synergique pour recruter et activer l'ARN polymérase I. Lors de la mitose, TAF1C est phosphorylé sur sa Thréonine 852 par le complexe Cycline B/CDK1 inhibant l'interaction de UBF et de SL1 et donc l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase I (Heix et al., 1998; Kuhn et al., 1998). Cependant, les mécanismes levant l'inhibition de l'activité de la Pol I ne sont pas bien caractérisés. Une hypothèse serait que durant la phase G1, la Pol I serait réactivée par une phosphatase CDC14B. Cette dernière serait séquestrée dans le nucléole durant la majorité du cycle cellulaire, mais serait libérée dans le noyau et le cytoplasme dès la sortie de la mitose (Mailand et al., 2002). Durant la phase G1, la synthèse d'ARNr reste faible et son niveau dépend de l'état de phosphorylation de facteur UBF. Durant la phase G1 le facteur UBF est graduellement phosphorylé par les complexes Cyclines D1/CDK4 et par les complexes Cycline E/CDK2 et Cycline A/CDK2 au niveau de sa Serine 484 (Voit et al., 1999; Voit and Grummt, 2001). Plus récemment, il a été mis en évidence que la progression dans le cycle cellulaire et notamment l'initiation de la mitose, requiert une régulation fine de la synthèse protéique (Lockhead et al., 2020).

Ces études mettent en évidence que la régulation des facteurs UBF et SL1 est médiée par des complexes Cyclines/CDK spécifiques et de façon cycle cellulaire dépendante. Il existe donc un lien étroit entre régulation de la progression du cycle cellulaire et la biogenèse des ribosomes et ces processus sont critiques pour coordonner les mécanismes à l'origine de l'homéostasie et du destin cellulaire.

b) Acteurs du cycle cellulaire et régulation de la traduction

De façon intéressante, un acteur du cycle cellulaire a également été décrit pour jouer un rôle direct dans la régulation de la synthèse protéique, il s'agit de CDK1 (**Figure 37**).

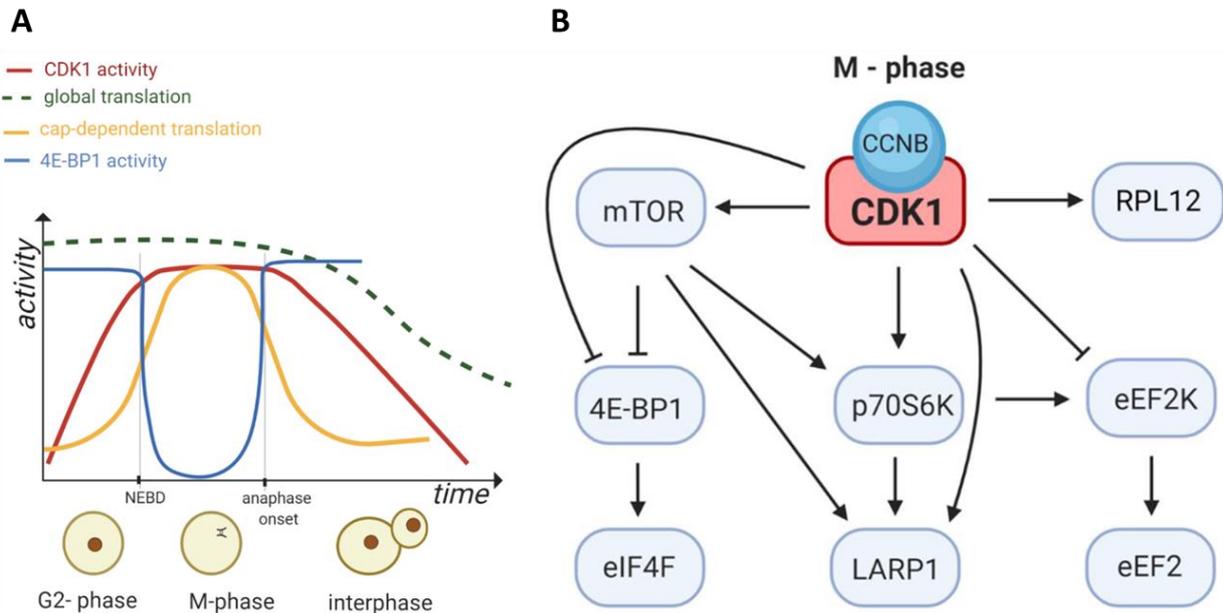


Figure 37. CDK1 un régulateur de la machinerie traductionnelle :

(A) Lors de la transition G2/M, CDK1 régule la traduction coiffe-dépendante (B) en régulant l'activité de régulateurs positifs et négatifs de la traduction (Haneke et al., 2020)

DENR et MCTS1 sont deux oncogènes qui forment un complexe et favorisent la traduction d'ARNm contenant des uORF. DENR (Density Regulated Re-Initiation And Release Factor) est une protéine impliquée dans l'initiation de la traduction, en promouvant le recrutement d'ARNt au niveau du site P de la sous-unité 40S. MCTS1 (MCTS1 Re-Initiation And Release Factor) est également connu pour être un régulateur positif de la traduction en favorisant le recrutement de DENR et en se liant à la coiffe 5'UTR des ARNm. Il a été montré *in vitro*, que DENR est phosphorylé sur sa Sérine 73 par les complexes Cycline B/CDK1 et Cycline A/CDK2 lors de l'initiation de la mitose, puis est déphosphorylé à la fin de la mitose. Cette phosphorylation stabilise DENR lors de la mitose et empêche son clivage médié par Asp26. Pendant cette étape de stabilisation, DENR va induire la traduction d'ARNm impliqués dans la mitose et parmi l'ensemble de ces ARNm 40% sont des cibles directes de cette protéine. La perte de stabilisation de DENR lors de la mitose, induit un phénomène de catastrophes mitotiques et la mort des cellules par apoptose (Clemm von Hohenberg et al., 2022). Plus intéressant encore, CDK1 a été identifié comme régulateur positif de la traduction en régulant

de nombreux facteurs de la traduction mentionnés ci-dessus, comme eIF2 α , 4E-BP, et S6K1 (**Figure 37**). Cette régulation semble être indépendante de l'action de la voie mTOR. De plus, il a été déterminé dans cette étude, que CDK1 exerce un effet particulièrement fort sur la traduction d'ARNm possédants des motifs 5'TOP (terminal oligopyrimidine) dont la majorité codent pour des protéines ribosomiques et plusieurs facteurs de régulation de la traduction. A l'inverse, une perte de fonction de CDK1 induit une diminution globale de la traduction de l'ordre de 40% (Haneke et al., 2020).

De plus, il a été documenté que CDK1 régule l'assemblage des protéines ribosomiques. Durant la phase G2/M, CDK1 phosphoryle la protéine RPS3 (membre de la petite sous-unité des ribosomes 40S), connue pour être un régulateur de la traduction, de la réparation de l'ADN et l'apoptose. La phosphorylation de RPS3 médiée par CDK1 est essentielle pour stabiliser sa localisation et son accumulation aux noyaux (Kalous et al., 2020; Yoon et al., 2011). Il a également été documenté que CDK1 co-sédimente avec les fractions de polysomes et que cette protéine est associée aux ribosomes (Kalous et al., 2020). Par ailleurs, RPL12 est connue pour être un substrat de CDK1 et sa phosphorylation permet la régulation de la traduction d'ARNm spécifiques au cours de la mitose (Imami et al., 2018).

Ainsi CDK1, par son activité kinase, régule à différents niveaux la machinerie traductionnelle, que ce soit à l'échelle de la biogenèse des ribosomes, en favorisant l'activation de l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase 1, en régulant directement la machinerie traductionnelle en modulant l'activité de régulateurs positifs et négatifs de la traduction, ou la localisation cellulaire de protéines ribosomiques.

De plus, CDK1 étant le substrat direct de CDC25B, il est intéressant d'évoquer également une autre étude qui a mis en évidence que CDC25B joue un rôle de régulateur positif de la voie mTOR dans un contexte tumoral et que son inhibition améliore la réponse à des traitements anti-cancéreux. En effet, l'inhibition de l'activité phosphatase de CDC25B par phosphorylation au niveau du site Serine 375, est essentielle pour dépléter l'activité des voies de survie/oncogéniques médiées par AKT, eIF4E et p38 (Brenner et al., 2014; R. Chen et al., 2009).

Ainsi, la machinerie du cycle cellulaire et traductionnelle sont de plus en plus caractérisées pour être au cœur de la régulation de l'identité cellulaire, en modulant l'équilibre entre état prolifératif et différenciatif des cellules souches.

4. HETEROGENEITE DES RIBOSOMES AU COURS DU DEVELOPPEMENT

a) Concept de ribosomes spécialisés

Au début de ce chapitre, nous avons évoqué l'importance de la modulation de la biogenèse des ribosomes, de la machinerie traductionnelle, et du taux de synthèse global protéique dans la régulation de l'identité des cellules souches embryonnaires et adultes. Cependant, depuis un certain nombre d'années, la notion d'hétérogénéité des ribosomes et de ribosomes spécialisés est de plus en plus mentionnée (Bastide and David, 2018a; Genuth and Barna, 2018; Norris et al., 2021), et je vais en discuter dans cette partie.

La théorie des ribosomes spécialisés est apparue dans les années 50 lorsque des ribosomes de différentes tailles et de différentes formes ont été identifiés (Roberts, 1958). Mais cette théorie a pendant de nombreuses années été débattue jusqu'au début de 21^{ème} siècle et de nombreux modèles se sont succédés pour confirmer que cette hétérogénéité de taille et de forme des ribosomes est le reflet d'une activité spécialisée. Parmi les modèles proposés, on peut mentionner l'hypothèse des ribosomes filtres, et du code des ribosomes. Le premier modèle suggère que les sous-unités de ribosomes agiraient comme un filtre en permettant ou non, l'interaction de certains ARNm avec la machinerie traductionnelle. Une forte interaction entre les sous-unités des ribosomes et l'ARNm, serait à l'origine d'une séquestration de ce dernier et l'inhibition de sa traduction. A l'inverse une faible interaction favoriserait le recrutement de la machinerie traductionnelle. La force de cette interaction serait dépendante de la complémentarité entre les séquences des ARNm et des ARNr (Mauro and Edelman, 2002; Mauro and Matsuda, 2015). Plus tard, un autre modèle a suggéré que les ribosomes, comme les histones, auraient un code qui déterminerait leur état « actif » ou « inactif » (Komili et al., 2007).

Mais ce n'est qu'en 2011 que le concept de « ribosomes spécialisés » est réellement défini. Comme mentionné ci-dessus, les ribosomes sont composés des sous-unités 40S et 60S qui lors de leur synthèse subissent des étapes d'assemblages et de maturations. Ces étapes pourraient donner naissance à des ribosomes spécialisés composés d'ARNr et/ou de protéines ribosomiques spécifiques à l'origine de la production de ribosomes dits « spécialisés » capables de traduire des ARNm spécifiques (Norris et al., 2021).

Différents processus ont été décrits dans de nombreux modèles pour expliquer la génération de ribosomes hétérogènes. Ces modifications peuvent provenir de la substitution, de différences de stœchiométrie ou de modifications post-transcriptionnelles des protéines ribosomiques mais également de variations ou modifications des ARNr (Carroll et al., 2008; Kearse et al., 2011; Kondrashov et al., 2011; Locati et al., 2017; Natchiar et al., 2017; Shi et al., 2017; Simsek et al., 2017). L'ensemble de ces modifications serait à l'origine de la formation de ribosomes fonctionnellement spécialisés (**Figure 38**).

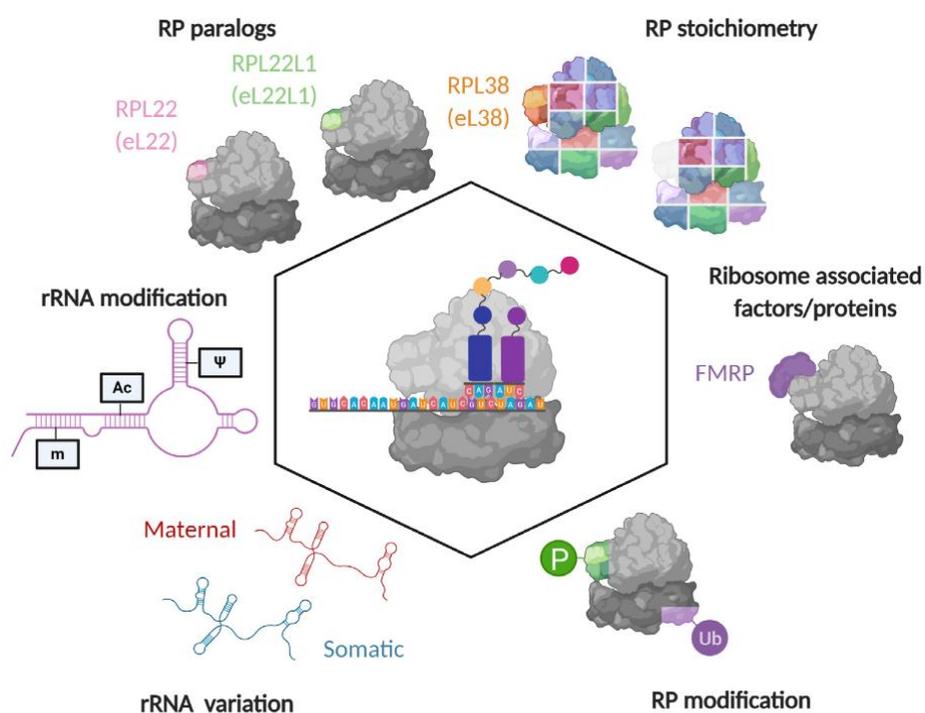


Figure 38. Hétérogénéité des ribosomes :

Schéma illustrant les six paramètres qui peuvent être à l'origine de ribosomes spécialisés (Norris et al., 2021)

b) Ribosomes spécialisés

Par ailleurs, deux facteurs corroborent cette notion de « ribosomes spécialisés ». Le premier étant qu'on retrouve des protéines ribosomiques tissus spécifiques et le deuxième étant que la perte de fonctions de protéines ribosomiques spécifiques est associée à des phénotypes distincts (Dinman, 2016). Ces facteurs joueraient un rôle crucial au cours du développement embryonnaire et participeraient à la génération de tissus spécifiques.

(1) PROTEINES RIBOSOMIQUES TISSUES SPECIFIQUES

Concernant le premier facteur, près d'un quart des protéines ribosomiques sont estimées pour être tissus spécifiques. Parmi ces gènes on retrouve des paralogues des protéines ribosomiques fortement exprimés dans certains tissus, c'est le cas de eL22L1/RPL22L1 (foie), eL42L/RPL36A (foie et intestin grêle), eS27L/RPS27 (Intestin grêle, glandes salivaires, reins) uL3L/RPL3L (Cœur et le muscle squelettique) (Miller et al., 2023). Une autre étude, réalisée chez la souris, montre que RPL39L (un paralogue de RPL39) est assemblé spécifiquement dans les ribosomes des cellules germinales murines. La perte de fonction de RPL39L altère la formation des spermatozoïdes et par conséquent la fertilité des individus. Cette étude confirme également que ces ribosomes spécifiques, contenant RPL39L, régulent co-traductionnellement une sous-famille de protéines essentielles à la formation des spermatozoïdes (Li et al., 2022).

(2) PROTEINES RIBOSOMIQUES PHENOTYPES SPECIFIQUES

D'autre part, il a été mis en évidence dans la littérature, que la perte de fonction de certaines protéines ribosomiques est associée à un phénotype spécifique. Chez la drosophile par exemple, le phénotype *Minute*, caractérisé par des soies thoraciques courtes et fines (décrit et publié par Calvin Bridges en 1923), est causé par la mutation de gènes codant des protéines ribosomiques spécifiques comme *RPS5A/uS7A*, *RPL38/eL38* et *RPS10B/eS10B* (Kongsuwan et al., 1985; Marygold et al., 2007).

Chez la souris, la perte de fonction de RPL38, induit une altération de la spécification neurale. (Kondrashov et al., 2011). Chez l'humain, l'anémie de Diamond-Blackfan, est une anémie rare qui est décelée dès la naissance. D'un point de vue clinique, cette pathologie est caractérisée par anémie macrocytaire et est associée à des malformations congénitales dans la zone crâniofaciale et au niveau des pouces (3 phalanges aux lieux de 2) et les patients sont caractérisés par une petite taille. Cette pathologie est causée par l'altération de nombreuses protéines ribosomiques *RPS19*, *RPS24*, *RPS17*, *RPL35A*, *RPL5*, *RPL11*, *RPS7*, *RPL36*, *RPS15* et *RPS27A* (Narla and Ebert, 2010). L'anémie de Diamond-Blackfan est une pathologie qui touche principalement la moelle osseuse, mais comme mentionné ci-dessus, les patients présentent également des malformations congénitales assez régionalisées (crâne et pouces). Ainsi, ces phénotypes tissus-spécifiques suggèrent que ces tissus sont plus sensibles à une altération de certaines protéines ribosomiques étayant encore une fois la théorie des ribosomes spécifiques.

Néanmoins, cette théorie est débattue. En effet, la simple modification de la quantité de ribosomes disponibles pourrait être suffisante pour expliquer une modification du taux de traduction de certains ARNm tissus spécifiques. Ces derniers ayant des sites d'initiation plus complexes sont donc moins enclins à être traduits quand la quantité de ribosomes est altérée. Ceci expliquerait l'hétérogénéité des phénotypes tissus-spécifiques observée chez les patients atteints de ribosomopathies (Hetman and Slomnicki, 2019; Mills and Green, 2017) (**Figure 39**).

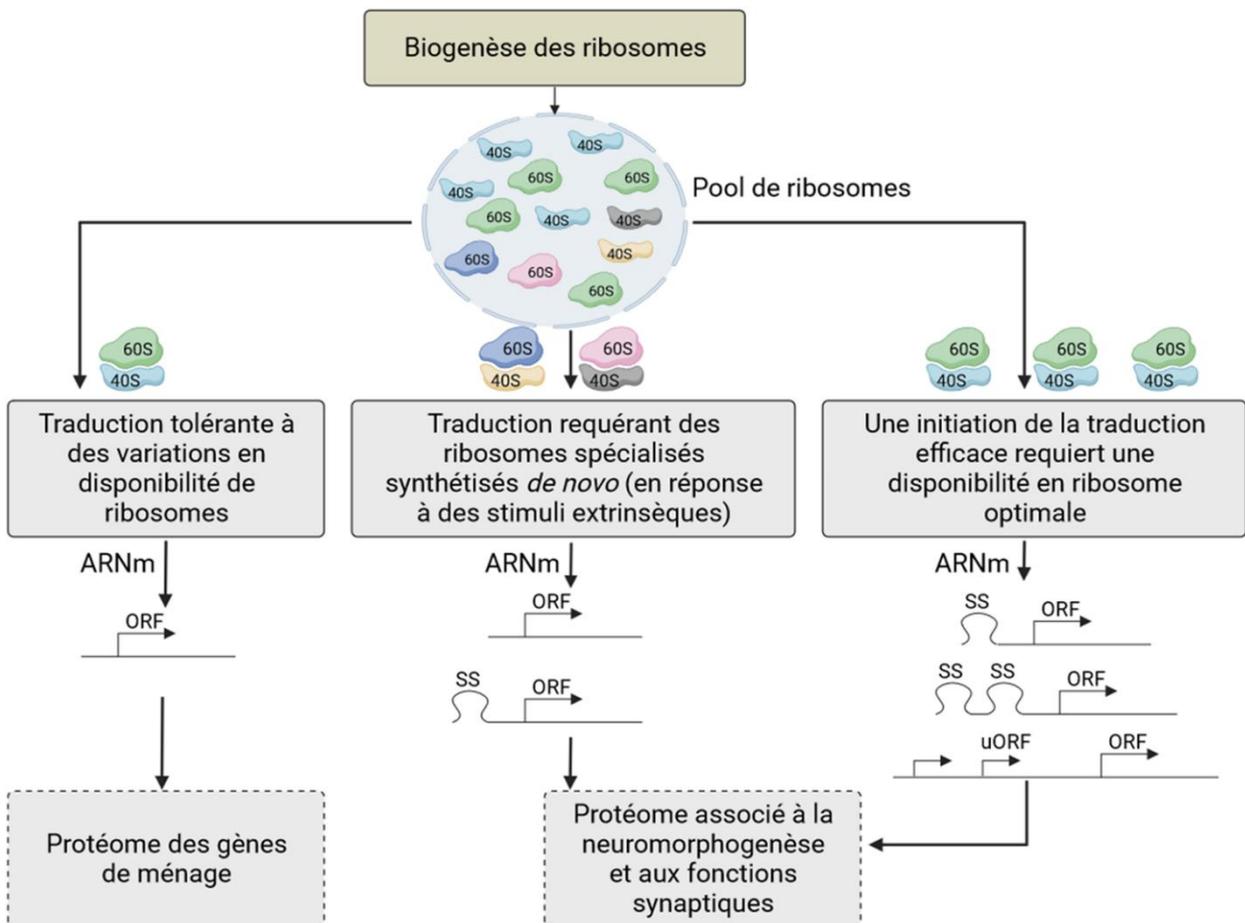


Figure 39. La disponibilité en ribosomes, un prérequis pour la traduction de certains ARNm :

Hypothèses de la disponibilité ribosomique dans la régulation de la traduction de divers ARNm. Certains ARNm sont peu sensibles à une variation de la quantité de ribosomes (gauche). A l'inverse, certains ARNm contenant des structures secondaires (SS) au niveau de la coiffe 5'UTR ou un site uORF quant à eux nécessitent une disponibilité optimale en ribosomes (droite). Enfin, d'autres ARNm peuvent être traduits par des ribosomes spécifiques (milieu). Schéma adapté de (Hetman and Slomnicki, 2019).

c) *Traduction d'ARNm spécifiques*

La notion de ribosomes tissus et phénotypes spécifiques suggère comme mentionné pour RPL38 que certains ARNm pourraient être régulés de façon ribosome-spécifique. Il a été mis en évidence *in vitro*, dans le contexte des cellules souches embryonnaires murines mESC qu'il existait une hétérogénéité dans la composition en RP des ribosomes (Shi et al., 2017). En effet, il a été mis en évidence, que certaines RP étaient effectivement enrichies (RPL10/uL16, RPL38/eL38, RPL40/eL40 et RPS26/ eS26) ou au contraire plus pauvres (RPL10A/uL1, RPS7/eS7 et RPS25/eS25) dans les ribosomes composant la fraction des polysomes par rapport aux ribosomes libres (Shi et al., 2017). Dans cette même étude, il a été montré que la composition des ribosomes est déterminante pour la traduction d'ARNm spécifiques. Par exemple les ribosomes enrichis en RPS25/eS25 favoriseraient préférentiellement la traduction de gènes impliqués dans le cycle cellulaire.

Au-delà de la composition des ribosomes en RP d'autres éléments ont été décrits pour participer à la traduction d'ARNm spécifiques. Parmi ces éléments on retrouve les protéines associées aux ribosomes (RAP) et l'interaction entre ARNr, ARMm et ARNt (Bastide and David, 2018b; Simsek et al., 2017).

d) *Ribosomes/traduction et neurogenèse*

Mais qu'en est-il de l'implication de la biogenèse des ribosomes et de la traduction dans un contexte de neurogenèse ?

Dans le tube neural murin, il a été mis en évidence que l'expression de RPL38 est exclusive à certains tissus, comme l'œil, la région crâniale, les somites et également le tube neural des embryons. Une altération de RPL38 sur des souris mutantes, cause des défauts développementaux de ces différents tissus. De plus, la perte de fonction de cette protéine, bien que n'étant pas associée à une altération de la différenciation des motoneurones, entraîne une diminution du nombre d'une sous-population spécifique de motoneurones Pea3+. RPL38 dans ces tissus, favoriserait la traduction d'ARNm spécifiques de gènes Hox, en facilitant le recrutement du complexe 80S sur les sites d'initiations de la traduction (Kondrashov et al., 2011). Une autre étude récente a mis en évidence dans le tube neural, qu'une augmentation de la biogenèse des ribosomes est concomitante avec une initiation de

la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules des crêtes neurales et a lieu lors de la sortie du cycle cellulaire (Prakash et al., 2019).

Le contrôle de la traduction est également crucial pour le développement du cerveau. Dans le prosencéphale murin, il a été mis en évidence qu'une diminution drastique de gènes impliqués dans la synthèse protéique avait lieu à E10,5 par rapport à un stade plus précoce (E8,5). Cette modification du transcriptome est concomitante avec une diminution de la biogenèse des ribosomes et de la synthèse protéique (Chau et al., 2018). Une étude récente a également montré que la biogenèse des ribosomes et la traduction étaient dynamiques au cours de la neurogenèse. En effet, il a été mis en évidence que la synthèse protéique est variable et contrôle l'expression génique de façon ordonnée pour réguler la spécification neuronale durant les phases de neurogenèse intermédiaire. Dans cette étude, il a été mis en évidence que durant les phases précoces, à E12,5, la différenciation des neurones est accompagnée d'une augmentation drastique du nombre de ribosomes, cependant, à E15,5 le nombre de ribosomes diminue drastiquement en dehors de la niche des cellules souches (en VZ et SVZ). Cette diminution drastique de biogenèse des ribosomes à E15,5 coïncide avec un changement de l'activité de 4EB-P1, un inhibiteur direct de la biogenèse des ribosomes, qui contrôle la neurogenèse des lignées *Satb2*. Ainsi, des changements de la traduction globale ont lieu lors des différentes étapes de neurogenèse au cours du développement cortical (Harnett et al., 2022).

Le contrôle traductionnel d'ARNm spécifiques est également crucial pour réguler la spécification cellulaire au cours du développement embryonnaire. *In vivo* il a été montré que *Ptch1*, répresseur de la voie Shh, possède sur son ARNm un domaine uORF à l'origine de sa répression traductionnelle. Il a été mis en évidence qu'une déplétion de ce domaine uORF, favorise une augmentation de la traduction de *Patch1* et provoque une diminution de l'expression de gènes cibles de Shh (*Foxa2*, *Nkx2,2* et *Olig2*) et donc une altération de la différenciation neuronale (Fujii et al., 2017). Ainsi, la régulation traductionnelle, à la fois spatiale et temporelle, de régulateurs de voies majeures et redondantes dans la formation de différents tissus est essentielle pour déterminer le destin cellulaire.

e) Conclusion chapitre 3 :

Au cours de ce chapitre, nous aurons vu que la machinerie traductionnelle joue un rôle majeur dans la régulation du destin cellulaire. Cette régulation est médiée à l'échelle de la traduction globale, puisque des variations du taux de traduction cellulaire influencent l'auto-renouvellement ou la différenciation cellulaire. Nous avons également vu que la biogenèse des ribosomes et la progression dans le cycle cellulaire sont étroitement corrélées. Tout comme les acteurs de la machinerie du cycle cellulaire, la biogenèse des ribosomes est cyclique et oscillatoire et est modulée par des acteurs du cycle cellulaire, comme CDK1 notamment ou CDK2. Par la suite, nous avons vu que la régulation de l'équilibre prolifération/différenciation des cellules souches/progéniteurs pouvait être médiée par des ribosomes spécialisés. Enfin dans le contexte de la neurogenèse, la biogenèse des ribosomes, la traduction et la régulation traductionnelle d'ARNm, sont dynamiques à la fois spatialement et temporellement et participent à de nombreux processus, comme la spécification et la différenciation cellulaire.

VII. OBJECTIFS DE THESE

CARACTERISER L'IMPORTANCE DE LA DYNAMIQUE DE LA PHASE G2 ET IDENTIFIER LES EVENEMENTS MOLECULAIRES ET PROCESSUS BIOLOGIQUES MIS EN PLACE EN AVAL DE CDC25B AU COURS DE LA NEUROGENESE PRECOCE

Les données de l'équipe suggèrent que CDC25B en modifiant la dynamique du cycle cellulaire, favorise la mise en place de mécanismes moléculaires et des voies de signalisation qui restreignent de plus en plus, à chaque cycle cellulaire, les progéniteurs neuraux vers un destin neurogénique. Une partie de cette fonction est également indépendante de son interaction avec son substrat CDK1 et de la modification de la durée des phases du cycle.

Si l'importance de la durée de la phase G1 dans ces processus a été bien documentée, il existe peu d'éléments quant à l'importance de la durée de la phase G2 dans l'équilibre prolifération/différentiation. L'équipe vient de montrer que dans le cortex en développement, CDC25B contrôle la neurogenèse via un raccourcissement de la durée de la phase G2. Qu'en est-il de la moelle épinière ? Ce projet de thèse s'ancre à la suite des travaux de l'équipe, réalisés par Mélanie Roussat (Roussat et al., 2023) et auxquels j'ai eu l'opportunité de collaborer (Cf. partie Annexe).

Le premier objectif de ma thèse était de déterminer l'importance de la durée de la phase G2 dans le choix du destin des progéniteurs spinaux.

Comment un acteur positif du cycle cellulaire, peut-il influencer le choix du destin des progéniteurs ? CDC25B via son activité phosphatase pourrait réguler des voies de signalisation ou des facteurs de transcription importants pour le switch prolifération/différentiation. Modifier la longueur d'une phase du cycle pourrait permettre à ces mêmes voies de signalisation et facteurs d'agir plus ou moins longtemps dans les cellules, influençant ainsi le destin de leurs cellules filles. Pour essayer de répondre à ces questions, **le deuxième objectif de ma thèse était d'identifier les mécanismes moléculaires recrutés en aval de CDC25B dans le système nerveux en développement.**

Ayant identifié que le processus biologique le plus modifié en aval de CDC25B est la traduction (partie résultats 2), **le troisième objectif de ma thèse était d'analyser les liens entre CDC25B et la biogénèse des ribosomes.**

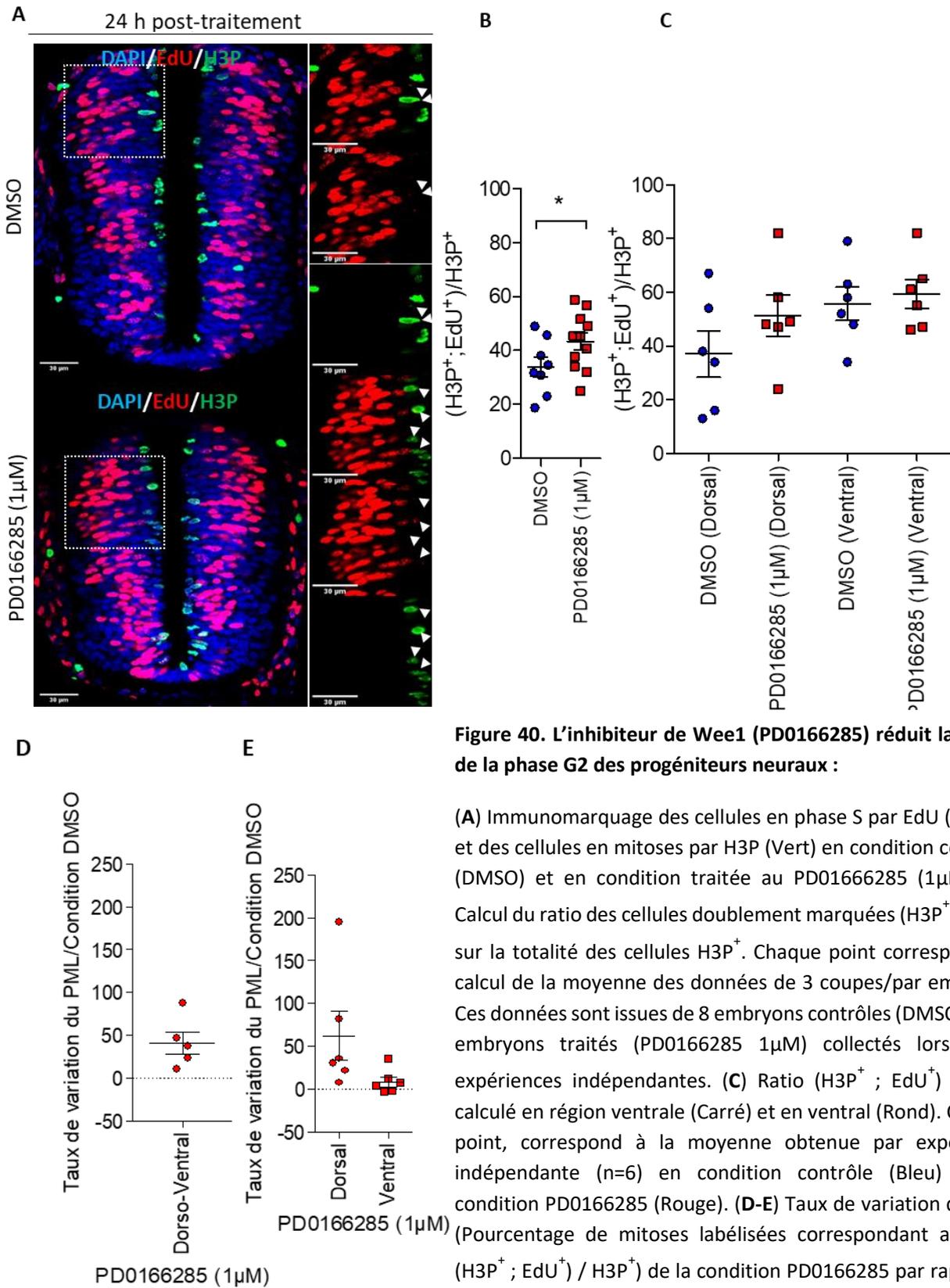


Figure 40. L'inhibiteur de Wee1 (PD0166285) réduit la durée de la phase G2 des progéniteurs neuraxiaux :

(A) Immunomarquage des cellules en phase S par EdU (Rouge) et des cellules en mitoses par H3P (Vert) en condition contrôle (DMSO) et en condition traitée au PD0166285 (1µM). (B) Calcul du ratio des cellules doublement marquées (H3P⁺ ; EdU⁺) sur la totalité des cellules H3P⁺. Chaque point correspond au calcul de la moyenne des données de 3 coupes/par embryon. Ces données sont issues de 8 embryons contrôles (DMSO) et 12 embryons traités (PD0166285 1µM) collectés lors de 4 expériences indépendantes. (C) Ratio (H3P⁺ ; EdU⁺) / H3P⁺ calculé en région ventrale (Carré) et en ventral (Rond). Chaque point, correspond à la moyenne obtenue par expérience indépendante (n=6) en condition contrôle (Bleu) et en condition PD0166285 (Rouge). (D-E) Taux de variation du PML (Pourcentage de mitoses labélisées correspondant au ratio (H3P⁺ ; EdU⁺) / H3P⁺) de la condition PD0166285 par rapport à la condition contrôle.

VIII. RESULTATS

A. **PARTIE 1** : LA DIMINUTION DE LA DUREE DE LA PHASE G2 EST SUFFISANTE POUR MIMER PARTIELLEMENT L'EFFET NEUROGENIQUE DE CDC25B

a) L'inhibiteur PD0166285 diminue spécifiquement la durée de la phase G2

La phosphatase CDC25B étant un régulateur positif du cycle cellulaire et notamment de la transition G2/M, nous voulions dans un premier temps déterminer si la modification de la durée de la phase G2 est suffisante pour moduler le destin des progéniteurs neuraux du tube neural.

Pour répondre à cette question nous avons opté pour l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique, le PD0166285. Cette molécule est un inhibiteur pharmacologique de Wee1 et Myt1 deux protéines kinases inactivant CDK1 par phosphorylation. Le complexe CDK1/Cycline B étant activé par CDC25B pour favoriser la transition G2/M, *via* la déphosphorylation de CDK1, une inhibition de Wee1 et Myt1, permet donc de favoriser la transition G2/M indépendamment de CDC25B.

L'objectif dans un premier temps était de déterminer si cet inhibiteur pharmacologique modifie spécifiquement la durée de la phase G2. Pour ces expériences, nous avons procédé à une injection *in ovo* dans le tube neural de poulet (HH13-14) de PD0166285 [1µM] et nous avons quantifié différents paramètres du cycle cellulaire 24h post-injection (HH17).

Dans un premier temps, nous avons évalué l'impact de cet inhibiteur pharmacologique sur la durée de la phase G2 des CPNs le long de l'axe dorso-ventral (**Figure 40**). Nous avons donc réalisé une incorporation d'EdU 90 minutes préfixation et quantifié le ratio (H3P⁺ ; EdU⁺) /H3P⁺. Ce ratio aussi appelé PML (pourcentage de mitoses labélisées) représente la proportion des cellules ayant été en phase S au début d'incorporation d'EdU et qui ont atteint la phase M, sur la totalité des cellules en mitose au moment de la collecte des embryons. Il est inversement proportionnel à la durée de la phase G2 : un ratio plus élevé par rapport à une condition de référence indique un raccourcissement de la durée de la phase G2, à l'inverse, un ratio plus faible par rapport à une condition de référence, indique un allongement de la durée de la phase G2.

Les résultats de cette expérience mettent en évidence une augmentation de ce ratio en condition PD0166285 par rapport à la condition contrôle (respectivement $43\% \pm 11\%$ et $34\% \pm 10\%$) indiquant une diminution de la durée de la phase G2 des CPNs lorsque l'on traite les embryons au PD0166285 (**Figure 40-A**). En déterminant le taux de diminution de la durée de la phase G2 le long de l'axe dorso-ventral, nous constatons que la diminution moyenne du ratio (H3P⁺ ; EdU⁺) / H3P⁺ par rapport à la condition contrôle est de 41% (**Figure 40-D**).

La cinétique de la durée de la phase G2 est variable le long de l'axe dorso-ventral (Peco et al. 2012). Ainsi, en région ventrale, la durée moyenne de la phase G2 des progéniteurs neuraux est plus faible qu'en région dorsale (Peco et al., 2012). De plus, à HH13-14, CDC25B est fortement exprimé en région ventrale du tube neural et peu ou pas exprimé en région dorsale. Nous avons donc émis l'hypothèse que le PD0166285 aurait un impact différent sur la durée de la phase G2 des progéniteurs neuraux selon leur position le long de l'axe dorso-ventral.

En région dorsale, le PML est plus élevé dans la condition PD0166285 par rapport à la condition contrôle (respectivement $51\% \pm 19\%$ et $37\% \pm 21\%$), en région ventrale la différence entre les deux conditions est moindre (respectivement $59\% \pm 13\%$ et $56\% \pm 15\%$) (**Figure 40-C**).

En déterminant le pourcentage de diminution du ratio (H3P⁺ ; EdU⁺) / H3P⁺ en région dorsale et ventrale du tube neural, on constate que l'effet du PD0166285 sur la diminution de la durée de la phase G2 est en effet, plus important en dorsal qu'en ventral (respectivement 62% et 8% de diminution par rapport à des embryons non traités) (**Figure 40-E**).

Ces résultats mettent en évidence que le PD0166285 provoque une diminution moyenne globale de la durée de la phase G2 par rapport à la condition contrôle et que cette diminution est plus importante en région dorsale qu'en région ventrale.

Ayant confirmé que le PD0166285 est suffisant pour induire une diminution de la durée de la phase G2, nous devons ensuite vérifier la spécificité de l'action de cet inhibiteur pharmacologique sur la dynamique de la phase G2. Nous avons donc caractérisé la dynamique des autres paramètres du cycle cellulaire dans les mêmes conditions de traitement.

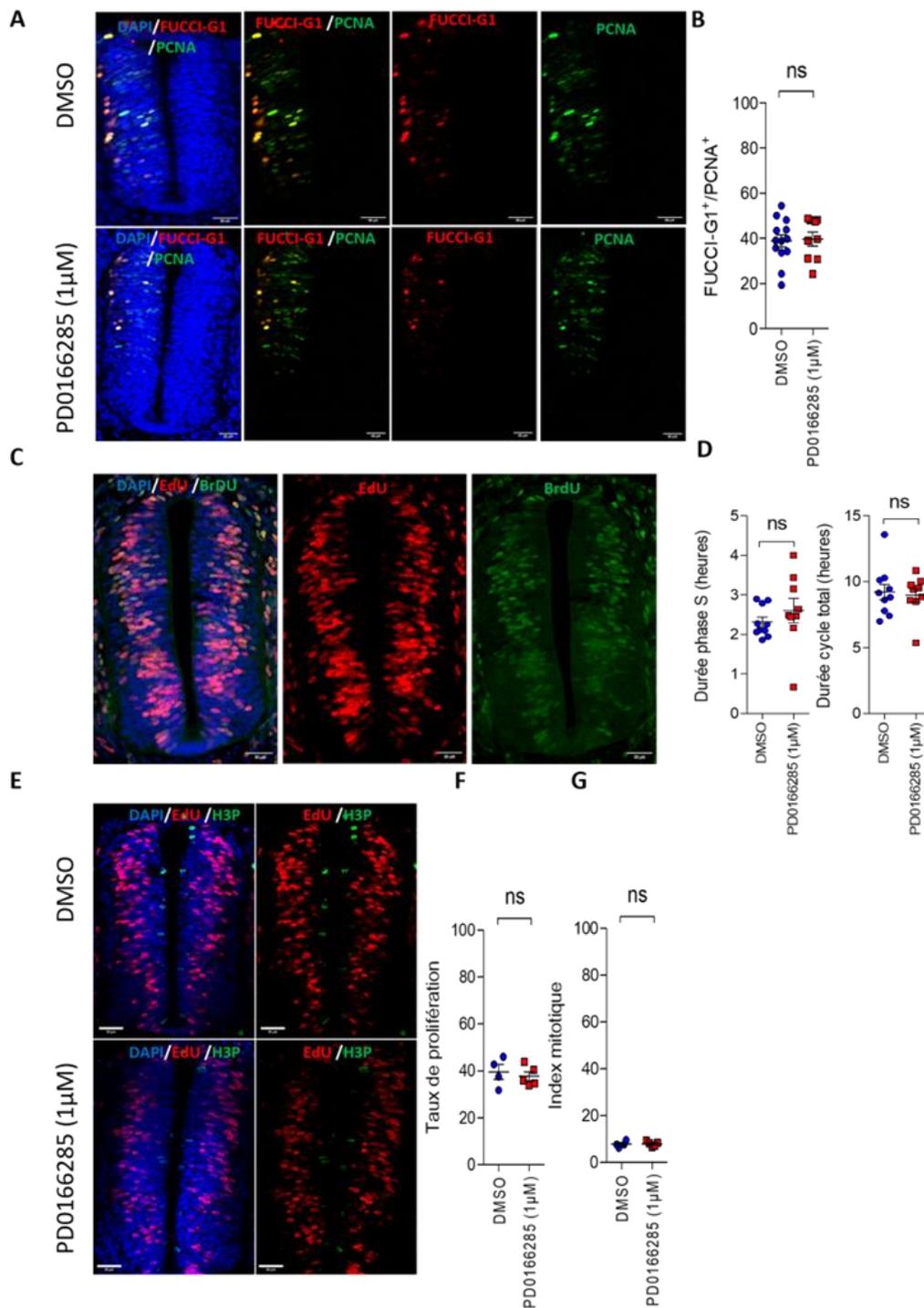


Figure 41. Le PD0166285 induit une diminution de la durée de la phase G2 sans affecter les autres paramètres du cycle cellulaire : Ces expériences ont été réalisées sur embryons de poulet aux stades HH13-14 traités par injection d’une solution de DMSO ou de PD0166285 dans le tube neural. Les embryons sont collectés 24h post-traitement au stade HH17. **(A)** Marquage des cellules en phase G1 (rouge) et des cellules en prolifération (vert) après co-électroporation d’une construction FUCCI-G1 et PCNA **(B)** quantification la proportion des cellules en phase G1 (FUCCI-G1⁺) par rapport à la totalité de cellules électroporées et proliférantes (PCNA⁺). **(C)** Immunomarquage des marqueurs de la phase S, EdU (Rouge) et BrDU (vert) incorporés dans le cœur des embryons respectivement à 90 min et 30 min préfixation **(D-E)**, estimation de la durée de la phase S et la durée totale du cycle cellulaire (**selon la méthode décrite par Martynoga**). **(E)** immunomarquage du marqueur EdU (Rouge) et H3P (vert), l’EdU a été incorporé 1 h préfixation. **(F)** Quantification du taux de prolifération en évaluant la proportion de cellules en phase S (EdU) sur la totalité des cellules DAPI. **(G)** Quantification de l’index mitotique en calculant la proportion des cellules en mitoses (H3P) sur la totalité des cellules DAPI. Chaque point correspond à la valeur moyenne par embryon obtenue à partir de 3 coupes. Ces données sont issues de deux expériences indépendantes, à l’exception du taux de prolifération et de l’index mitotique **(C)** obtenues à partir d’une unique expérience.

Il a été montré que la surexpression de CDC25B entraîne de façon indirecte une augmentation de la durée de la phase G1 (Molina et al., 2022). Nous avons donc commencé par déterminer si le PD0166285 modifiait la proportion des cellules en phase G1. Pour calculer cette proportion, nous avons co-électroporé au stade HH13-14 un plasmide FUCCI-G1-RFP et un plasmide PCNA-eGFP marquant respectivement, les cellules en phase G1 et l'ensemble de cellules en prolifération, simultanément à une injection d'une solution contrôle (DMSO) ou de PD0166285. Les embryons ont été collectés 24h plus tard (HH17). L'analyse des ratios des cellules FUCCI-G1-RFP/cellules PCNA, révèle qu'il n'y a aucune différence significative de la proportion de cellules en phase G1 en condition PD0166285 par rapport à la condition contrôle (respectivement $39\% \pm 10\%$ et $40\% \pm 9\%$), indiquant que ce traitement ne modifie pas la dynamique de la phase G1 (**Figure 41-B**).

Ensuite, nous avons déterminé si le PD0166285 affecte la durée de la phase S et plus généralement la durée totale du cycle cellulaire. Afin d'estimer ces durées, nous avons opté pour la stratégie du double marquage EdU/BrdU développé par Martynoga (Martynoga et al., 2005). Ce double marquage EdU/BrdU a été réalisé par application au niveau du cœur, d'EdU suivi de BrdU, 2h et 30 min préfixation respectivement (24h post-traitement). La quantification a été réalisée sur les populations $\text{EdU}^+/\text{BrdU}^+$ et $\text{EdU}^+/\text{BrdU}^-$ afin d'estimer la durée de la phase S et la durée totale du cycle cellulaire. Nous n'avons pas détecté de différences significatives de la durée de la phase S (contrôles : $2\text{h}19 \pm 23$ min et traités : $2\text{h}36 \pm 56$ min) et de la durée totale du cycle cellulaire (contrôles : $9\text{h}13 \pm 53$ min et traités : $8\text{h}59 \pm 32.7$ min) (**Figure 41-D**).

Enfin, nous avons déterminé si cet inhibiteur affecte le taux de prolifération et l'index mitotique des CPNs. Pour cela nous avons procédé à une incorporation d'EdU 1h préfixation et réalisé une immunofluorescence pour marquer les cellules en mitoses (H3P^+), 24h post-traitement. Pour estimer le taux de prolifération, nous avons calculé la proportion de cellules EdU^+ sur la totalité de la population des progéniteurs. Pour l'index mitotique, nous avons calculé la proportion de cellules H3P^+ sur la totalité de la population des progéniteurs. Les résultats ne révèlent aucun effet significatif du traitement pharmacologique sur le taux de prolifération ($40\% \pm 6\%$ et $38\% \pm 3\%$ respectivement Contrôle et PD0166285), ni sur l'index mitotique des progéniteurs neuraux ($8\% \pm 1\%$ et $8\% \pm 1\%$ respectivement Contrôle et PD0166285) (**Figure 41C-b-c**).

Ainsi, le PD0166285 provoque un raccourcissement de la durée de la phase G2 spécifiquement, sans modifier significativement les autres paramètres du cycle cellulaire.

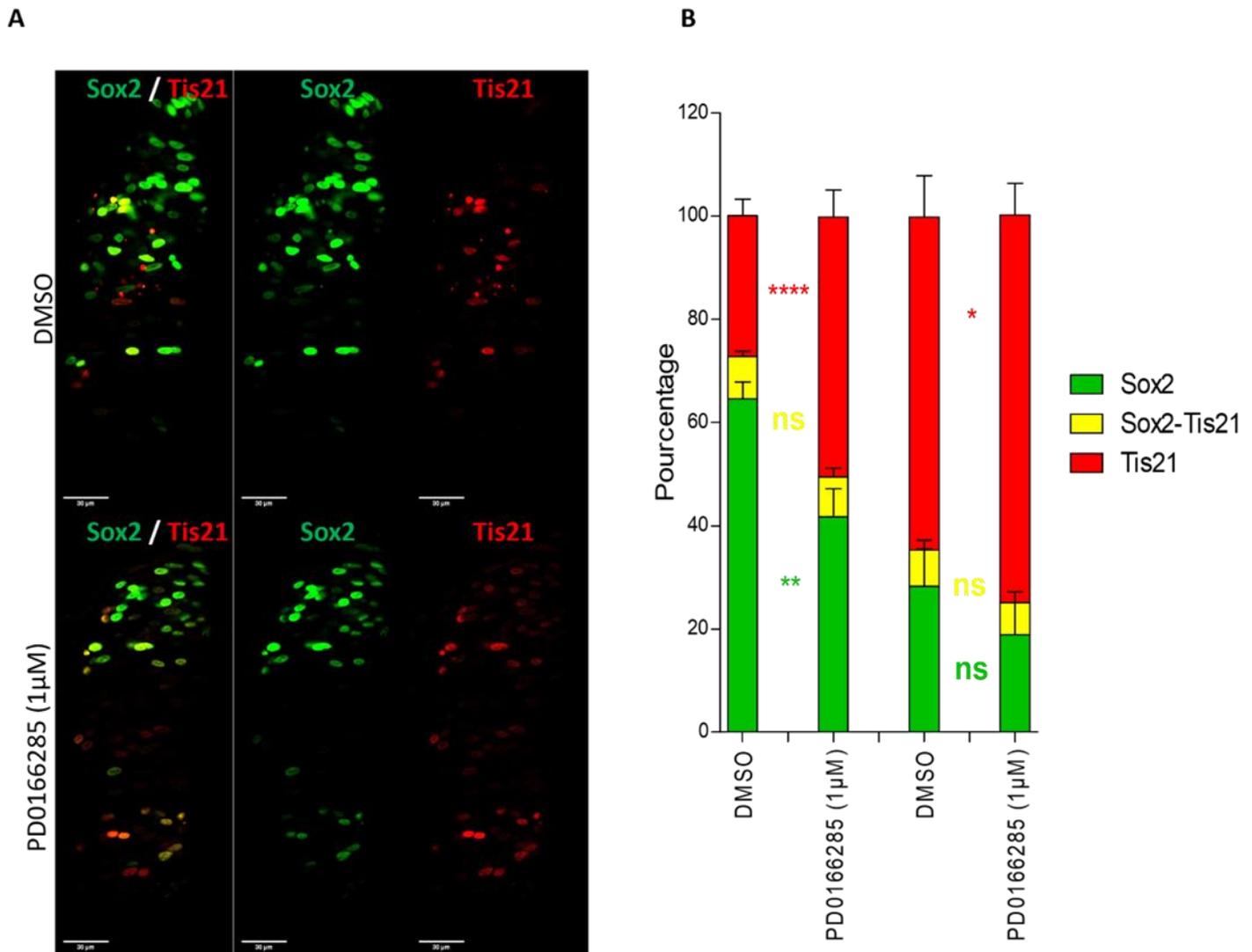


Figure 42. La diminution spécifique de la durée de la phase G2 induit une augmentation la proportion des divisions neurogéniques et une diminution des divisions prolifératives :

Ces expériences ont été réalisées sur embryons de poulet aux stades HH13-14 co-électroporés avec un plasmide GFP (sous le contrôle du promoteur Sox2) un plasmide RFP (sous le contrôle du promoteur Tis21) puis injectés avec une solution de DMSO ou de PD0166285 dans le tube neural. Les embryons sont collectés 24h post-traitement au stade HH17. **(A)** Marquage des cellules réalisant des divisions prolifératives PP (vert), réalisant des divisions neurogéniques asymétriques PN (Jaune) et réalisant des divisions neurogéniques terminales NN(Rouge) **(B)** quantification de la proportion des 3 modes de division par rapport à la totalité de cellules électroporées. Ces données sont issues de 3 expériences indépendantes. L'ensemble de ces expériences regroupent des données issues de 13 embryons contrôles et 14 embryons traités, le phénotype de chaque embryon a été déterminé en moyennant les données issues du comptage de 3 coupes.

b) La diminution de la durée de la phase G2 favorise les divisions neurogéniques des progéniteurs neuraux aux dépens de leur auto-renouvellement

Dans un second temps, notre objectif était de déterminer si cette diminution de la durée de la phase G2 est suffisante pour moduler le mode de division des progéniteurs neuraux. Pour cela, nous avons utilisé la stratégie développée par E. Marti (Le Dréau et al., 2014; Saade et al., 2013) pour différencier les trois modes de division, PP, PN et NN des progéniteurs neuraux du tube neural.

Cette stratégie consiste à co-électroporer *in ovo* les tubes neuraux avec de rapporteurs GFP et RFP dont l'expression est régulée respectivement par les promoteurs de Sox2 et de Tis21 et de quantifier le nombre de progéniteurs exprimant ces marqueurs 24h post électroporation. Les cellules Sox2⁺/Tis21⁻ correspondent aux progéniteurs réalisant des divisions prolifératives (PP), les cellules Sox2⁺/Tis21⁺, correspondent à ceux réalisant des divisions neurogéniques asymétriques (PN), et les cellules Sox2⁻/Tis21⁺ correspondent à ceux réalisant des divisions neurogéniques symétriques (NN).

Nous avons donc réalisé une co-électroporation de ces rapporteurs, suivie d'une injection de PD0166285 (1µM). La quantification des modes de division réalisée 24h après traitement, révèle que dans la partie dorsale du tube neural, l'inhibiteur pharmacologique provoque une augmentation significative de la proportion des divisions neurogéniques (50% ± 19% et 27,3% ± 12% respectivement PD0166285 et Contrôle) et une diminution significative de la proportion de cellules réalisant des divisions prolifératives (42% ± 20% et 65% ± 12% respectivement PD0166285 et Contrôle). Aucune différence significative n'est observée pour la proportion de cellules réalisant des divisions neurogéniques asymétriques (8% ± 6 % et 8 % ± 4% respectivement PD0166285 et Contrôle) (**Figure 42-B**).

Dans la région ventrale, l'analyse révèle une augmentation significative de la proportion de cellules réalisant des divisions neurogéniques (76% ± 20 % et 63 % ± 26 % respectivement PD0166285 et Contrôle), mais aucune différence significative n'est observée pour les divisions neurogéniques asymétriques (6% ± 7 % et 7 % ± 6 % respectivement PD0166285 et Contrôle) et les divisions prolifératives (19% ± 20% et 30 % ± 24 % respectivement PD0166285 et Contrôle) (**Figure 42-B**).

Ces résultats montrent qu'une diminution de la durée de la phase G2 impacte le mode de divisions des progéniteurs neuraux, en promouvant une augmentation des divisions neurogéniques et une diminution des divisions prolifératives. Par ailleurs, ces résultats indiquent, que l'impact sur le mode de divisions des progéniteurs neuraux est proportionnel à l'intensité de la diminution de la durée de phase G2, cet effet étant plus marqué dans la région dorsale que dans la région ventrale du tube neural.

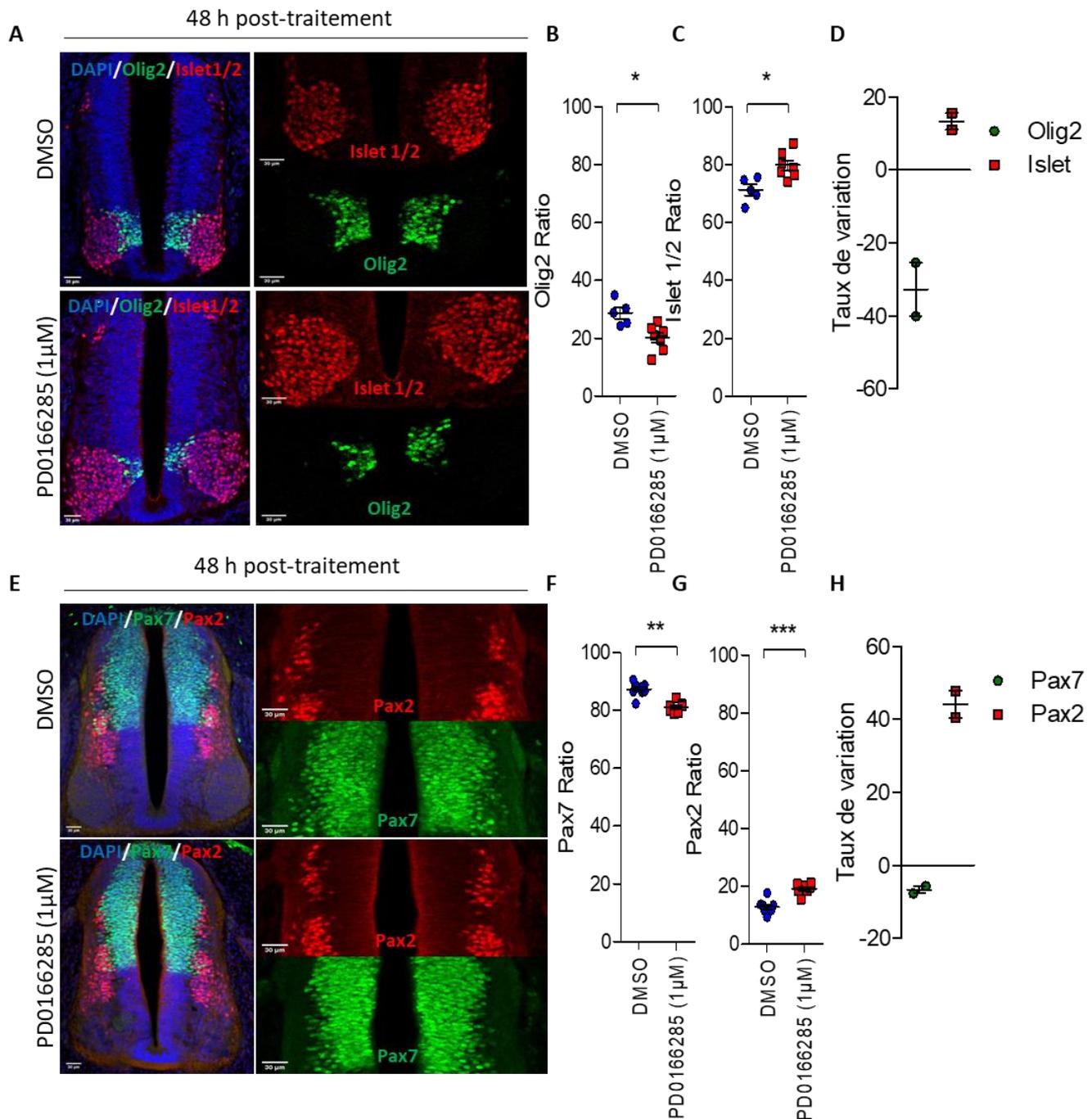


Figure 43. La diminution de la durée de la phase G2 induit une augmentation de la proportion de neurones et une diminution de la proportion de progéniteurs :

Ces expériences ont été réalisées sur embryons de poulet aux stades HH13-14 traités par injection d’une solution de DMSO ou de PD0166285 dans le tube neural. Les embryons sont collectés 48h post-traitement aux stades HH20-21. **(A)** Marquage des progéniteurs ventraux marqués Olig2 (vert) et des motoneurones marqués Islet1/2 (Rouge). **(B)** Quantification du ratio $Olig2/(Olig2+Islet1/2)$. **(C)** Quantification du ratio $Islet1/2/(Olig2+Islet1/2)$. **(D)** Quantification du taux de variation du nombre de cellules Olig2 et Islet1/2 par rapport à la condition contrôle. **(E)** Marquage des progéniteurs dorsaux marqués Pax7 (vert) et des neurones dorsaux marqués Pax2 (Rouge). **(F)** Quantification du ratio $Pax7/(Pax2+Pax7)$. **(G)** Quantification du ratio $Pax2/(Pax2+Pax7)$. **(H)** Quantification du taux de variation du nombre de cellules Pax7 et Pax2 par rapport à la condition contrôle. Ces données sont issues de 2 expériences indépendantes. Chaque point correspond à la moyenne des données de 3 coupes/embryon.

c) La diminution de la durée de la phase G2 induit une augmentation de la proportion de neurones et une diminution de la proportion de progéniteurs

Par la suite, afin d'évaluer l'impact de ce changement du mode de division des CPNs suite à une diminution de la durée de la phase G2 sur la production neuronale, nous avons quantifié le ratio progéniteurs/neurones, 48h post-traitement.

Pour évaluer la proportion de neurones, nous avons quantifié la population de neurones ventraux marqués Islet 1/2 et la population neurones dorsaux marqués Pax2. Pour évaluer la proportion de progéniteurs, nous avons quantifié les progéniteurs ventraux marqués Olig2 et les progéniteurs dorsaux marqués Pax7(**Figure 43-A-E**). Les résultats révèlent que dans la partie dorsale, le nombre de progéniteurs Pax7⁺ est légèrement diminué (-7% ± 1 %) et que le nombre de neurones Pax2⁺ est augmenté (+44% ± 5%) (**Figure 43-H**). En partie ventrale, le nombre de progéniteurs Olig2⁺ est diminué par rapport à la condition contrôle (-33% ± 10 %) et le nombre de neurones Islet 1/2⁺ est augmenté (13% ± 3 %) (**Figure 43-D**).

Si l'on analyse les proportions des progéniteurs et des neurones dans les domaines ventraux et dorsaux dans ces mêmes expériences, on voit que dans la région ventrale, le traitement PD0166285 provoque une diminution significative de la proportion de cellules Olig2⁺ (20 % ± 4% et 29 % ± 4 % respectivement PD0166285 et Contrôle) et une augmentation significative de la proportion de cellules Islet 1/2⁺ (80% ± 4 % et 71% ± 4% respectivement PD0166285 et Contrôle) (**Figure 43-B-C**). Dans la région dorsale, le traitement PD0166285 provoque une diminution significative de la proportion de cellules Pax7⁺ (81% ± 2 % et 87 % ± 2 % respectivement PD0166285 et Contrôle) et une augmentation significative de la proportion de cellules Pax2⁺ (19 % ± 2 % et 12 % ± 2 % respectivement PD0166285 et Contrôle) (**Figure 43-F-G**).

Ces résultats révèlent qu'une diminution de la durée de la phase G2 induit une augmentation du nombre de neurones en région ventrale et en région dorsale à 48h post-traitement et que cet effet sur la production neuronale est plus fort en région dorsale qu'en région ventrale. L'effet du traitement PD0166285 sur la production neuronale est donc corrélé à l'intensité de la diminution de la durée de la phase G2, 24 heures plus tôt.

d) Conclusion partie 1 : la diminution de la durée de la phase G2 est suffisante pour mimer partiellement les fonctions neurogéniques de CDC25B

L'ensemble de ces résultats révèle qu'un traitement au PD0166285, inhibiteur de WEE1 et MYT1, provoque une diminution significative et spécifique de la durée de la phase G2 des progéniteurs neuraux. L'effet sur la durée de la phase G2 des CPNs est plus fort en région dorsale qu'en région ventrale et il est corrélé aux niveaux d'expression de CDC25B le long de l'axe dorso-ventral du tube neural à ces stades de développement.

La diminution de la durée de la phase G2 induite par ce traitement pharmacologique promeut les divisions neurogéniques au dépend des divisions prolifératives, l'effet étant plus marqué en région dorsale qu'en région ventrale. Ces observations indiquent que la diminution de la durée de la phase G2 est suffisante pour restreindre les progéniteurs spinaux vers un destin neurogénique. Cette restriction des progéniteurs vers un destin neurogénique a pour conséquence une augmentation générale de la production neuronale à la fois en région dorsale et en région ventrale

Ainsi, aux travers de ces expériences nous avons montré qu'une diminution spécifique de la durée de la phase G2 par inhibiteur pharmacologique est suffisante pour mimer partiellement les fonctions neurogéniques de CDC25B. Par conséquent, la diminution de la durée de la phase G2 en aval de CDC25B est causale dans la régulation du destin des progéniteurs neuraux.

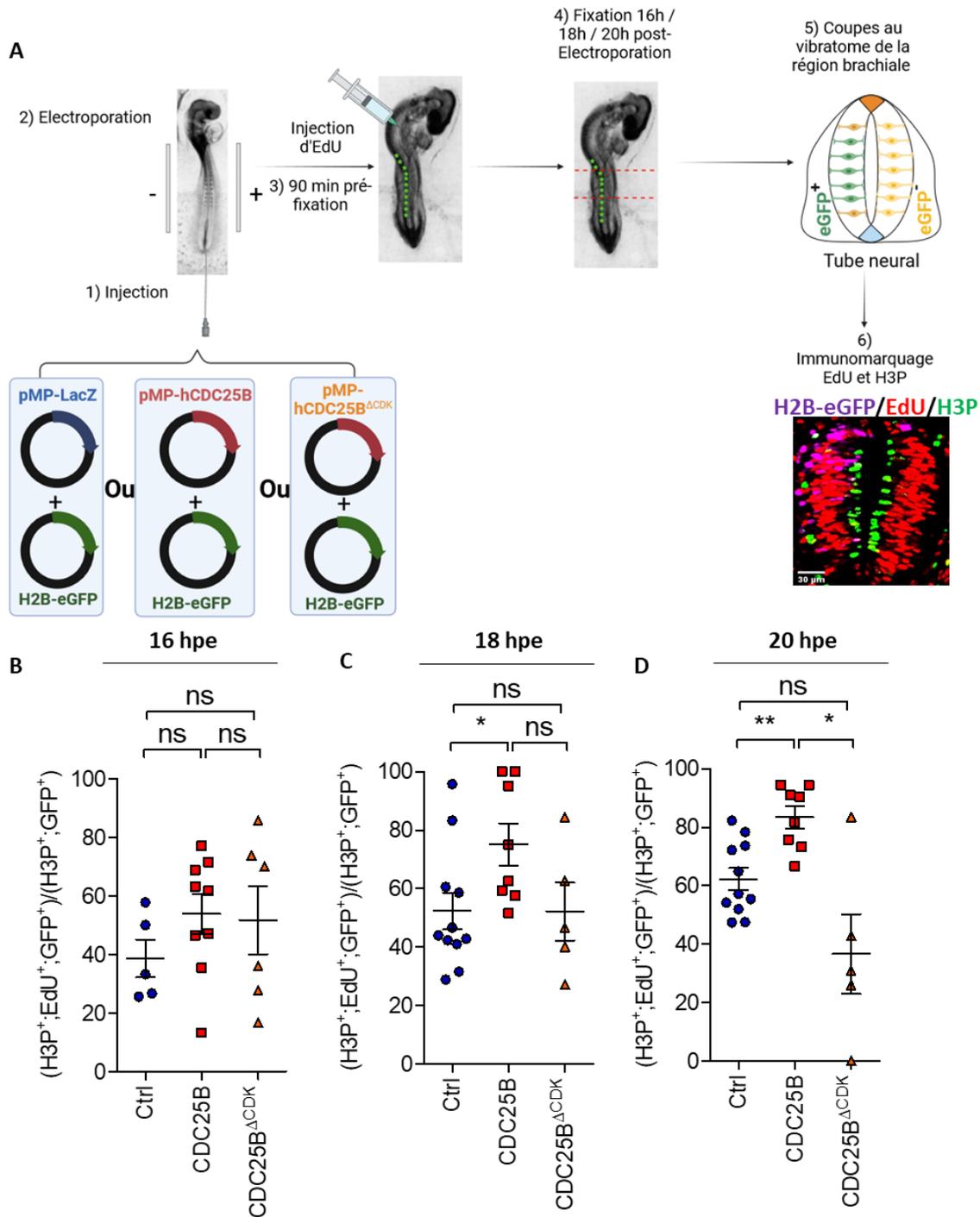


Figure 44. CDC25B impacte la durée de la phase G2 dès 18 heures post-électroporation :

(A) Stratégie de co-électroporation d'embryons de poulet à 2 jours de développement avec un contrôle (pMP-LacZ), CDC25B (pMP-hCDC25B) ou CDC25B Δ CDK (pMP-hCDC25B Δ CDK) avec un plasmide H2B-eGFP. Les embryons sont injectés avec une solution d'EdU 90 minutes préfixation et sont prélevés à 16h, 18h et 20h post-électroporation. Après fixation, les tronçons de tubes neuraux électroporés sont coupés au vibratome et un immunomarquage est réalisé pour marquer les cellules en phase S (EdU en Rouge) et les cellules en mitoses (H3P en vert). (B-D) L'impact de ces gains de fonction sur la durée de la phase G2 est calculé en faisant le ratio des cellules électroporées (H2B-eGFP en magenta) doublement positives (H3P $^+$; EdU $^+$) sur la totalité des cellules électroporées H3P $^+$. Ce calcul a été réalisé à 16h (B) 18h (C) et 20h (D) post-électroporation. Chaque point correspond au calcul de la moyenne des données de 3 coupes/par embryon. Ces données sont issues d'embryons collectés lors de 2 expériences indépendantes pour l'étude à 16h et 20h post-électroporation et de 3 expériences indépendantes pour l'étude à 18h post-électroporation.

B. **PARTIE 2** : LA PHOSPHATASE CDC25B REGULE L'ÉQUILIBRE PROLIFÉRATION/DIFFÉRENCIATION DES CPNS EN MODULANT L'EXPRESSION DE GENES IMPLIQUÉS DANS LA BIOGÈNESE DES RIBOSOMES ET LA MACHINERIE TRADUCTIONNELLE

a) Stratégie expérimentale :

Après avoir caractérisé l'effet causal de la durée de la phase G2 sur l'équilibre prolifération/différenciation des progéniteurs neuraux, **mon second objectif était de caractériser les mécanismes moléculaires recrutés en aval de CDC25B pour favoriser la production neuronale.**

Comme décrit en introduction, la comparaison de l'effet sur la neurogenèse de la forme sauvage de CDC25B avec celle d'une forme mutée CDC25B^{ΔCDK} incapable d'interagir avec son substrat CDK1, nous a permis de montrer qu'une partie de ses fonctions neurogéniques est indépendante de son action sur la dynamique des phases du cycle cellulaire (Bonnet et al., 2018).

Afin de discriminer les mécanismes cycles cellulaires - dépendants ou - indépendants de CDC25B sur la neurogenèse, nous avons comparé le transcriptome de tubes neuraux électroporés avec la forme sauvage de CDC25B, au transcriptome de tubes neuraux électroporés avec la forme mutée CDC25B^{ΔCDK} par une stratégie de RNA-Seq.

Le premier point était de déterminer la fenêtre temporelle à laquelle nous devons réaliser ces expériences. Nous savions d'après les travaux précédents de l'équipe, qu'une surexpression de CDC25B induit une augmentation significative de la proportion de progéniteurs réalisant des divisions PN et NN au dépend des divisions PP 24h post-électroporation, mais que l'impact sur la production neuronale n'est observé qu'à 48h post-électroporation (Bonnet et al., 2018). Pour analyser le transcriptome des progéniteurs en cours de transition vers un destin neurogénique, nous devons donc nous placer dans une fenêtre temporelle dans laquelle la production neuronale n'a pas encore été affectée. Notre objectif étant également de discriminer les mécanismes moléculaires mis en jeu en aval de CDC25B de façon cycle cellulaire -dépendante et - indépendante, il fallait que la durée de la phase G2 soit modifiée depuis suffisamment longtemps pour que la condition CDC25B soit différentiable des conditions contrôle et CDC25B^{ΔCDK}.

Nous avons donc analysé la cinétique d'apparition du défaut de durée de phase G2 à différents temps post électroporation en comparant des conditions contrôles ou gains de fonction CDC25B ou CDC25B^{ΔCDK}. Pour réaliser les gains de fonction, nous avons utilisé des plasmides dans lesquels CDC25B et CDC25B^{ΔCDK} sont placés sous le contrôle de l'élément cis régulateur de la phosphatase CDC25B murine, pccRE, permettant d'exprimer ces différentes formes de CDC25B selon la même dynamique que la phosphatase endogène. Ce prérequis est essentiel, car un gain de fonction de CDC25B sous le contrôle d'un promoteur fort provoque une expression continue de CDC25B durant le cycle cellulaire induisant des catastrophes mitotiques, suivies d'apoptose (Peco et al., 2012).

Pour évaluer l'effet de ces gains de fonction sur la durée de la phase G2, nous avons réalisé une incorporation d'EdU à 90min préfixation, puisqu'il s'agit du point où l'on observe la plus forte différence entre la condition contrôle et la surexpression de CDC25B (Bonnet et al., 2018) (**Figure 44**). La quantification des proportions de cellules (EdU⁺; H3P⁺)/H3P⁺ dans nos différentes conditions indique que la durée de la phase G2 commence à être raccourcie à partir de 16h post-électroporation (39% ± 14% ; 54% ± 20% et 52% ± 28% respectivement Ctrl, CDC25B et CDC25B^{ΔCDK}) mais ce raccourcissement n'est significatif par rapport à la condition contrôle qu'à partir de 18hpe (52% ± 21% ; 75% ± 20% et 52% ± 22% respectivement Ctrl et CDC25B et CDC25B^{ΔCDK}). A 20hpe, la durée de la phase G2 est significativement diminuée par rapport à la condition contrôle et également par rapport à la condition CDC25B^{ΔCDK} (62% ± 13% ; 87% ± 12% et 46% ± 26% respectivement Ctrl, CDC25B et CDC25B^{ΔCDK}) (**Figure 44-B-D**).

À la suite de ces analyses, nous avons donc décidé de réaliser le RNA-Seq à 24h post-électroporation soit 6 heures après une modification significative de la durée de la phase G2 par CDC25B et avant que l'augmentation du nombre de neurones ne soit décelable.

Par ailleurs, la neurogenèse étant très dynamique le long de l'axe antéro-postérieur du tube neural nous avons prélevé uniquement la région brachiale du tube neural pour réduire l'impact de cette hétérogénéité sur les résultats de notre crible.

Nous avons donc réalisé des gains de fonction Ctrl, CDC25B et CDC25B^{ΔCDK}, co-électroporés avec un plasmide codant une H2B-eGFP pour pouvoir collecter spécifiquement les cellules électroporées (**Figure 45**).

Pour que les résultats obtenus soient statistiquement significatifs, nous avons réalisé 5 répliquats biologiques pour chaque condition expérimentale et chaque réplikat biologique correspond aux cellules GFP⁺ triées à partir de 10 à 13 embryons disséqués en région brachiale. L'ARN préparé à partir de ces cellules triées a ensuite été envoyé pour séquençage à BGI (<https://www.bgi.com/us/sequencing-services/dna-sequencing/>).

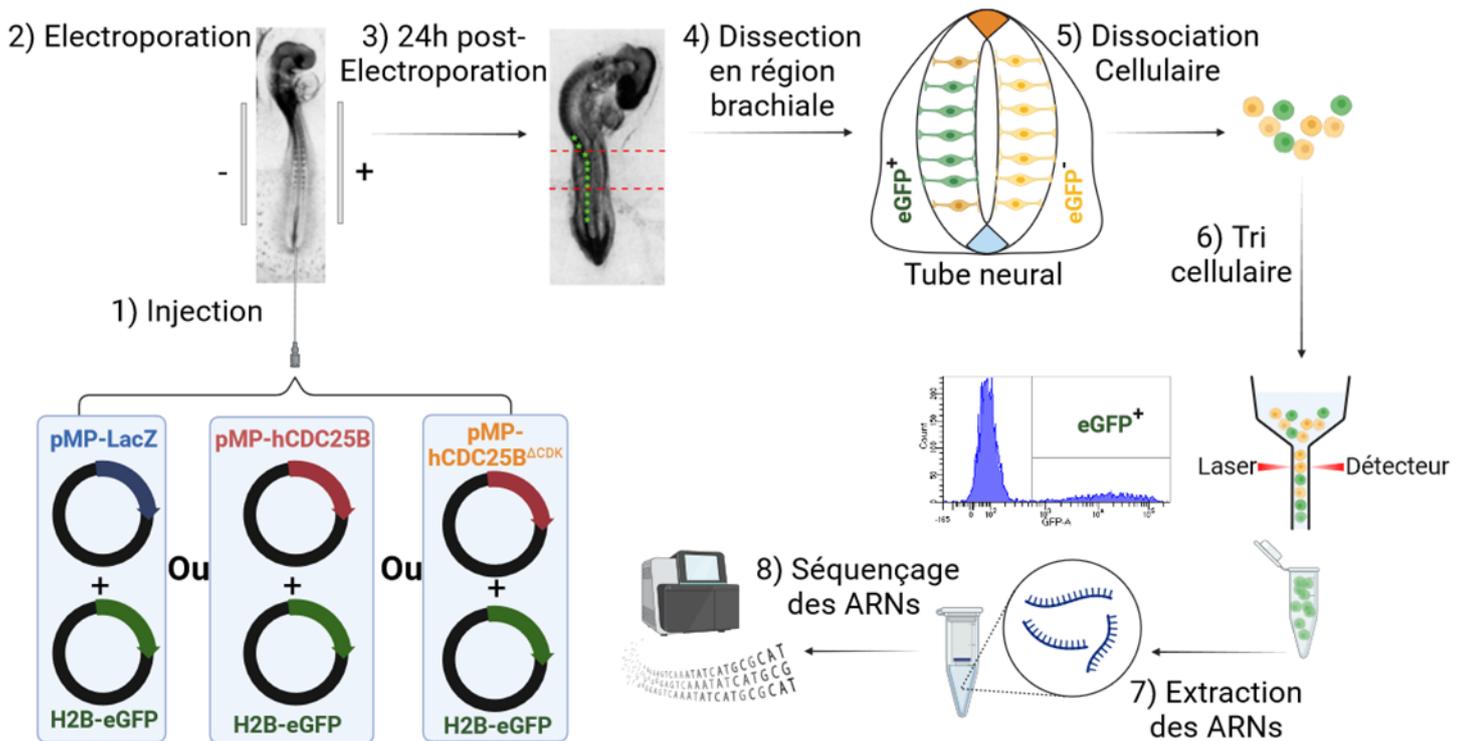


Figure 45. Stratégie du RNA-Seq :

ces expériences ont été réalisées sur embryons de poulet aux stades HH13-14 ayant été co-électroporés avec un plasmide contrôle (pMP-LacZ) ou un plasmide permettant la surexpression de CDC25B (pMP- CDC25B) ou la surexpression de CDC25B^{ΔCDK} (pMP-CDC25B^{ΔCDK}) avec un plasmide codant une H2B-eGFP. Les embryons sont prélevés 24 heures post-électroporation (au stade HH17). Les tubes neuraux sont disséqués au niveau de la région brachiale (paire de somites 12 à 20) et les cellules dissociées et triées pour ne garder que les cellules GFP⁺ qui surexpriment les différents plasmides contrôle, CDC25B ou CDC25B^{ΔCDK}. Les ARN sont ensuite extraits et envoyés pour séquençage à *Beijing Genomics Institute* (BGI). Ces expériences ont été reproduites 5 fois, pour que chaque condition expérimentale soit représentée en 5 répliquats techniques. Chaque réplikat correspond aux extraits d'ARN issus de 10 à 13 embryons.

b) Analyse différentielle :

Lors de la réception des données brutes, nous avons procédé sur la plateforme Galaxy (<https://bioinfo.genotoul.fr/>) à la vérification de la qualité des Reads. Nous avons ensuite procédé à l'alignement de ces reads sur le génome de référence de *gallus gallus* grâce au programme TopHat2 et procédé à la production des matrices de comptage réalisées sur HtseqCount.

A partir des matrices de comptage, nous avons réalisé une analyse en composantes principales (ACP) afin de caractériser le niveau de similitude entre les réplicats d'une même condition, et d'évaluer si les trois conditions, Contrôle, CDC25B et CDC25B^{ΔCDK}, sont correctement discriminées les unes des autres (**Figure 46**).

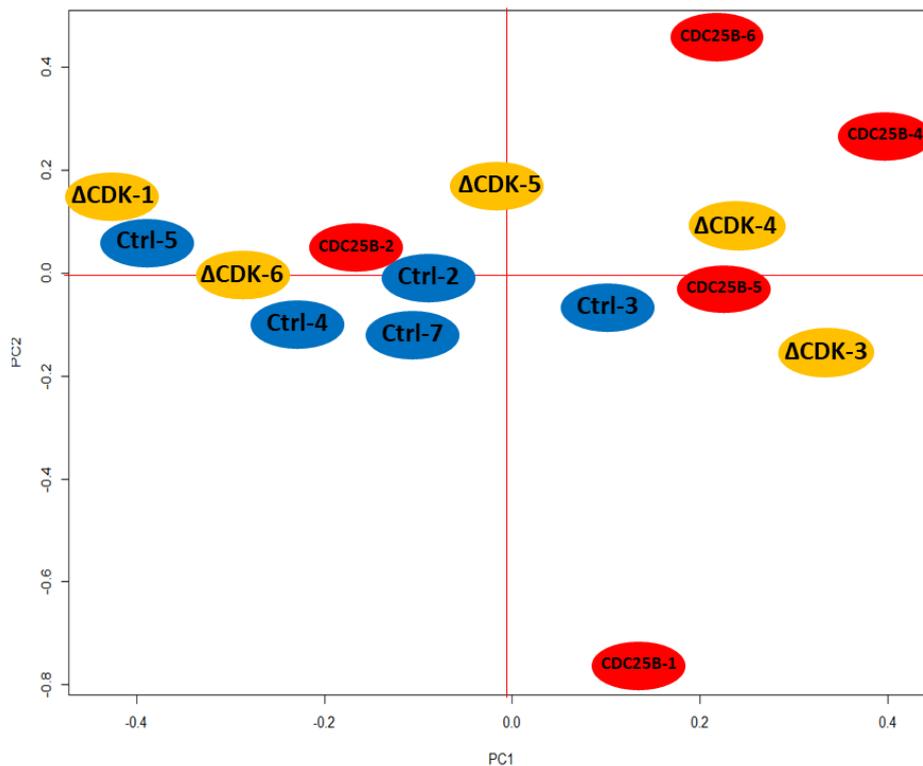


Figure 46. La condition CDC25B^{ΔCDK} n'est pas discriminable des conditions contrôle et CDC25B : analyse en composantes principales (ACP) réalisée à partir des 5 réplicats des conditions contrôle, CDC25B, et CDC25B^{ΔCDK} (respectivement, bleu, rouge et orange) en prenant en considération la première et de la deuxième composante principale. Cette ACP a été générée en utilisant le package ggplot2. Le clustering a été basé sur le niveau d'expression des gènes normalisé.

L'analyse en composantes principales (ACP) nous permet de voir que ces trois conditions ne sont pas strictement discriminables (**Figure 46**). En effet, si les conditions Contrôle et CDC25B sont plutôt bien discriminées, on voit que les échantillons CDC25B^{ΔCDK} ségrégent pour moitié avec le groupe d'échantillons contrôle et pour moitié avec le groupe d'échantillons CDC25B. Nos données ne nous permettent donc pas de comparer les effets cycle cellulaire dépendant et indépendant de CDC25B. Néanmoins, nous avons poursuivi l'analyse en excluant la condition CDC25B^{ΔCDK} afin d'identifier les acteurs moléculaires modifiés globalement en aval de CDC25B.

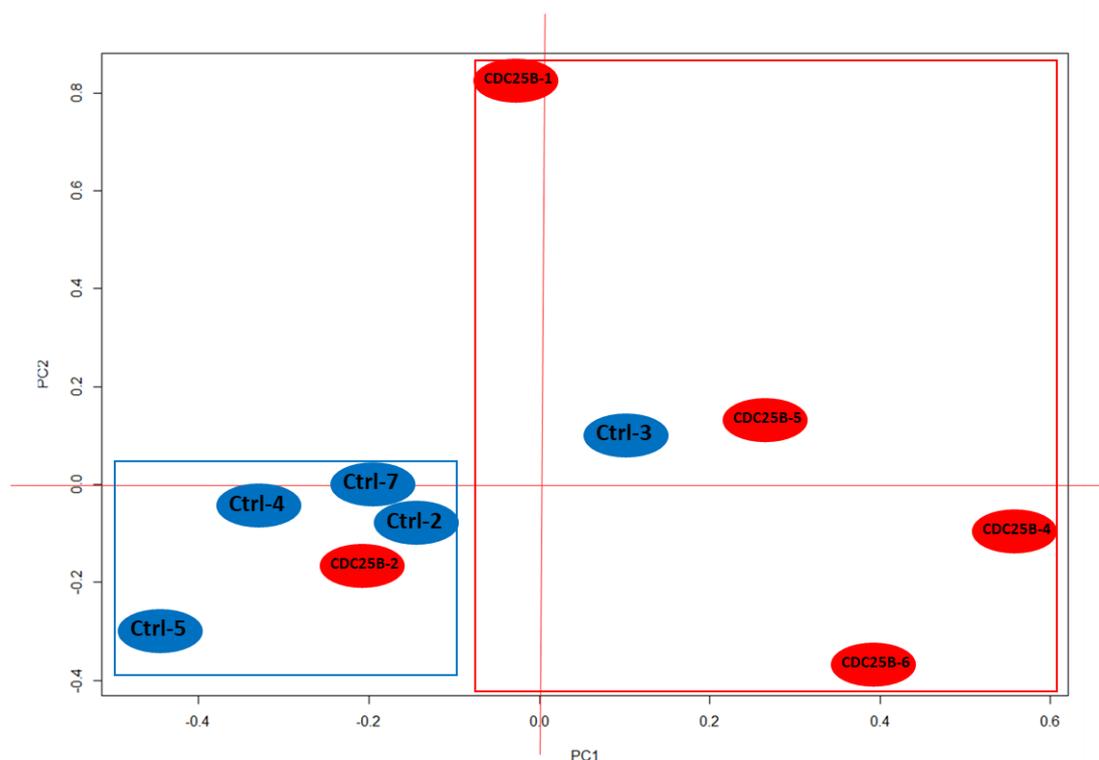
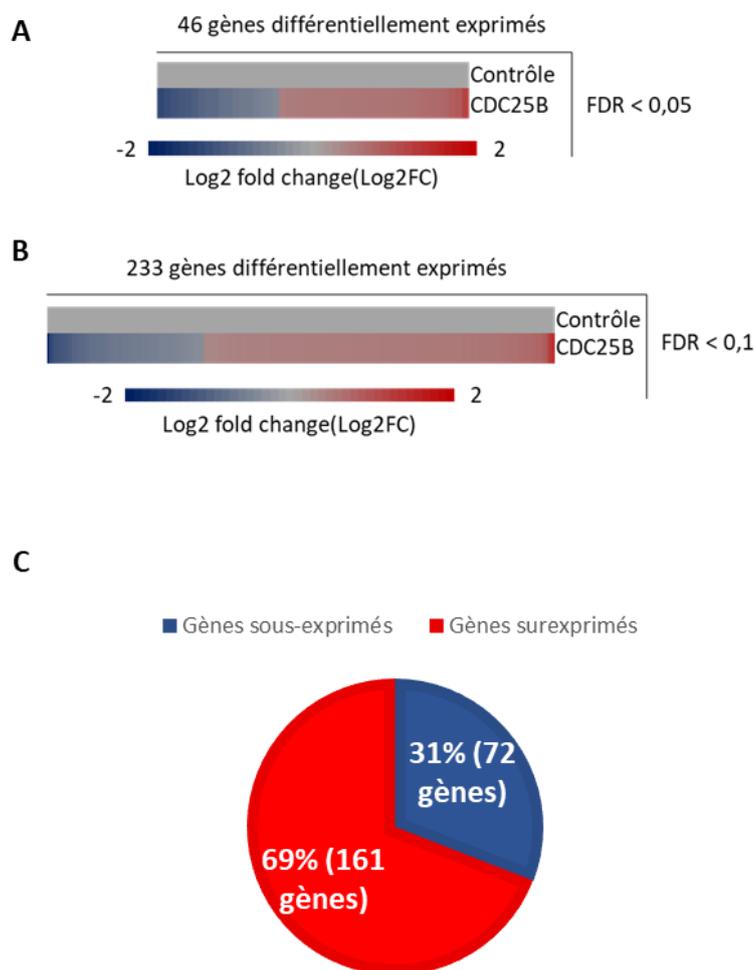


Figure 47. Les conditions contrôles et CDC25B sont discriminables l'une de l'autre :

analyse en composantes principales (ACP) réalisée à partir des 5 réplicats des conditions contrôle et CDC25B (respectivement, bleu et rouge) en prenant en considération la première et la deuxième composante principale. Cette ACP a été générée en utilisant le package ggplot2. Le clustering a été basé sur le niveau d'expression des gènes normalisé.

L'analyse en composantes principales (ACP) nous permet de voir un meilleur regroupement des réplicats contrôle et CDC25B, à l'exception du réplicat numéro 3 de la condition contrôle et numéro 2 de la condition CDC25B qui divergent de leur groupe (**Figure 47**).



D

Ensembl identifiant	Nom du gènes	Gènes sous-exprimés (Log2FC)
ENSGALG00000015247	<i>GPR161</i>	-0,57
ENSGALG00000013568	<i>NR4A3</i>	-0,58
ENSGALG00000005714	<i>PKD1</i>	-0,76
ENSGALG00000000636	<i>MDM4</i>	-0,49

E

Ensembl identifiant	Nom du gènes	Gènes surexprimés (Log2FC)
ENSGALG00000040238	<i>IMP3</i>	0,50
ENSGALG00000002127	<i>LSM10</i>	0,71
ENSGALG000000033447	<i>H2AZ2</i>	0,47
ENSGALG000000029260	<i>H-RAS</i>	0,50
ENSGALG000000038595	<i>POLR2I</i>	0,41

F

Ensembl identifiant	Nom du gènes	Gènes surexprimés (Log2FC)
ENSGALG000000048612	<i>RPS26</i>	0,57
ENSGALG000000049538	<i>RPS28</i>	0,66
ENSGALG000000014432	<i>RPS20</i>	0,60
ENSGALG000000004831	<i>RPS4Y1</i>	0,55
ENSGALG000000049865	<i>RPL18A</i>	0,52
ENSGALG000000015339	<i>RPL24</i>	0,54
ENSGALG000000016232	<i>RPL8</i>	0,55
ENSGALG000000017299	<i>RPS11</i>	0,48
ENSGALG000000005490	<i>RPS2</i>	0,59
ENSGALG000000002837	<i>RPL27</i>	0,51
ENSGALG000000037441	<i>RPS27</i>	0,48
ENSGALG000000007611	<i>RPL35A</i>	0,53
ENSGALG000000011290	<i>RPL15</i>	0,53
ENSGALG000000007711	<i>RPL4</i>	0,53
ENSGALG000000015195	<i>RPS15</i>	0,54
ENSGALG000000023294	<i>RPLP0</i>	0,52
ENSGALG000000006179	<i>RPL13</i>	0,49
ENSGALG000000012229	<i>RPS29</i>	0,50
ENSGALG000000003197	<i>RPL7A</i>	0,53
ENSGALG000000008806	<i>RPL12</i>	0,47
ENSGALG000000002644	<i>RPL10A</i>	0,50
ENSGALG000000010077	<i>RPS3A</i>	0,55
ENSGALG000000004588	<i>RPS14</i>	0,47

Figure 48. Analyse différentielle et descriptive :

analyse différentielle réalisée grâce au programme DESeq2 à partir des 5 réplicats de la condition contrôle et CDC25B. **(A)** 46 gènes différentiellement exprimés sont identifiés avec un FDR<0,05, **(B)** 233 gènes différentiellement exprimés sont identifiés avec un FDR<0,1, les gènes ayant un log2FC supérieur à 0 (en gris, représentatif de la condition contrôle) sont en rouge, les gènes ayant un log2FC inférieur à 0 sont en bleu. **(C)** Représentation de la proportion des gènes surexprimés et sous-exprimés (respectivement rouge et bleu) par rapport à la condition contrôle des 233 gènes différentiellement exprimés identifiés avec un FDR<0,1. **(D-F)** Tableaux récapitulatifs de l'analyse descriptive des gènes d'intérêt, différentiellement exprimés. **(D)** Liste des gènes d'intérêt sous-représentés. **(E)** Liste des gènes d'intérêt surreprésentés. **(F)** Famille de gènes la plus représentée lors de l'analyse différentielle.

Ayant une meilleure discrimination des réplicats de la condition contrôle et CDC25B nous avons procédé à l'analyse différentielle de nos données en utilisant le package DeSEQ2 sur R studio.

L'analyse différentielle avec un $FDR < 0,05$ (false discovery rate : taux de faux positifs acceptés $< 5\%$) a permis de mettre en évidence une liste de 46 gènes différentiellement exprimés. Avec un $FDR < 0,1$ (taux de faux positifs acceptés $< 10\%$) l'analyse nous permet d'identifier 233 gènes différentiellement exprimés, 161 gènes sont surexprimés et 72 sont sous exprimés par rapport à la condition contrôle (**Figure 48-A-C**).

Parmi ces gènes on trouve (**Figure 48-D**) :

GPR161 (G protein-coupled receptor 161), régulateur négatif de la voie Shh. Cette voie est décrite pour réguler positivement l'expression de CDC25B (Bénazéraf et al., 2006).

NR4A3, connu pour jouer un rôle d'activateur transcriptionnel, ce gène régule positivement la prolifération des cellules en favorisant l'expression de gènes comme *CCND1* et *CCND2*, régulateurs positifs du cycle cellulaire et de l'expression de gènes causant la dégradation de *CDKN1A* (p21), un inhibiteur du cycle cellulaire.

PKD1, code une protéine nommée Polycystine 1 dont l'expression est régulée par des protéines de la famille de Wnt (*Wnt3a* and *Wnt9b*). Polycystine 1 et 2 sont connus pour former un dimère et participer à la transduction de nombreuses voies de signalisation telles que la voie JAK/STAT ou la voie Wnt connues pour réguler la prolifération cellulaire.

Ainsi comme attendu, plusieurs gènes régulateurs positifs de la prolifération sont sous-représentés dans le transcriptome CDC25B par rapport à la condition contrôle.

On trouve également quelques gènes intéressants dans notre contexte biologique comme par exemple (**Figure 48-E**) :

H2AZ2, connue pour réguler la conformation de la chromatine et la ségrégation des chromosomes lors de la division cellulaire.

H-RAS, acteurs connus pour participer à de nombreux processus comme la migration cellulaire, la différenciation et la dynamique du cytosquelette.

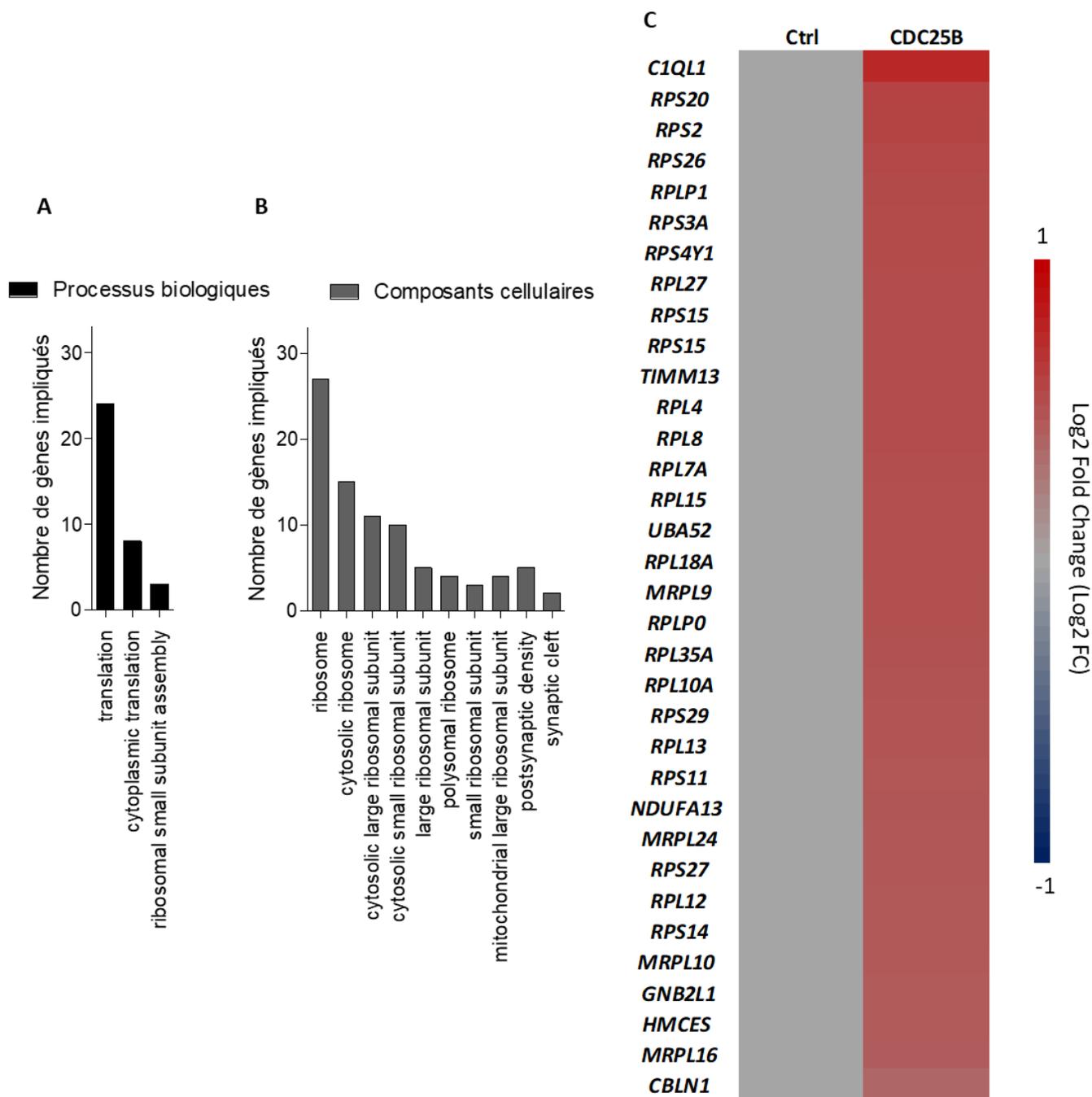


Figure 49. Analyse Gene Ontology :

Analyse de termes Gene Ontology (GO) réalisés sur GeneCodis4 à partir de la liste de gènes différentiellement exprimés entre la condition contrôle et CDC25B déterminée à partir d'un FDR<0,1. (A) Liste des processus biologiques significativement représentatifs de cette liste de gènes. (B) Liste des composants cellulaires significativement représentatifs de cette liste de gènes. (C) liste des gènes représentés par les termes GO déterminés lors de l'analyse GO et leur niveau d'expression par rapport à la condition contrôle.

De façon intéressante, parmi la liste de gènes différentiellement exprimés, une famille de gènes est fortement représentée. Il s'agit de gènes codant pour des protéines ribosomiques qui sont des composantes essentielles de la grande et de la petite sous-unité des ribosomes. Ainsi, 23/82 gènes codant pour des protéines ribosomiques sont sur-représentés dans le transcriptome des cellules électroporées avec CDC25B par rapport à la condition contrôle. Ils codent pour des protéines ribosomiques composant à la fois la petite et la grande sous unité des ribosomes. Parmi ces gènes on retrouve par exemple *RPS26*, *RPS28*, *RPS20*, *RPL24*, *RPL4*, *RPL10A* (Figure 48-F).

Par la suite, afin d'identifier les principaux **processus biologiques et composants cellulaires** représentés significativement dans le transcriptome CDC25B nous avons réalisé une analyse globale du transcriptome par Gene Ontology à l'aide du logiciel GeneCodis (Figure 49).

Cette analyse confirme que le **processus biologique** le plus modifié en aval de CDC25B est lié à la traduction. Ainsi, l'analyse globale permet de mettre en évidence une sur-représentation de gènes impliqués dans la « **traduction** » (*RPL10A*, *RPL12*, *RPL13*, *RPL15*, *RPL18A*, *RPL27*, *RPL35A*, *RPL4*, *RPL8*, *RPS11*), la « **traduction cytoplasmique** » (*RPL10A*, *RPL15*, *RPL18A*, *RPL35A*, *RPL8*, *RPLP0*, *RPLP1*, *RPS26*), et « **l'assemblage des sous-unités de ribosomes** » (*RPS15*, *RPS14*) (Figure 49-A).

Parmi les **composants cellulaires** identifiés, on retrouve les termes « **ribosomes** » (*MRPL16*, *MRPL24*, *MRPL9*, *RACK1*, *RPL10A*, *RPL12*, *RPL13*, *RPL15*, *RPL18A*, *RPL27*, *RPL35A*, *RPL4*, *RPL7A*, *RPL8*, *RPLP0*, *RPLP1*, *RPS11*, *RPS14*, *RPS15*, *RPS2*, *RPS20*, *RPS26*, *RPS27*, *RPS29*, *RPS3A*, *RPS4Y1*, *UBA52*), « **ribosomes cytosoliques** », « **grande sous-unité des ribosomes** » et « **petite sous-unité des ribosomes** » (Figure 49-B).

On retrouve également d'autres gènes régulateurs du processus de traduction modifiés dans la condition CDC25B.

Deux étant surreprésentés dans la condition CDC25B (Figure 48-E) :

IMP3, un composant du complexe 60-80S U3 snoRNP (U3 small nucleolar ribonucleoprotein), ce gène est requis durant les phases précoces du clivage de l'ARN ribosomique pre-18S.

LSM10 (LSM10, U7 Small Nuclear RNA Associated) décrit pour être un régulateur positif de la transition G1/S.

Et un sous-représenté dans la condition CDC25B (Figure 48-D) :

MDM4, inactivateur de la voie de p53. Cette protéine a également été décrite pour interagir avec le facteur E2F1 pour inhiber son activité transcriptionnelle et participe à la dégradation de p21, deux acteurs essentiels à la progression dans le cycle cellulaire (Li and Lozano, 2013).

L'extraction de la liste des gènes impliqués dans ces processus biologiques et composants cellulaires permet donc d'identifier une majorité des gènes qui composent la grande et la petite sous-unité des ribosomes, l'ensemble de ces gènes étant systématiquement surreprésentés dans le transcriptome CDC25B par rapport à la condition contrôle.

c) Conclusion partie 2 : La phosphatase CDC25B module le transcriptome des progéniteurs neuraux

Cette analyse nous permet de conclure que le gain de fonction CDC25B induit un changement du transcriptome des progéniteurs neuraux. En effet, en aval de CDC25B, on constate une diminution de l'expression de gènes régulateurs positifs du cycle cellulaire et surtout, l'augmentation de l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines ribosomiques. En effet, 23 gènes composant la grande et la petite sous-unité des ribosomes sont surreprésentés par rapport à la condition contrôle (**Figure 49-C**). Ces gènes sont des régulateurs importants de la traduction, processus biologique le plus représenté dans la liste de gènes différenciellement exprimés.

Dans la littérature, de nombreux liens ont déjà été établis entre les ribosomes, la machinerie traductionnelle et le destin cellulaire. On sait par exemple que la maintenance de la pluripotence cellulaire et la transition vers la différenciation cellulaire sont étroitement corrélées à une régulation de la biogenèse des ribosomes et de la synthèse protéique (Ni and Buszczak, 2023; Saba et al., 2021a). On sait également, selon le contexte, que la transition d'une cellule pluripotente de l'état prolifératif vers un état de différenciation repose sur une augmentation de la biogenèse des ribosomes accompagnée d'une synthèse protéique accrue (Sanchez et al., 2016). Enfin, il a été montré qu'une altération de la biogenèse des ribosomes est associée à l'apparition de pathologies développementales appelée Ribosomopathies (Ross and Zarbalis, 2014).

L'ensemble de ces informations nous conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle les fonctions neurogéniques de CDC25B reposeraient sur une modulation de la biogenèse des ribosomes et de la machinerie traductionnelle.

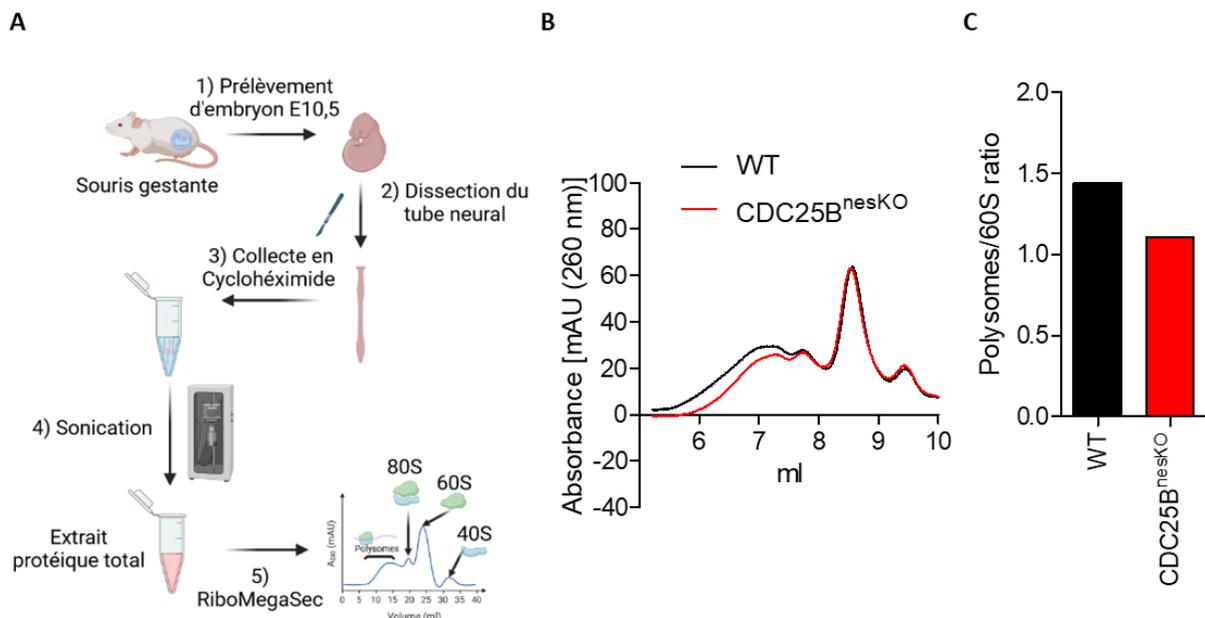


Figure 50. La perte de fonction de CDC25B semble affecter la machinerie traductionnelle des progéniteurs neuraux en diminuant la quantité de ribosomes en traduction (polysomes) :

(A) Schéma récapitulatif des expériences de RiboMegaSec. Ces gestations sont issues du croisement de souris $CDC25B^{+/-}; Nestin-Cre$ avec des souris $CDC25B^{flox/flox}$ (dont les exons 4 à 7 du gène sont flanqués par des sites loxP). Les embryons issus de ce croisement sont soit des mutants conditionnels ($CDC25B^{flox/-}; Nestin-Cre$) ($CDC25B^{nesKO}$), soit des souris ayant un phénotype WT ($CDC25B^{flox/-}; Nestin-Cre$) (WT). Les embryons sont collectés et prélevés séparément jusqu'à détermination de leur génotype. Une fois le génotype déterminé, les tubes neuraux sont poolés pour la sonication et le RiboMegaSec. (B-C) Données issues de l'expérience de RiboMegaSec. (B) Profil de la migration par chromatographie d'exclusion, les différents pics correspondent respectivement de la gauche vers la droite, au pic des polysomes (ribosomes en traduction), de la 80S (Ribosomes/monosomes), de la 60S (grande sous-unité des ribosomes) et de la 40S (petite sous-unité des ribosomes). (C) Ratio Polysomes/60S calculé en faisant le rapport de la somme des absorbances du pic des polysomes sur celle du pic 60S. Ce rapport permet de réaliser une quantification relative des ribosomes en traduction en condition WT et $CDC25B^{nesKO}$. Ces données sont produites à partir de tubes neuraux issus d'une seule portée et cette portée est constituée de 5 embryons WT et 5 $CDC25B^{nesKO}$ embryons.

C. **PARTIE 3** : MODULATION DE LA MACHINERIE TRADUCTIONNELLE EN AVAL DE CDC25B

a) Modulation du nombre de polysomes en aval de CDC25B dans le tube neural aviaire

Ayant observé que de nombreux gènes impliqués dans l'assemblage des ribosomes et la traduction sont sur-représentés dans le transcriptome d'un gain de fonction de CDC25B, nous avons voulu ensuite évaluer si la machinerie traductionnelle est modulée en aval de CDC25B.

Pour cela, nous avons tout d'abord réalisé une quantification des ribosomes en cours de traduction en utilisant la stratégie du Ribo Mega-SEC. Cette stratégie, développée par Yoshikawa et collaborateurs, permet la séparation de la fraction des polysomes et des sous-unités ribosomiques par chromatographie d'exclusion de taille (Yoshikawa et al., 2018).

Ayant à notre disposition dans l'équipe, un modèle murin perte de fonction pour CDC25B, nous avons réalisé cette quantification dans les cellules de tube neural d'embryons de souris.

Cette lignée murine est formée à partir du croisement d'une lignée murine *CDC25B^{fl/fl}* (dont les exons 4 à 7 du gène sont flanqués par des sites loxP) avec une lignée *Nestin-Cre*, qui exprime la Cre recombinase sous le contrôle des éléments régulateurs de Nestin, gènes exprimés dans tous les progéniteurs du système nerveux central. La recombinaison génère un ARNm tronqué, à l'origine d'une perte de fonction de CDC25B dans toutes les cellules du système nerveux central. Cette perte de fonction est totale à partir de E10 et provoque une forte augmentation de la durée de la phase G2 des CPNs. A E11,5, ce rallongement de la durée de la phase G2 dans les progéniteurs est associé à une diminution de la production neuronale dorsale sans affecter le nombre de progéniteurs (Roussat et al., 2023).

Afin d'identifier l'impact précoce de cette perte de fonction sur la machinerie traductionnelle des CPNs, nous avons choisi de réaliser cette expérience au stade E10,5, avant toute modification du ratio neurones/progéniteurs.

Les tubes neuraux d'embryons mutants et contrôles ont donc été collectés par dissection et conservés en cycloheximide afin d'inhiber l'élongation et de maintenir les complexes Ribosomes/ARNm intacts. Les extraits protéiques obtenus à partir de ces échantillons ont

ensuite été transférés sur des colonnes (SEC) pour procéder à la séparation par chromatographie d'exclusion de taille des différentes fractions (**Figure 50-A**).

Lorsque l'on examine le profil des différentes fractions entre la condition CDC25B^{nesKO} et contrôle on voit que les pics ne sont pas alignés. Notamment, les pics correspondant aux polysomes sont plus bas dans la condition CDC25B^{nesKO}, par rapport à la condition WT (**Figure 50-B**). Afin d'estimer l'impact de cette perte de fonction sur la fraction des ribosomes en cours de traduction nous avons fait le rapport de l'aire sous la courbe de la fraction des polysomes avec celle de la fraction 60S. L'analyse de ces fractions révèle une forte diminution de ce ratio en condition CDC25B^{nesKO} par rapport à la condition WT (respectivement 1,10 et 1,44) (**Figure 50-C**).

Ce résultat préliminaire suggère que la perte de fonction de CDC25B dans le tube neural de souris a pour conséquence de réduire la quantité de ribosomes en cours de traduction.

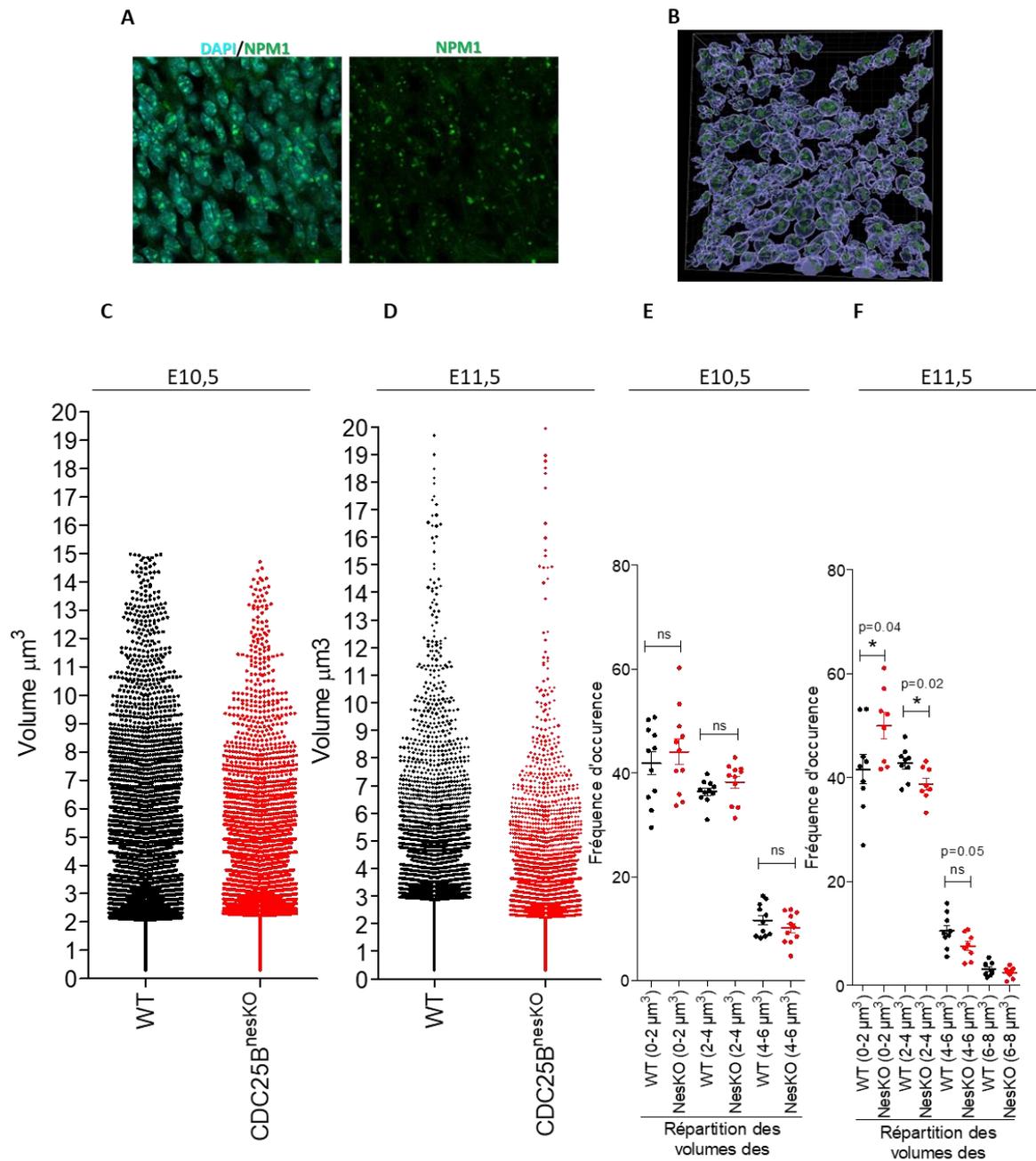


Figure 51. Modulation de la biogenèse des ribosomes à la suite d'une perte de fonction de CDC25B dans le tube neural de la souris :

(A-B) Reconstitution tridimensionnelle des nucléoles réalisée à partir d'immunomarquage des nucléoles par le marqueur NPM1 (Vert) et des noyaux par DAPI (Bleu). Les images correspondent aux noyaux de cellules progénitrices de la région médio-dorsale de souris à E10,5 et E11,5. (C-D) Représentation de la volumétrie de l'ensemble des nucléoles segmentés dans des embryons à WT (noir) et CDC25B^{NesKO} (Rouge). Volumétrie de l'ensemble des nucléoles à E10,5 (C) et à E11,5 (D). (E-F) Représentation de la fréquence de répartition du volume nucléolaire par intervalle de 2 µm³. Fréquence de répartition du volume nucléolaire à E10,5 (E) et à E11,5 (F). L'ensemble de ces données est issu d'images acquises sur 3 embryons WT et 3 embryons CDC25B^{NesKO} issus d'une portée pour chaque stade (E10,5 et E11,5).

b) Modulation de la biogenèse des ribosomes en aval de CDC25B

Ce premier résultat suggère que la perte de fonction de CDC25B induit une altération de la machinerie traductionnelle, en diminuant la quantité de ribosomes en cours de traduction. Nous nous sommes ensuite demandé si cette altération de la machinerie traductionnelle était corrélée à une altération de la biogenèse des ribosomes. Les nucléoles étant le siège de la biogenèse des ribosomes, leur volume est proportionnel au niveau de cette biogenèse (Tiku and Antebi, 2018). Afin d'analyser si CDC25B module la biogenèse des ribosomes nous avons donc marqué les nucléoles par immunofluorescence afin de mesurer leur volume.

Nous avons utilisé un anticorps dirigé contre la nucléophosmine, une protéine nucléolaire codée par le gène *NPM1* et réalisé une reconstruction 3D des nucléoles à l'aide du Logiciel Imaris, afin de calculer leur volume en condition WT et en condition CDC25B^{nesKO}. Cette analyse a été réalisée sur des tubes neuraux de souris à E10,5 et E11,5 dans la zone de progéniteurs situés en région médio-dorsale (**Figure 51-A-B**).

Dans cette analyse, nous observons que le volume des nucléoles est hétérogène quelle que soit la condition en allant de moins de 1 μm^3 à près de 20 μm^3 . Mais le profil de répartition du volume des nucléoles, bien que relativement similaire à E10.5, semble être différent à E11,5. En effet, à E11,5, on voit un abaissement du profil de répartition du volume des nucléoles dans la condition CDC25B^{nesKO}, par rapport à la condition WT. Cet abaissement se traduit par une plus forte représentation de nucléoles à plus petits volumes et une plus faible représentation de nucléoles à volumes élevés en condition CDC25B^{nesKO} (**Figure 51-C-D**).

Lorsque l'on analyse la répartition des nucléoles en fonction de leur volume par intervalles de 2 μm^3 , dans les conditions WT et mutées, on voit que les fréquences d'occurrence dans ces intervalles ne sont pas identiques (**Figure 51-E-F**).

En effet, à E10,5 les proportions des nucléoles ayant un volume compris entre 0 μm^3 à 2 μm^3 sont de 42% \pm 7% et 44% \pm 8% (respectivement WT et CDC25B^{nesKO}). Pour un volume compris entre 2 μm^3 à 4 μm^3 , on retrouve 36% \pm 2% et 38% \pm 4% des nucléoles (respectivement WT et CDC25B^{nesKO}). Et pour un volume entre 4 μm^3 et 6 μm^3 on retrouve 12% \pm 3% et 11% \pm 3 % des nucléoles (respectivement WT et CDC25B^{nesKO}) (**Figure 51-E**).

À E11,5 on constate un différentiel plus marqué pour la condition CDC25B^{nesKO} par rapport à la condition contrôle puisque l'on observe que pour un volume compris entre 0 μm^3 à 2 μm^3 la proportion des nucléoles est significativement augmentée chez les souris mutantes. Cette proportion varie de 42% \pm 8% à 50% \pm 7% (respectivement WT et CDC25B^{nesKO}). Pour les nucléoles ayant un volume compris entre 2 μm^3 et 6 μm^3 on constate la tendance inverse, puisque l'on a significativement moins de nucléoles dans la condition CDC25B^{nesKO} ayant un volume supérieur à 2 μm^3 (53% et 46% respectivement WT et CDC25B^{nesKO}) (**Figure 51-F**).

Ces résultats suggèrent qu'en condition CDC25B^{nesKO}, il y a une plus forte représentation de nucléoles avec un volume < 2 μm^3 et une plus faible représentation de nucléoles avec un volume > 2 μm^3 par rapport à la condition contrôle. Ce phénotype est d'ores et déjà visible à E10,5, et devient significatif à E11,5. Cela suggère que la biogenèse des ribosomes est diminuée dans les progéniteurs neuraux en condition perte de fonction pour CDC25B. Une diminution de la quantité de ribosomes en cours de traduction dans ces embryons serait donc directement corrélée à une diminution globale de la biogenèse des ribosomes.

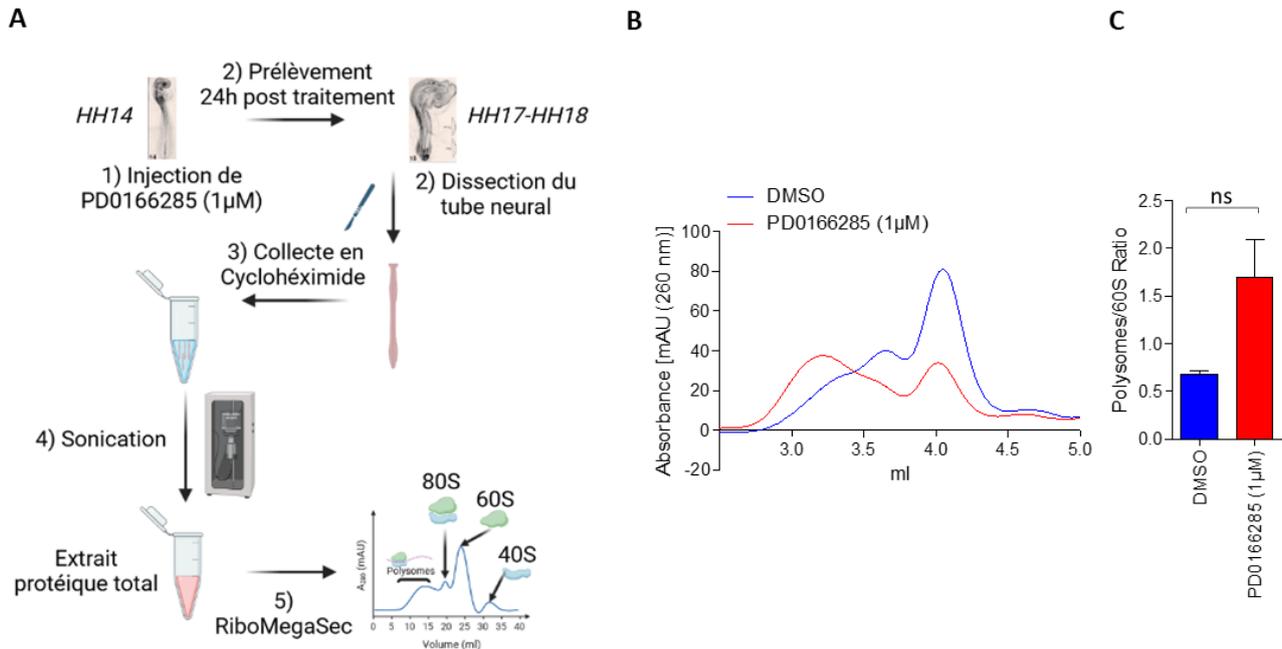


Figure 52. La machinerie traductionnelle est modulée en aval d'une diminution de la durée de la phase G2 :

(A) Schéma récapitulatif des expériences de RiboMegaSec. Les embryons de poulet sont injectés ou non avec une solution de PD0166285 (1 μ M) dans le tube neural aux stades HH13-14 et sont collectés 24h post-traitement aux stades HH17-18. (B-C) Données issues de l'expérience de RiboMegaSec. (A) Profil de la migration par chromatographie d'exclusion, les différents pics correspondent respectivement de la gauche vers la droite, au pic des polysomes (ribosomes en traduction), de la 80S (Ribosomes/monosomes), de la 60S (grande sous-unité des ribosomes) et de la 40S (petite sous-unité des ribosomes). (B) Ratio Polysomes/60S calculé en faisant le rapport de la somme des absorbances du pic des polysomes sur celle du pic 60S. Ce rapport permet de réaliser une quantification relative des ribosomes en traduction en condition contrôle (DMSO en bleu) et traitée (PD0166285 1 μ M en rouge). Ces données sont produites à l'issue de 3 expériences indépendantes et chaque expérience est réalisée à partir de 10 à 13 tubes neuraux disséqués par condition.

c) La diminution de la durée de la phase G2 induit une augmentation de la quantité de polysomes dans les CPNs de tube neural de poulet

Ensuite, nous voulions déterminer si la modulation de la machinerie traductionnelle a lieu en aval d'un changement de la durée de la phase G2. Précédemment, nous avons montré dans le tube neural de poulet, qu'une diminution spécifique de la durée de la phase G2 par inhibiteur pharmacologique, est suffisante pour mimer les fonctions neurogéniques de CDC25B. Nous avons donc décidé d'utiliser à nouveau cet outil pharmacologique pour quantifier la proportion de ribosomes en cours de traduction en aval d'une diminution de la durée de la phase G2.

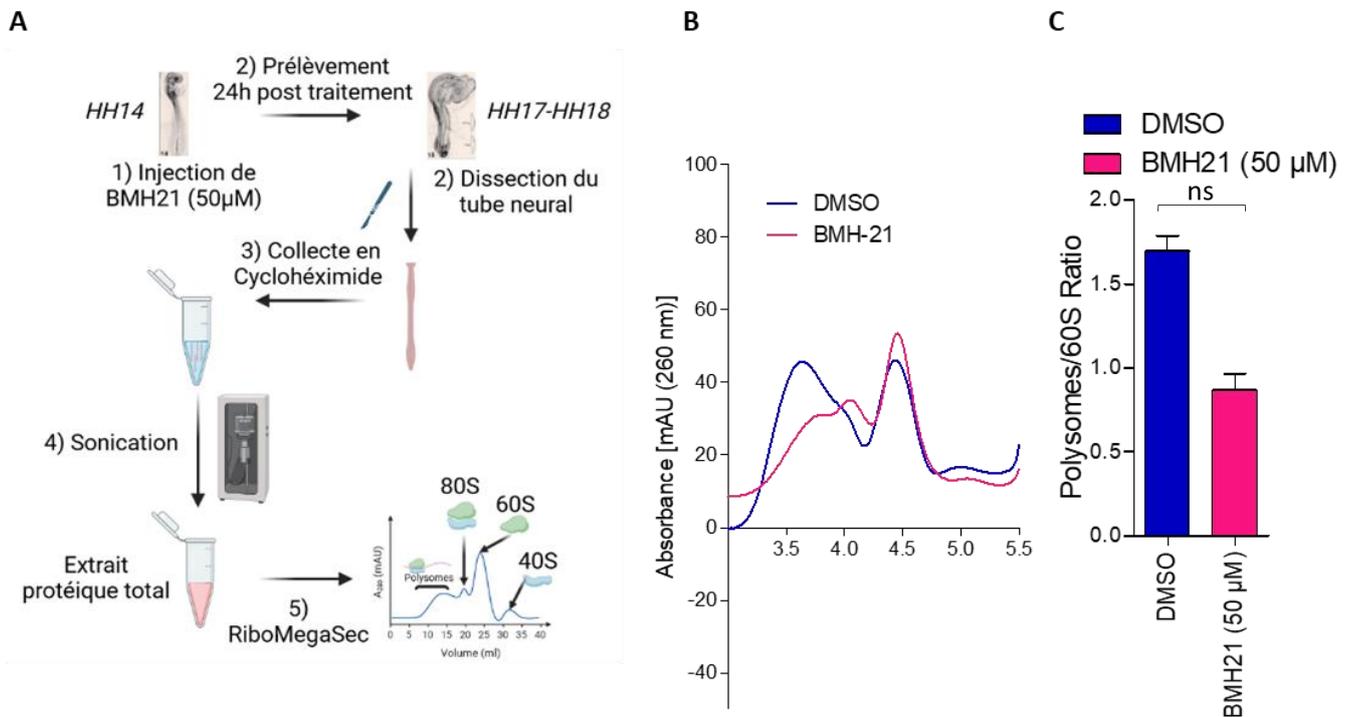
De la même façon que dans la partie précédente, nous avons procédé à la dissection du tube neural de poulet 24h post-traitement. Les tubes sont collectés dans une solution de cycloheximide afin de maintenir les complexes Ribosomes/ARNm intacts, l'extrait total de protéine est ensuite transféré dans une colonne pour procéder à la séparation des fractions par chromatographie d'exclusion de taille (**Figure 52-A**).

L'analyse révèle que le pic des polysomes est plus élevé dans la condition PD0166285 par rapport à la condition Contrôle (**Figure 52-B**). Le calcul du ratio Polysome/60S révèle une augmentation de la quantité de ribosomes en cours de traduction dans la condition traitée par rapport à la condition contrôle ($1,7 \pm 0,7$ et $0,7 \pm 0,1$ respectivement PD0166285 et Contrôle) (**Figure 52-C**).

Ces résultats indiquent qu'une diminution de la durée de la phase G2 induit une modification la machinerie traductionnelle, en augmentant la quantité de ribosomes impliqués dans la traduction.

L'ensemble de ces résultats permet de mettre en évidence que la machinerie traductionnelle des progéniteurs neuraux est modulée en aval de CDC25B. **Au vu de ces premiers résultats on peut se demander s'il y a un lien causal entre cet effet de CDC25B sur la traduction et son action sur le choix du destin des progéniteurs neuraux.**

d) L'inhibiteur de la pol1 (BMH21) induit une diminution de la quantité de polysomes dans les progéniteurs neuraux



Afin de déterminer le lien causal d'une modification de la biogenèse des ribosomes et de la machinerie traductionnelle sur l'équilibre prolifération différenciation des progéniteurs neuraux, nous avons utilisé un inhibiteur de l'ARN polymérase 1, le BMH-21.

L'ARN polymérase 1 étant connue pour participer à la biogenèse des ribosomes en favorisant la transcription de l'ADNr, cette molécule nous permettra d'évaluer l'impact d'une altération de cette biogenèse sur le destin des progéniteurs neuraux (Ferreira et al., 2020).

Le premier objectif était d'établir les meilleures conditions expérimentales d'utilisation de cet inhibiteur. Nous avons donc comparé différents temps d'incubation. Le BMH21 (50 µM) ou du DMSO a été injecté dans le tube neural d'embryons de poulet et ces derniers collectés à 8h

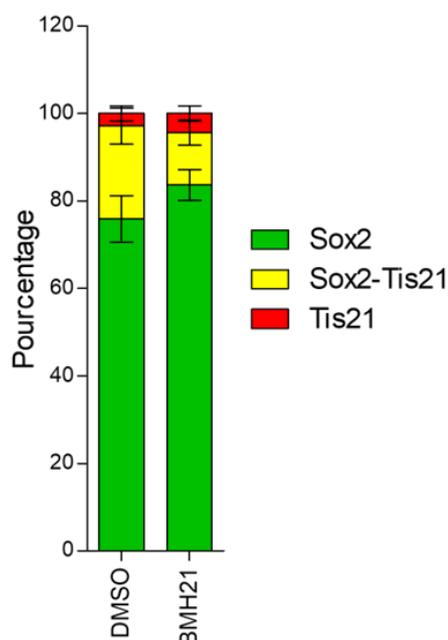
ou 24h post-traitement. Les tubes neuraux ont été disséqués en cycloheximide comme précédemment et regroupés par conditions (10 à 13 tubes neuraux par condition) pour réaliser des extraits protéiques (**Figure 53-A**). Une première analyse nous a permis de voir que la quantité de protéines est trop faible dans les extraits produits à partir d'échantillons récoltés à 8h post-traitement. Nous n'avons donc pas pu analyser plus en avant cette condition (données non montrées).

Dans les extraits protéiques réalisés à partir de tubes neuraux récoltés 24h après traitement, l'analyse en RiboMegaSec révèle que le BMH-21 induit une diminution de la quantité de ribosomes en cours de traduction (**Figure 53-B**). En faisant le ratio Polysomes/60S, cette diminution est quantifiée avec un ratio $1,7 \pm 0,2$ et $0,9 \pm 0,2$ (Respectivement Contrôle et BMH-21). **Ces résultats indiquent que nos conditions expérimentales de traitement au BMH21 permettent d'altérer efficacement la machinerie traductionnelle des CPNs.**

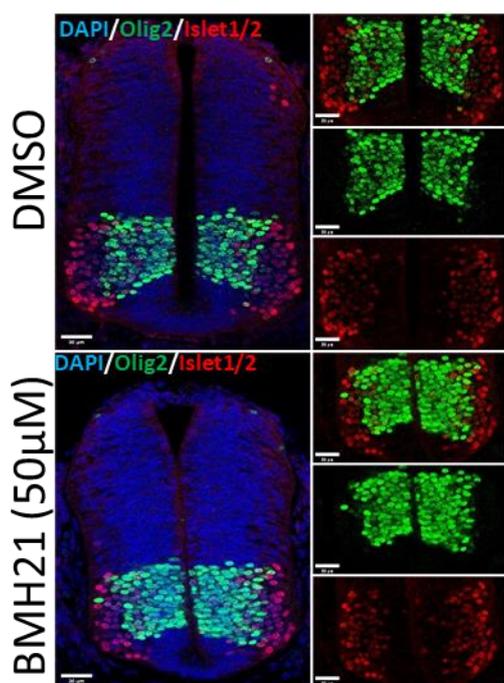
e) L'inhibition de la quantité de ribosomes modifie-t-elle le destin de progéniteurs neuraux ?

Dans un second temps, nous avons donc souhaité déterminer si cette altération de la machinerie traductionnelle était suffisante pour modifier le potentiel différenciatif des progéniteurs neuraux. Pour cela, nous avons testé différentes stratégies. Dans un premier temps, nous avons réalisé des cultures de tronçons de tubes neuraux en présence ou non de BMH-21 afin de mieux contrôler la dose et le temps d'incubation avec cet inhibiteur pharmacologique. Pour ces expériences, nous nous sommes inspirés de la publication suivante (Colis et al., 2014) et avons réalisé différents temps d'incubation de BMH-21 [$1\mu\text{M}$]. Mais aucune de ces expériences ne se sont révélées concluantes à cause d'une forte mortalité et d'une altération de la prolifération cellulaire (Données non montrées).

Nous sommes donc revenus à la stratégie d'injection *in ovo* de cet inhibiteur. Cette injection est précédée d'une co-électroporation des rapporteurs GFP et RFP dont l'expression est régulée respectivement par les promoteurs de Sox2 et de Tis21 décrits dans la partie 1. Les embryons ont été collectés 24h plus tard et une quantification de la proportion des progéniteurs PP, PN et NN a été réalisée (**Cf. histogramme de droite**). La proportion des différents modes de division n'est pas significativement différente dans ces conditions, néanmoins nous constatons quelques variations. Les proportions des divisions PP sont plus élevées en réponse à un traitement BMH-21 par rapport à la condition contrôle (respectivement $84\% \pm 9\%$ et $76\% \pm 15\%$) et la proportion des PN est à l'inverse diminuée (respectivement $12\% \pm 7\%$ et $21\% \pm 12\%$). Enfin, la proportion des NN est quant à elle relativement identique entre les deux conditions (respectivement $4\% \pm 4\%$ et $3\% \pm 5\%$).



Sur ces mêmes embryons nous avons également tentés d'évaluer l'impact de cet inhibiteur sur la neurogenèse ventrale en quantifiant les progéniteurs Olig2⁺ et les motoneurons Islet1/2⁺ (**représentée ci-à gauche**). Mais une forte variabilité inter-expérimentale ne nous permet pas de conclure d'effet du BMH-21 sur la neurogenèse 24h post-traitement (**données non montrées**).



Ces expériences étant pour l'instant préliminaires et toujours en cours de validation, nous ne pouvons pas émettre pour le moment de conclusions concernant l'effet causal d'une altération de la machinerie traductionnelle sur la maturation des progéniteurs neuraux et la production neuronale.

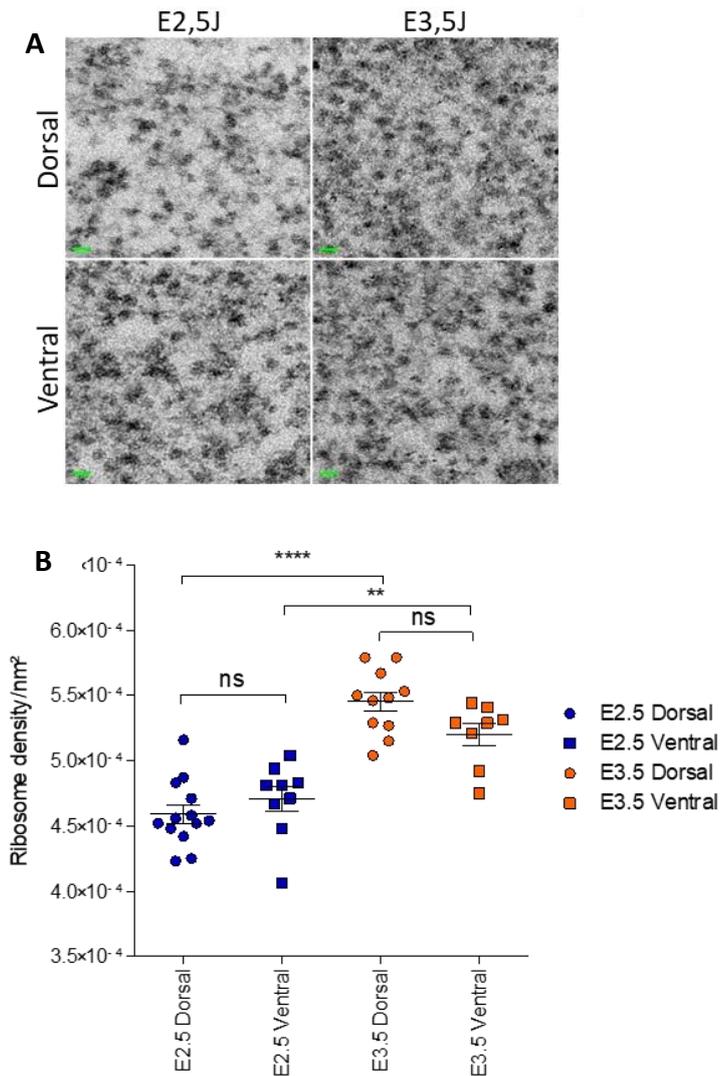


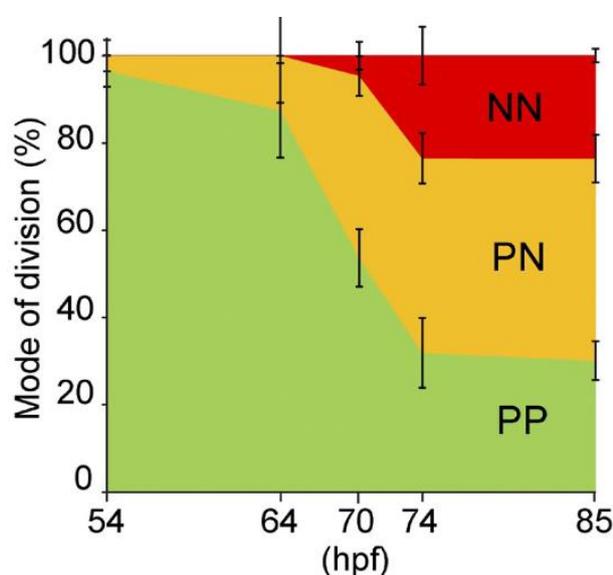
Figure 54. La densité des ribosomes cytoplasmiques semble évoluer avec l'état de maturation des progéniteurs :

(A) Images représentant le cytoplasme d'un progéniteur du tube neural de poulet (à E2.5 et E3.5), acquises au microscope électronique à transmission à un grossissement X15 000. Chaque point noir correspond à un ribosome cytoplasmique. (B) Quantification de la densité cytoplasmique de ribosomes par nm² de progéniteurs de la région dorsale (Ronds) et ventrale (Carrés) du tube neural d'un embryon à E2.5 (Bleu) et d'un embryon à E3.5 (Orange). Chaque point correspond à la moyenne de densité cytoplasmique d'une cellule, générée à partir de 3 régions cytoplasmiques périnucléaires.

En parallèle de ces expériences, nous souhaitons développer une stratégie complémentaire à celle du RiboMegaSec. Cette dernière nous communique une information globale de l'état de traduction le long de l'axe antéro-postérieur et dorso-ventral. Mais comme mentionné précédemment la progression de la neurogenèse est dynamique et progressive le long de ces axes. Nous voulions donc réaliser une analyse de « l'état traductionnel » à l'échelle cellulaire. Pour cela nous avons, en collaboration avec l'équipe de Célia Plisson-Chastang, quantifié la densité ribosomes cytoplasmiques sur des coupes transversales de tubes neurax de poulet à E2.5 (HH12-13) et E3.5 (HH17-18), à partir d'acquisitions réalisées au microscope électronique à transmission (Figure 54-A).

Nous avons calculé la densité de ribosomes cytoplasmiques de progéniteurs du tube neural en région dorsale et en région ventrale à E2,5 et à E3.5 et comparé ces résultats entre eux.

La quantification des densités de ribosomes cytoplasmiques ne révèle aucune différence significative entre « l'état traductionnel » des progéniteurs ventraux et des progéniteurs dorsaux, bien que des tendances soient observées (**Figure 54-B**). En effet, à E2.5 les progéniteurs ventraux semblent avoir une densité cytoplasmique de ribosomes plus élevée que celle de la région dorsale. Cette tendance est inversée à E3.5. Néanmoins en comparant la densité en ribosomes des progéniteurs ventraux et dorsaux entre les 2 stades, nous constatons une augmentation globale de la densité des ribosomes dans des progéniteurs à E3.5 par rapport à E2.5 (**Figure 54-B**). De façon intéressante, ce différentiel de densité cytoplasmique entre ces deux stades corrèle avec un changement du mode de division de progéniteurs neuraux. On sait en effet, qu'à E2.5 la majorité des progéniteurs neuraux dans le



tube neural de poulet sont dans un état prolifératif et réalisent des divisions PP. À l'inverse à E3.5, les progéniteurs réalisent une transition drastique des modes de division PP vers des modes de division PN et NN (**Cf. graphique de gauche issu de : (Le Dréau et al., 2014)**). Ainsi à E2.5, les progéniteurs neuraux, fortement prolifératifs, ont une densité cytoplasmique de ribosomes plus faible que celle des progéniteurs plus matures et plus engagés vers un destin neurogénique.

Ces résultats, bien que préliminaires, suggèrent qu'un changement de l'état maturation des progéniteurs neuraux est concomitant avec une modulation de l'état traductionnel cellulaire. Après avoir validé ces observations par d'autres expériences, nous souhaiterions aller plus loin en réalisant une analyse sur des cellules spécifiques.

Avec l'équipe de Célia Plisson-Chastang et la plateforme de microscopie électronique à transmission (METi), nous mettons actuellement au point les conditions expérimentales sur embryons de poulet pour détecter de la fluorescence sur tissus cryo-fixés. L'objectif sera *in fine*, de quantifier par analyse corrélative la densité des ribosomes de façon cellule spécifique, après électroporation de différents rapporteurs (Sox2-GFP/Tis21-RFP ou FUCCI-G1 ou FUCCI/S/G2 etc...).

f) Conclusion partie 3 : La biogenèse des ribosomes et la machinerie traductionnelle des progéniteurs neuraux semblent être modulées en aval de CDC25B et d'une modification de la phase G2

Les résultats obtenus avec différentes approches, s'ils doivent encore être confirmés, vont tous dans le même sens et suggèrent que la machinerie traductionnelle des progéniteurs neuraux est modulée en aval de CDC25B et que cette modulation est corrélée à une modification de la biogenèse des ribosomes. Par ailleurs j'ai montré par une approche pharmacologique que la modulation de la machinerie traductionnelle était régulée en aval d'une modification de la durée de la phase G2.

Ces données sont en adéquation avec les données issues du RNA-Seq décrites en partie 2, qui montrent une surreprésentation de transcrits codant pour des protéines impliquées dans les processus de traduction et de biogenèse des ribosomes.

L'ensemble de ces résultats des parties 1 à 3 révèlent donc un lien entre la modulation de la longueur de la phase G2 en aval de CDC25B, la biogénèse des ribosomes et le choix du destin des progéniteurs neuraux spinaux. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour établir s'il y a un lien causal entre la modulation de la machinerie traductionnelle et l'équilibre entre prolifération et différenciation des progéniteurs neuraux en aval de CDC25B.

D. **PARTIE 4 : IMPORTANCE DE LA DYNAMIQUE DE LA PHASE G2 DANS LA REGULATION DE LA MATURATION DES PROGENITEURS NEURAX CHEZ L'HUMAIN**

Dans un projet annexe et complémentaire à mes travaux de thèse, nous avons souhaité également caractériser si l'importance de la dynamique de la phase G2 dans le contrôle de la maturation des progéniteurs neurax est également conservée dans un organe plus complexe, le cortex Humain.

a) **Contexte et stratégie expérimentale :**

Nous savons d'après des données de single cell RNA-Seq réalisé dans le cortex murin (Telley et al., 2019) et des données de l'équipe (Roussat et al., 2023), que CDC25B est fortement exprimé dans les progéniteurs apicaux (aRGs), faiblement exprimé dans les progéniteurs basaux intermédiaires (bIPs) et pas du tout exprimé dans les neurones. Les fonctions de CDC25B durant la neurogenèse précoce du développement du cortex murin ayant été explorées dans l'équipe (Roussat et al., 2023), nous savons qu'une perte de fonction de CDC25B est associée à une augmentation transitoire de la différenciation neuronale associée à une diminution du nombre de progéniteurs basaux intermédiaires (bIPs). Des expériences de sauvetage par raccourcissement de la durée de la phase G2 *via* l'utilisation de l'inhibiteur pharmacologique PD0166285, dans un contexte CDC25B^{nesKO}, permettent de rétablir une proportion normale de progéniteurs bIPs. Ainsi, en modulant la durée de la phase G2, CDC25B promeut la maturation des progéniteurs corticaux et maintient un équilibre entre neurogenèse directe et indirecte au cours des phases précoces du développement cortical murin (Roussat et al., 2023).

Dans ce contexte, la dynamique de la phase G2 semble jouer un rôle majeur et prédominant au cours des phases précoces du développement du cortex. Nous voulions donc, par une approche de biologie évolutive du développement (évo-dévo), confirmer que ce rôle de la dynamique de la phase G2 est également conservé au cours du développement du cortex Humain.

Pour cela, en collaboration avec Thomas Jungas au CBI, nous avons décidé d'utiliser le modèle des organoïdes cérébraux Humains (HCO) développé par Madeline Lancaster (Lancaster et al., 2013). Ces organoïdes sont développés à partir de cellules souches pluripotentes induites

humaines (hIPS). Les hIPS sont soumises à différentes étapes de cultures et chacune de ces étapes oriente de plus en plus les cellules souches vers un destin de cellules souches corticales (décrites en **Figure 55-A**).

Ce modèle de culture tridimensionnelle est décrit pour récapituler l'architecture du tissu ainsi que la diversité cellulaire que l'on retrouve dans un tissu aussi complexe que le cortex humain (Lancaster et al., 2013). Il permet de réaliser des études d'un point de vue morphologique, cellulaire et moléculaire dans des contextes physiologiques ou pathologiques. Cependant, la dynamique du cycle cellulaire au cours de phases précoces de développement a été peu caractérisé dans ce système.

C'est pourquoi, nous avons pour débiter ce projet deux objectifs principaux : Le premier était de caractériser la dynamique du cycle cellulaire des progéniteurs corticaux Humain dans ce modèle d'organoïdes. Le second objectif, était de moduler la durée de la phase G2 par inhibiteur pharmacologique et d'évaluer l'impact de cette modification sur la maturation des progéniteurs corticaux Humains.

Afin de nous placer dans une fenêtre temporelle dans laquelle la neurogenèse précoce corticale est initiée, avec une majorité de progéniteurs apicaux (aRGs) et un début de production de progéniteurs basaux intermédiaires (bIPs), nous avons décidé de nous placer à 25 jours de cultures, soit 15 jours après le début des étapes de maturation des organoïdes.

L'ensemble des données présentées ci-dessous, sont des données préliminaires issues d'une seule expérience réalisée sur différents groupes d'organoïdes cérébraux.

b) Caractérisation de la durée de la phase G2 dans des structures corticales des organoïdes cérébraux humains WT :

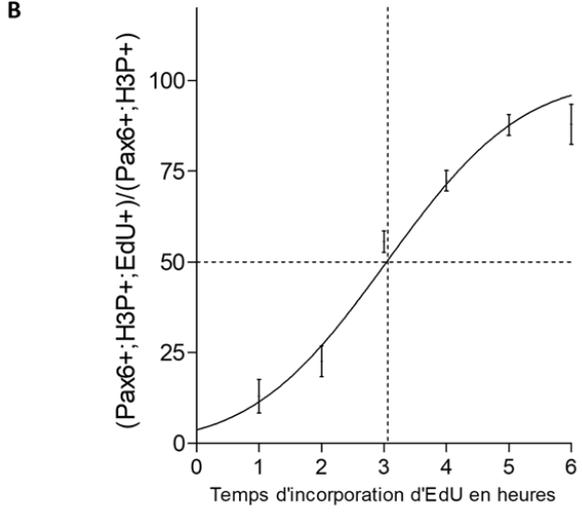
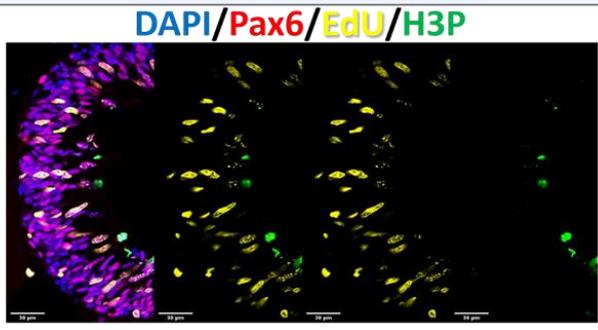
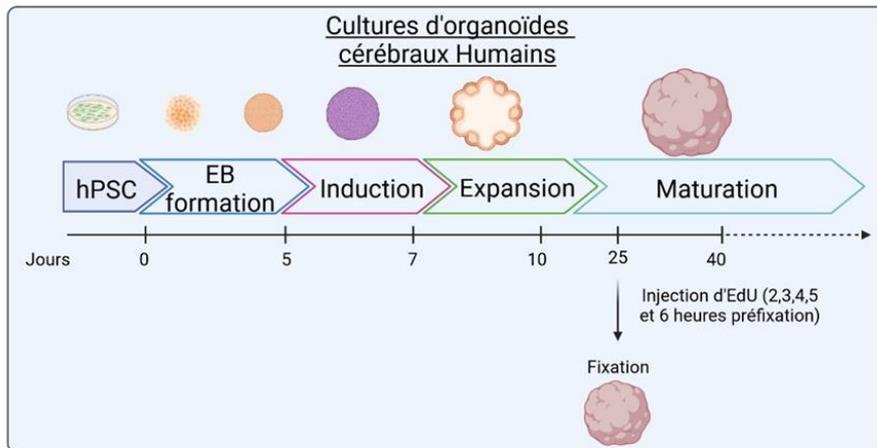


Figure 55. Durée moyenne de la phase G2 dans les progéniteurs Pax6+ des organoïdes cérébraux humains en condition WT :

(A) Stratégie de cultures d'organoïdes. Les organoïdes sont produits à partir de cellules souches pluripotentes humaines. Ces cellules ont subi différentes étapes de cultures décrites dans le matériel et méthode, pour former des organoïdes cérébraux (B) Les organoïdes cérébraux sont collectés à 25 jours de culture, après avoir réalisé sur différents lots une incorporation d'EdU à 6h, 5h, 4h, 3h, 2h, et 1h préfixation. Après fixation, les organoïdes sont coupés au cryostat et un immunomarquage est réalisé pour marquer les cellules en phase S (EdU en Jaune) et les cellules en mitoses (H3P en vert). Le ratio des cellules doublement positives (H3P⁺ ; EdU⁺) sur la totalité des cellules électroporées H3P⁺ dans les domaines de progéniteurs Pax6⁺ a été réalisé pour estimer la durée moyenne de la phase G2. La durée moyenne de la phase G2 est indiquée par les traits en pointillés. Chaque point est représentatif de la moyenne des données issues de 9 structures corticales issues de 3 organoïdes cérébraux indépendants par conditions.

Nous avons dans un premier temps caractérisé la durée moyenne de la durée de la phase G2 des progéniteurs corticaux. Pour cela, nous avons utilisé comme dans la partie 1, la stratégie du double marquage EdU et H3P et calculé le ratio (H3P⁺ ; EdU⁺) / H3P⁺ dans les domaines marqués Pax6⁺, marqueur spécifique des progéniteurs apicaux (AP).

L'incorporation d'EdU a été réalisée dans des groupes d'organoïdes différents à 6h, 5h, 4h, 3h, 2h et 1h préfixation. A l'issue de cette analyse, nous obtenons une courbe de croissance d'incorporation d'EdU qui nous permet d'estimer la durée moyenne de la phase G2 dans notre

système. La durée moyenne de cette phase étant estimée en se référant sur l'axe des abscisses au point correspondant à un ratio $(H3P^+ ; EdU^+) / H3P^+$ de 50% (Figure 55-A-B).

Nous avons donc déterminé que la durée moyenne de la phase G2 des progéniteurs corticaux dans ces organoïdes est de l'ordre de 3h.

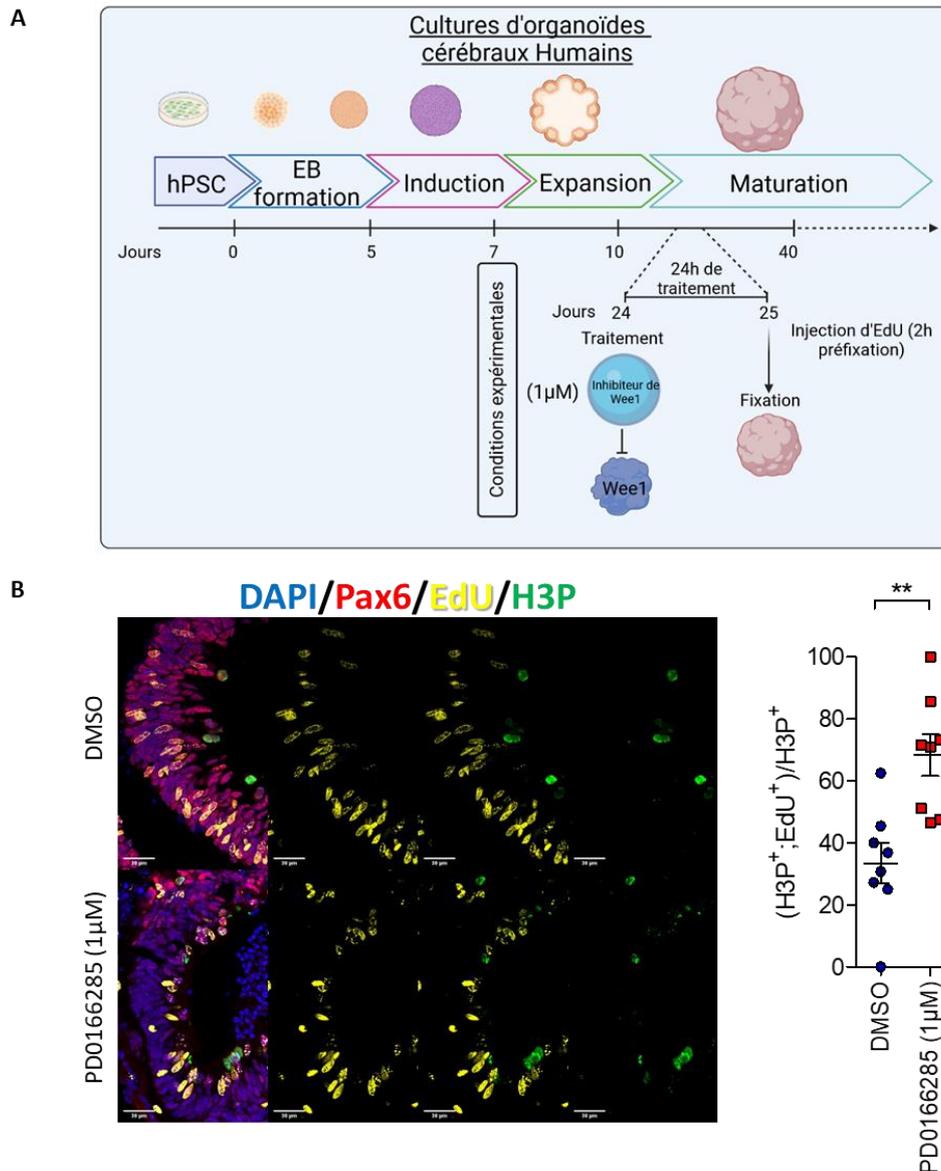


Figure 56. L'inhibiteur de Wee1 (PD0166285) réduit la durée de la phase G2 des progéniteurs Pax6+ humains :

(A) Stratégie de cultures d'organoïdes. Les organoïdes sont produits à partir de cellules souches pluripotentes humaines. Ces cellules ont subi différentes étapes de cultures décrites dans le matériel et méthode, pour former des organoïdes cérébraux. À 24 jours de culture, les organoïdes sont soumis, au traitement pharmacologique DMSO (Contrôle) ou PD0166285 (1 μM). (B) Les organoïdes sont collectés et fixés 24 heures post-traitement et un immunomarquage est réalisé pour marquer les cellules en phase S (EdU en Jaune) et les cellules en mitoses (H3P en vert). Le ratio des cellules doublement positives $(H3P^+ ; EdU^+)$ sur la totalité des cellules électroporées $H3P^+$ dans le domaine de progéniteurs $Pax6^+$ a été réalisé pour estimer l'impact du traitement pharmacologique sur la durée moyenne de la phase G2. Chaque point est représentatif des données issues d'une structure corticale et l'ensemble de ces points est issu de 3 organoïdes cérébraux par conditions.

c) L'inhibiteur pharmacologique PD0166285 provoque une diminution de la durée de la phase G2 :

Afin de déterminer l'impact de l'inhibiteur pharmacologique PD0166285 sur la durée de la phase G2, nous avons remplacé le milieu de culture à J24 avec un milieu contenant ou non du PD0166285 (1 μ M) et procédé à une incorporation d'EdU 2 heures préfixation (J25) (**Figure 56-A**).

Pour estimer l'impact de cet inhibiteur sur la durée de la phase G2 nous avons calculé le ratio (H3P⁺ ; EdU⁺) / H3P⁺ dans les domaines marqués Pax6⁺ de la condition contrôle et de la condition traitée. Les résultats de cette analyse révèlent que ce ratio est significativement augmenté en condition traitée par rapport à la condition contrôle (respectivement 67% \pm 8% et 34% \pm 14%) **Figure 56-B**).

L'augmentation de ce ratio suggère que le PD0166285 induit une diminution de la durée de la phase G2 dans les progéniteurs corticaux dans ces organoïdes.

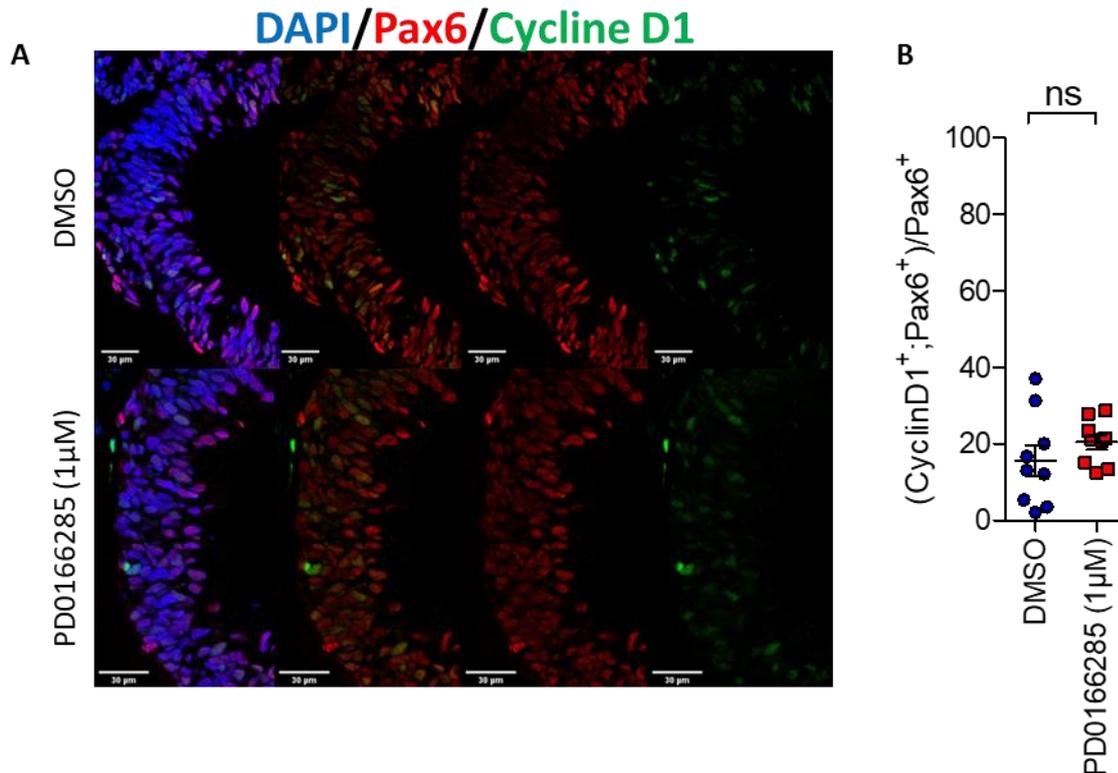


Figure 57. L'inhibiteur de Wee1 (PD0166285) n'impacte pas significativement la proportion progéniteurs Pax6+ en phase G1 :

(A) Immunomarquage de structures corticales réalisé sur des organoïdes contrôles (DMSO) et traités (PD0166285 1 μ M). Les noyaux DAPI (Bleu), les progéniteurs Pax6+ (Rouge) et les cellules en phase G1 marquées cycline D1 (Vert). (B) Calcul de la proportion des cellules doublement marquées Cycline D1⁺ ; Pax6⁺ sur le nombre total de cellules Pax6⁺. Chaque point est représentatif des données issues d'une structure corticale et l'ensemble de ses points est issu de 3 organoïdes cérébraux par conditions.

d) Détermination de la spécificité du PD0166285 sur la phase G2 des progéniteurs corticaux :

Pour vérifier si l'effet du PD0166285 était spécifique de la phase G2, nous avons commencé à évaluer l'impact de cet inhibiteur sur les autres paramètres du cycle cellulaire.

Nous avons commencé par évaluer l'impact du PD0166285 sur la proportion des cellules en phase G1. Pour cela, les cellules en phase G1 ont été quantifiées grâce au marqueur Cycline D1 (Figure 57-A). L'analyse nous indique que la proportion des cellules en phase G1 est de 16% \pm 12% en condition contrôle et de 21% \pm 6% pour la condition traitée. D'un point de vue statistique, aucune différence significative de la proportion des cellules en phase G1 n'est observée entre ces deux conditions (Figure 57-B). Nous sommes à l'heure actuelle en train de

produire de nouveaux lots d'organoïdes pour tester l'effet du PD0166285 sur la longueur de la phase S et du cycle total pour confirmer la spécificité de son action sur la phase G2.

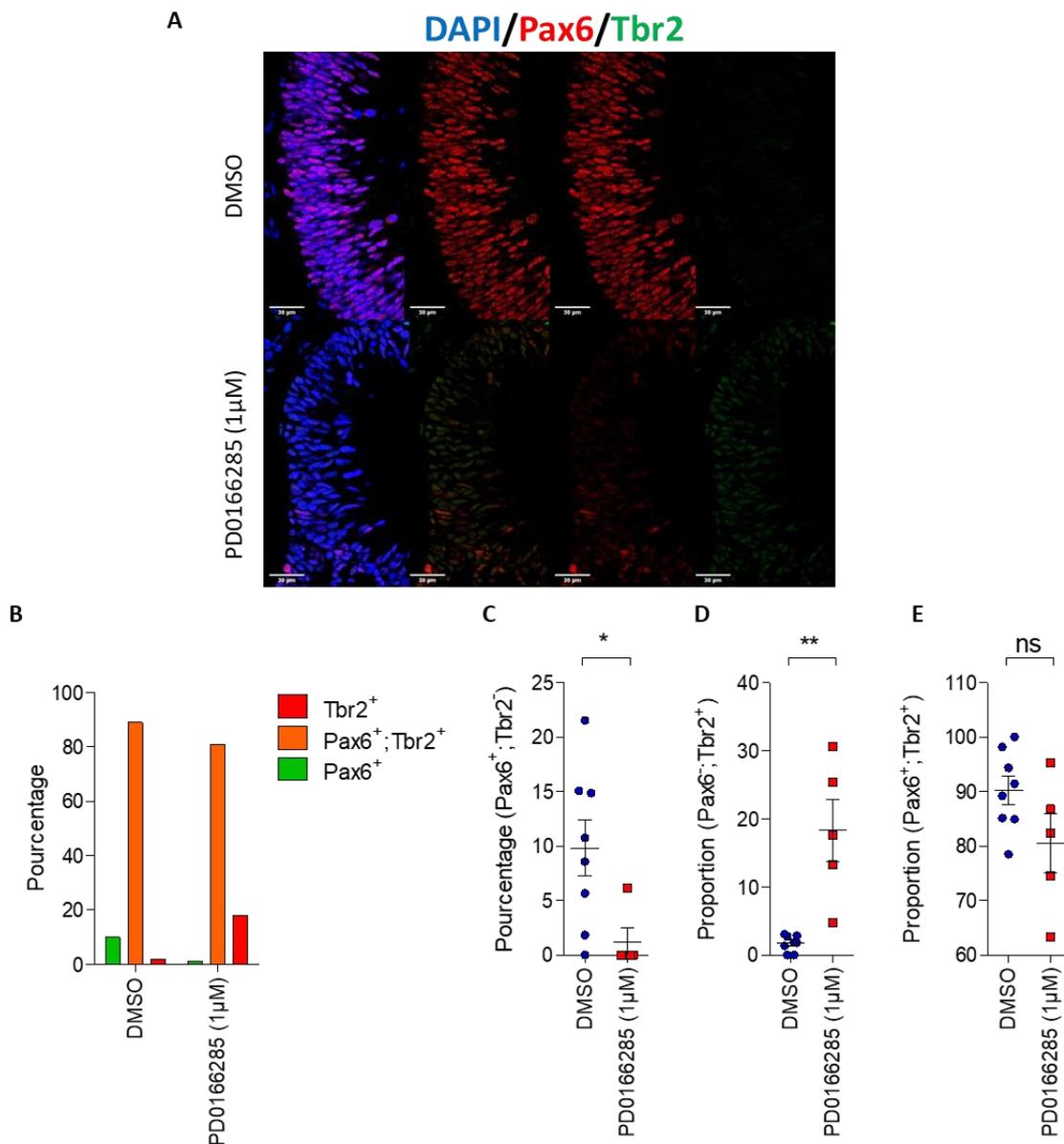


Figure 58. L'inhibiteur de Wee1 (PD0166285) semble provoquer une maturation précoce des progéniteurs apicaux (aRGs) en progéniteurs basaux (bIPs) :

(A) Immunomarquage sur structures corticales d'organoïdes contrôles (DMSO) et traités (PD0166285 1 μM). Les noyaux DAPI (Bleu), les progéniteurs Pax6+ (Rouge) et des progéniteurs Tbr1+ (Vert). (B) Proportion moyenne des cellules Pax6+ (Progéniteurs Apicaux), des Pax6+ ; Tbr2+ (Progéniteurs Apicaux marqués Tbr2+) et Pax6- ; Tbr2+ (Progéniteurs Basaux). (C-D) Représentations individuelles des différentes populations cellulaires, en condition contrôle et en condition PD0166285. Chaque point représente la proportion d'un type cellulaire d'une structure corticale. L'ensemble de ces points est issu de 3 organoïdes cérébraux différents par conditions.

e) Détermination de l'effet d'une modulation de la durée de la phase G2, sur le ratio aRGs/bIPs :

Enfin, nous avons déterminé si un raccourcissement de la durée de la phase G2 était suffisant pour modifier la proportion de progéniteurs aRGs/bIPs. Pour cela nous avons réalisé des immunomarquages et quantifié les progéniteurs apicaux (Pax6⁺ ; Tbr2⁻) et (Pax6⁺ ; Tbr2⁺), et les progéniteurs basaux intermédiaires (Pax6⁻ ; Tbr2⁺) (**Figure 58-A**).

L'analyse révèle que 24 heures post-traitement, la proportion de (Pax6⁺ ; Tbr2⁻) est de 11% ± 6% pour la condition contrôle et de 2% ± 3% pour la condition traitée ; la proportion de (Pax6⁺ ; Tbr2⁺) est de 87% ± 5% pour la condition contrôle et de 76% ± 10% pour la condition traitée ; la proportion de (Pax6⁻ ; Tbr2⁺) est de 1% ± 1% pour la condition contrôle et de 22% ± 7% pour la condition traitée. Seule la variation (Pax6⁺ ; Tbr2⁻) est statistiquement significative (**Figure 58-B-D**).

Ces résultats préliminaires suggèrent qu'une diminution de la durée de la phase G2 pourrait être associée à un changement de la maturation des progéniteurs corticaux Humains. Ceci indiquerait que l'importance de la durée de phase G2 pour la maturation des progéniteurs corticaux observé chez la souris est conservé chez l'homme.

f) Conclusion partie 4 : L'importance de la dynamique de la phase G2 pour la maturation des progéniteurs corticaux observée chez la souris, semble être conservés dans le cortex Humain

L'ensemble de ces données nous ont permis de caractériser la dynamique de certaines phases du cycle cellulaire dans ce modèle pendant les phases précoces du développement. Nous avons également établi les conditions de diminution de la phase G2 par traitement pharmacologique au PD0166285 dans ce système. En revanche, il nous reste à confirmer que cet inhibiteur n'affecte pas les autres paramètres du cycle cellulaire.

Des résultats préliminaires suggèrent que la diminution de la durée de la phase G2 est associée à une modulation de la maturation des progéniteurs corticaux, en favorisant une diminution de la proportion des progéniteurs aRGs (majoritairement prolifératifs), et une augmentation des progéniteurs bIPs (majoritairement neurogéniques). Ces résultats suggèrent donc que le rôle de la dynamique de la phase G2 sur la maturation des progéniteurs neurax corticaux est conservée chez l'Humain.

E. CONCLUSION GENERALE : PARTIE RESULTAT

A l'issue de mes travaux de thèse, j'ai pu déchiffrer et caractériser les mécanismes qui sont mis en place en aval de CDC25B au cours de la neurogenèse précoce. J'ai d'abord montré qu'une diminution de la durée de la phase G2 est suffisante pour mimer, au moins en partie, les fonctions neurogéniques de CDC25B. Par conséquent, une diminution de la durée de la phase G2 est causale pour le changement de l'équilibre prolifération/différenciation des progéniteurs neuraux du tube neural, et favorise leur maturation et leur différenciation. Par ailleurs, j'ai également pu décrire à l'échelle du transcriptome les principaux événements moléculaires et processus biologiques recrutés en aval de CDC25B dans le tube neural en développement. Une surexpression de CDC25B induirait une sur-représentation de gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes et la machinerie traductionnelle. Par ailleurs, des expériences de perte de fonction de CDC25B, suggèrent que CDC2B module la machinerie traductionnelle des progéniteurs neuraux et que cette modulation serait corrélée à une modification de la biogenèse des ribosomes. De plus, par approche pharmacologique, j'ai montré que la modulation de la quantité de ribosomes en traduction était régulée en aval d'un changement de la durée de la phase G2. L'ensemble de ces données suggèrent donc un lien entre CDC25B, une modulation de la machinerie traductionnelle et de la durée de la phase G2 et du destin des progéniteurs neuraux.

Cependant, pour l'instant, aucun lien causal entre une altération de la machinerie traductionnelle et une modulation du potentiel différenciatif des progéniteurs neuraux n'a été mis en évidence. Néanmoins des données préliminaires très encourageantes, suggèrent que la densité des ribosomes cytoplasmiques est dynamique au cours du développement embryonnaire du tube neural du poulet. En effet, il semblerait qu'une augmentation de la densité cytoplasmique des ribosomes soit concomitante avec un switch des progéniteurs neuraux d'un mode de division PP vers PN et NN.

Au cours de ma thèse, j'ai également eu l'opportunité d'explorer un nouveau modèle, les organoïdes cérébraux Humains, grâce auquel j'ai pu obtenir des résultats préliminaires prometteurs et encourageants. En effet, j'ai pu caractériser dans ce modèle certains paramètres du cycle cellulaire au cours des phases précoces de neurogenèse, comme la durée de la phase G2 et la proportion des cellules en phase G1 en condition WT. J'ai également pu confirmer que l'inhibiteur pharmacologique PD0166285 est capable d'induire une diminution

de la durée de la phase G2, et que cette diminution est associée à une augmentation de la proportion de progéniteurs bIPs, progéniteurs majoritairement neurogéniques et une diminution de la proportion de progéniteurs aRGs, progéniteurs majoritairement prolifératifs. Même si je n'ai pas pu confirmer la spécificité de cet inhibiteur sur la phase G2, on peut néanmoins considérer qu'un changement de la durée de la phase G2 est en partie associé à un changement de la maturation des progéniteurs corticaux.

Ces travaux, ont permis d'aller plus loin dans la caractérisation des fonctions neurogéniques de CDC25B, en décrivant une nouvelle voie modulée en aval de cette protéine : la régulation de la machinerie traductionnelle et la biogenèse des ribosomes. Ces travaux ont également permis de caractériser l'importance de la durée de la phase G2 dans la régulation de l'équilibre prolifération et différenciation des progéniteurs neurax spinaux.

IX. DISCUSSION / PERSPECTIVES

Le premier objectif de ce projet était de caractériser l'effet causal d'une modulation de la phase G2 sur le destin des progéniteurs neuraux chez les vertébrés. Le second objectif était d'identifier et de caractériser les événements moléculaires et processus biologiques mis en place en aval de l'action de CDC25B au cours de la neurogenèse précoce chez les vertébrés. Enfin, ayant identifié que la traduction est le processus biologique le plus modulé en aval de l'action de CDC25B, mon troisième objectif, était d'explorer s'il existe des liens entre modulation de la machinerie traductionnelle et destin cellulaire. Dans les trois parties qui suivent, je vais discuter des résultats obtenus.

A. **PARTIE 1 : LE RACCOURCISSEMENT DE LA PHASE G2 EST SUFFISANT POUR MIMER PARTIELLEMENT LES FONCTIONS NEUROGENIQUES DE CDC25B**

1. **DANS LE TUBE NEURAL DE POULET**

Au cours de ma thèse je me suis intéressé à l'importance de la dynamique de la phase G2 dans la régulation de l'équilibre prolifération/différenciation et si une modulation de cette phase est causale de l'initiation de la différenciation. Pour répondre à cette question je disposais d'un inhibiteur pharmacologique de Wee1/Myt1 (des inhibiteurs de CDK1).

Mes résultats montrent que **l'inhibiteur de Wee1/Myt1 réduit spécifiquement la durée de la phase G2 sans affecter le taux de prolifération des progéniteurs neuraux. Cette modulation de la phase G2, entraîne une augmentation la proportion des divisions neurogéniques symétriques au dépend des divisions prolifératives et la production neuronale.** Ces résultats confirment que la diminution de la durée de la phase G2 est causale d'une initiation de la différenciation des progéniteurs neuraux. Néanmoins nous ne pouvons pas exclure que ce changement d'identité cellulaire ne soit pas uniquement dû à la modulation de la durée de la phase G2, puisque bien que non significative, nous observons une augmentation de la durée de la phase S de l'ordre de 30 minutes par rapport à la condition contrôle.

Wee1 est connue pour être un régulateur de la transition G2-M mais également du checkpoint de la phase S. Il a été reporté qu'une inhibition de cette protéine, stratégie largement utilisée comme thérapie anti-cancéreuse, pouvait être à l'origine de stress répliatif. Ce stress peut induire une dégradation de la fourche de réplication, à l'origine d'un ralentissement de la

durée de la phase S et/ou de la transition G2/M, d'un arrêt du cycle cellulaire et d'une induction de la mort cellulaire (Bukhari et al., 2019; Elbæk et al., 2022). Ainsi dans mes expériences, l'inhibiteur PD0166285 pourrait provoquer un léger ralentissement de la durée de la phase S des progéniteurs neuraux.

Comme mentionné en chapitre 2, la diminution de la durée de la phase S est concomitante avec une induction de la différenciation des progéniteurs neuraux dans de nombreux contextes biologiques (Arai et al., 2011; Hardwick et al., 2015; Lanctot et al., 2017; Le Dréau et al., 2014; Molina et al., 2022; Saade et al., 2013). Une étude a cependant mis en évidence dans le tube neural de poulet qu'un allongement de la durée de la phase S était progressif le long de l'axe antéro-postérieur du tube neural (Olivera-Martinez et al., 2014). Dans la zone du mésoderme pré-somitique, la durée de la phase S est plus faible que dans les zones du tube neural caudal et antérieur. Selon cette étude, un allongement de la phase S permet aux NPCs d'activer des programmes épigénétiques à l'origine d'un remodelage du transcriptome (Olivera-Martinez et al., 2014). Mais cet allongement progressif de la durée de la phase S est accompagné par un allongement de la durée totale du cycle cellulaire, or dans nos conditions, nous n'avons observé aucune variation de cette durée.

Bien que le taux de prolifération et l'index mitotique ne soient pas affectés par l'inhibiteur pharmacologique, ces données sont issues d'une seule expérience et nécessitent d'être complétées pour consolider nos données sur la spécificité du PD0166285 sur la durée de la phase G2.

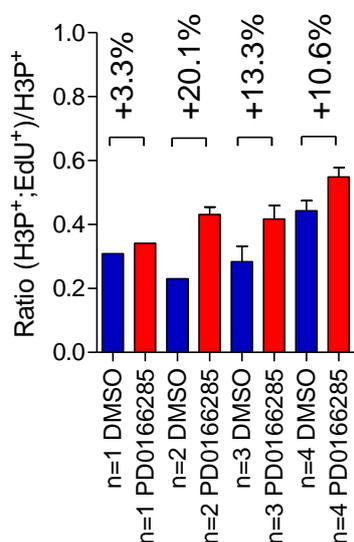


Figure 59. Variabilité inter-expérimentale de l'incorporation d'EdU :

Histogramme représentant le ratio $(H3P^+ ; EdU^+) / H3P^+$ des 4 expériences indépendantes réalisées pour déterminer l'impact de l'inhibiteur pharmacologique PD0166285 (Rouge) sur la durée de la phase G2, par rapport à la condition contrôle DMSO (Bleu).

Chaque histogramme correspond à la moyenne des ratios de l'ensemble des embryons par expérience, l'absence d'écart-type correspond aux expériences où un seul embryon n'a été collecté. Les pourcentages indiqués au-dessus de chaque histogramme correspondent au différentiel entre la condition traitée par rapport à la condition contrôle.

Concernant la durée de la phase G2, bien que l'impact de l'inhibiteur pharmacologique sur le ratio $(\text{H3P}^+ ; \text{EdU}^+) / \text{H3P}^+$ soit systématique (à l'exception de la première expérience), ce ratio dans la condition contrôle d'une expérience à l'autre est relativement variable. Cette variabilité, comme observé dans l'histogramme ci-dessus, n'est pas due à une variabilité d'incorporation d'EdU inter-individuelle, mais plutôt à une variabilité inter-expérimentale, ce qui complexifie l'estimation de la durée de la phase G2 dans notre contexte (**Figure 59**).

Par ailleurs, l'inhibiteur PD0166285, comme la plupart des inhibiteurs pharmacologiques n'est pas une molécule stable. Bien qu'aucune mention de sa demi-vie ne soit évoquée dans la littérature, un autre inhibiteur de Wee1, la Pyrimidopyrimidinone 8, est caractérisée pour avoir une demi-vie de 2.8h (Ronco et al., 2016). Ainsi, on pourrait penser que l'impact sur la durée de la phase G2, 24h après traitement, ne représenterait qu'une fraction du réel impact de cet inhibiteur sur la durée de cette phase.

D'autre part, comme mentionné dans la partie résultat, nous savons que l'expression de CDC25B, aux stades où sont traités les embryons, est plus importante en région ventrale qu'en région dorsale (Bénazéraf et al., 2006; Peco et al., 2012). Or, nous savons que Wee1 et CDK1 régulent mutuellement leur activité par une boucle de rétrocontrôle négative. Durant la phase G2, Wee1 inactive CDK1 par phosphorylation sur le résidu Y15. Durant la transition G2-M, CDK1 est activé par déphosphorylation médiée par CDC25B et Wee1 est à son tour inhibé par CDK1, par phosphorylation induisant sa dégradation (Koh, 2022). D'autre part, on sait qu'à ces stades, la durée de la phase G2 est plus faible dans la région ventrale que dans la région dorsale (Peco et al., 2012). Cette variabilité dorso-ventrale de la durée de la phase G2 serait liée à l'expression différentielle de CDC25B sur cet axe. Ainsi dans la partie ventrale étant donné le niveau d'expression de CDC25B, les voies d'inhibition et de dégradation de Wee1 sont déjà fortement engagées. On a donc émis l'hypothèse que l'inhibiteur de Wee1 aurait un impact sur la durée de la phase G2 plus faible dans la région ventrale que dans la région dorsale. Cette hypothèse a été validée puisque mes résultats montrent que **le ratio $(\text{H3P}^+ ; \text{EdU}^+) / \text{H3P}^+$ est 62% plus élevé par rapport à la condition contrôle dans la région dorsale, contre seulement 8% dans les progéniteurs de la région ventrale.**

Ainsi, en prenant en considération l'ensemble de ces éléments, l'impact de l'inhibiteur de Wee1/Myt1 sur la durée de la phase G2 serait sous-estimé à cause d'une variabilité inter-

expérimentale, du différentiel d'expression de CDC25B le long de l'axe D-V et potentiellement à cause d'une faible stabilité de cet inhibiteur. Néanmoins, cette modulation est suffisante pour orienter les progéniteurs neuraux vers un destin neurogénique, puisqu'on observe une transition du mode de division PP à NN et une augmentation de la production neuronale.

2. DANS LES ORGANOÏDES CEREBRAUX

En parallèle, j'ai également travaillé sur un nouveau modèle : les organoïdes cérébraux humains. Le premier objectif était de déterminer les paramètres du cycle cellulaire dans ce contexte biologique. Actuellement le seul paramètre que j'ai pu définir est la durée moyenne de la phase G2. **Mes résultats préliminaires suggèrent qu'en condition WT, la durée moyenne de la phase G2 des progéniteurs corticaux est de l'ordre de 3h.** Cependant la cinétique des autres paramètres du cycle cellulaire reste à déterminer.

J'ai également tenté de moduler la durée de la phase G2 des progéniteurs corticaux, en utilisant l'inhibiteur de Wee1/Myt1 et d'évaluer l'impact de cette modulation sur la maturation des progéniteurs neuraux. **Mes résultats préliminaires suggèrent que la durée de la phase G2 serait effectivement diminuée en réponse à cet inhibiteur. Cette modulation de la phase G2 serait concomitante avec une transition des progéniteurs apicaux (aRGs) vers un destin de progéniteurs plus matures (bIPs).**

Ces résultats bien que préliminaires, sont en accord avec les données publiées par l'équipe dans le contexte du développement cortical murin (Roussat et al., 2023). En effet, cet inhibiteur pharmacologique a été caractérisé pour réduire la durée de la phase G2 des progéniteurs corticaux et favoriser la production de bIPs (Roussat et al., 2023). De même dans cette étude, la proportion des cellules en phase G1 n'a pas été modifiée tout comme dans le contexte des progéniteurs corticaux Humains. Mais une différence notable entre ces deux modèles est à noter. En effet, une diminution de la durée phase G2 dans le cortex murin, n'affecte pas le nombre de cellules Pax6+, alors que dans notre contexte le nombre de cellules Pax6+ est diminué par rapport à la condition contrôle. Mais cette différence est sans doute corrélée à des mécanismes « espèces spécifiques ». En effet, il est connu que chez les rongeurs, le domaine des cellules Pax6+ et Tbr2+ est relativement plus distinct que chez les primates (Hodge et al., 2008; Maekawa et al., 2005; Manuel et al., 2015). Chez les rongeurs, la transition d'une identité de aRG vers une identité de bIP est régulée par l'extinction de Pax6,

et l'activation de l'expression de NeuroG2 et de Tbr2. A l'inverse, chez les primates, Pax6 reste exprimé dans les progéniteurs aRGs en cours de transition, mais peut être également exprimé dans des progéniteurs plus matures comme les bIPs (Florio and Huttner, 2014; Manuel et al., 2015). Ces données suggèrent que chez les primates le facteur de transcription Pax6 aurait des fonctions distinctes de celle des rongeurs au cours de la maturation des progéniteurs neuraux.

Pour finir, les données concernant l'impact de la durée de la phase G2 dans la maturation des progéniteurs corticaux humains sont préliminaires. Néanmoins, ces résultats restent encourageants puisqu'ils suggèrent que la modulation de la durée de la phase G2 lors de la maturation des progéniteurs neuraux corticaux (d'ores-et-déjà observée chez la souris), semble être un mécanisme conservé chez l'Humain.

Ces résultats se révèlent encourageant et suggèrent un lien entre dynamique de la phase G2 et maturation des progéniteurs neuraux. En effet, la plupart des études ayant mesuré la durée des phases GAP dans ce tissu, mettent en évidence une augmentation significative de la durée de la phase G1 durant les étapes de maturation des progéniteurs corticaux. La durée de la phase G2 reste relativement stable (≈ 2 h) dans les bIPs et les aRGs (Arai et al., 2011; Hasenpusch-Theil et al., 2018; Pilaz et al., 2009). Cependant, ces études ont été réalisées à l'échelle des populations cellulaires, ce qui aurait pu masquer une hétérogénéité à l'échelle cellulaire. Une étude récente réalisée dans l'équipe, a mis en évidence par vidéo-microscopie dans le tube neural en développement que la durée de la phase G2 à l'échelle cellulaire est hétérogène et varie d'une durée minimale de 40 min à une durée maximale de 175 min (Molina et al., 2022). De plus, durant la corticogenèse il a été mis en évidence que la durée de la phase G2 des aRGs est dynamique entre les stades E12.5 et E16.5 (Fousse et al., 2019). Dans le même modèle, une étude de single-cell RNA-Seq réalisée à différents stades développementaux (E9.5 à E18.5) a permis de mettre en évidence deux groupes de progéniteurs aRGs, distincts par leurs profils transcriptomiques ; un groupe de aRGs engagé vers un destin neuronal et un groupe de aRGs multipotent (Hagey et al., 2020). Les aRGs engagés vers un destin neuronal sont souvent retrouvés en phase G1 et expriment fortement les Cyclines associées à la phase G1. Alors que les aRGs multipotents sont le plus souvent retrouvés en phase G2 et expriment des gènes de la transition G2/M comme *CDK1* et *CDC25B* (Hagey et al., 2020; Telley et al., 2019). Enfin, une étude récente de l'équipe, a également mis

en évidence que CDC25B et la durée de la phase G2 contrôlent étroitement le destin des aRGs durant les phases précoces de la corticogénèse (Roussat et al., 2023). Le néocortex et le tube neural étant deux tissus pseudostratifiés, composés de cellules polarisées réalisant des migrations interkinétiques nucléaires, la durée de la phase G2 pourrait déterminer le destin des progéniteurs neuraux en modulant le temps d'exposition à des voies de signalisation telles que Slit-Robo et/ou Notch (Cárdenas et al., 2018; Fousse et al., 2019; Hagey et al., 2020; Murciano et al., 2002).

B. PARTIE 2 : LA SUREXPRESSION DE CDC25B INDUIT LA TRANSCRIPTION DE GENES CODANT DES PROTEINES RIBOSOMIQUES ET DES PROTEINES D'ASSEMBLAGES

Dans un second temps, mon objectif était d'identifier les événements moléculaires et processus biologiques qui sont recrutés en aval de CDC25B au cours de la neurogenèse précoce du tube neural.

D'après les travaux antérieurs de l'équipe, nous savons qu'une partie des fonctions neurogéniques de CDC25B peut être régulée de façon cycle cellulaire indépendante, puisque l'expression d'une forme mutante de CDC25B incapable d'interagir avec CDK1, promeut la réalisation de divisions neurogéniques asymétriques (Bonnet et al., 2018). Je voulais donc par stratégie de RNA-Seq, discriminer les voies qui seraient régulées en aval de CDC25B de façon cycle cellulaire - indépendante ou - dépendante. Cependant, comme vu dans la partie résultats **nous n'avons pas été en mesure d'identifier de gènes différentiellement exprimés entre la condition CDC25B et CDC25B^{ΔCDK}.**

Cela n'avait pas été précisé dans la partie résultats, mais avant de procéder à l'analyse d'expression différentielle, nous avons confirmé que les différentes séquences contrôle, CDC25B, CDC25B^{ΔCDK} et H2B-eGFP était bien exprimées grâce au logiciel Integrative Genomics Viewer (IGV). Il est nécessaire également de préciser que les séquences CDC25B, CDC25B^{ΔCDK} correspondent aux séquences humaines du gène *hCDC25B* et que le gène endogène de poulet *cCDC25B* est toujours exprimé. Auparavant, nous n'avions aucune information concernant le niveau d'expression de cette *hCDC25B*, par rapport au gène endogène du poulet. Grâce à cette analyse réalisée sur IGV, nous avons été en mesure de montrer que le niveau d'expression de *hCDC25B* et de *cCDC25B* est équivalent. Par conséquent, le pool d'ARNm de *CDC25B* est

doublé en condition gain de fonction. De même, l'expression de *hCDC25B^{ΔCDK}* est équivalente au niveau d'expression du gène endogène de poulet.

Par ailleurs, nous avons également confirmé en amont que ces différentes constructions, reproduisaient bien les phénotypes caractérisés précédemment dans l'équipe (Bonnet et al., 2018).

Cependant, malgré le contrôle de ces différents paramètres, on constate une variabilité au sein de la condition *CDC25B^{ΔCDK}*. En effet, la moitié des échantillons *CDC25B^{ΔCDK}* ont un profil transcriptomique identique à la condition contrôle et l'autre moitié a un profil sensiblement équivalent à celui de la condition *CDC25B*. On sait que l'expression de la forme mutée *CDC25B^{ΔCDK}*, n'est qu'additionnée à celle du gène endogène, dont l'expression et par conséquent les fonctions restent identiques. Puisqu'il est difficile par électroporation *in ovo* de déterminer précisément combien de plasmides sont incorporés dans les cellules, ni combien de cellules sont électroporées, on pourrait penser que le ratio *cCDC25B* (endogène)/*CDC25B^{ΔCDK}* n'est pas équivalent d'un réplicat à l'autre.

C'est la raison pour laquelle nous avons envisagé de réaliser un nouveau RNA-Seq, cette fois-ci en évaluant le transcriptome des cellules PP, PN et NN spécifiquement, en exprimant les vecteurs Sox2-GFP et Tis21-RFP (Le Dréau et al., 2014; Saade et al., 2013). Nous avons procédé à de nombreux tests pour trier les cellules PP, PN et NN, mais la RFP et la GFP étant sous le contrôle d'un promoteur minimal, la majorité des cellules sont considérées doubles positives (PN). Bien qu'il serait très intéressant de déterminer le profil transcriptomique « type », qui caractérise ces trois modes de division, nous n'avons pas poursuivi ces expériences.

Cependant, ce RNA-Seq nous a permis de mettre en évidence les différents processus biologiques et événements moléculaires recrutés en aval d'une surexpression de *CDC25B*. Tout d'abord, **par analyse descriptive, on voit qu'un certain nombre de gènes d'intérêt sont sous-représentés ou surreprésentés en aval d'une surexpression de *CDC25B*.**

En effet, on a observé que *GPR161*, *PKD1* et *NR4A3* sont sous-représentés alors que des gènes comme *H2AZ2* et *H-RAS* sont surreprésentés par rapport à la condition contrôle. Je vais discuter dans cette partie de l'intérêt de voir une modulation de ces gènes en aval de *CDC25B* et comment ces derniers peuvent participer à la maturation des progéniteurs neuraux.

D'une part, *GPR161* est connu pour être un régulateur négatif de la voie Shh, en favorisant l'expression de la forme de répresseur Gli3 (Hwang et al., 2021). La voie Shh étant également connue pour réguler positivement l'expression de *CDC25B* (Bénazéraf et al., 2006) et de la différenciation neuronale (Le Dréau et al., 2014; Saade et al., 2013), la répression du gène *GPR161* favoriserait l'entretien de l'activation de *CDC25B* et de ses fonctions neurogéniques (Bonnet et al., 2018; Roussat et al., 2023). De même *PKD1*, connu pour coder une protéine membranaire, polycystine 1 sert de transducteur des voies JAK/STAT et Wnt (Kim et al., 2016). La voie Wnt étant connue pour maintenir l'auto-renouvellement des progéniteurs neuraux (Kalani et al., 2008), une altération de l'expression de *PKD1* affecterait la voie Wnt et induirait une inhibition de l'expression de gènes de la pluripotence. Enfin, *NR4A3* est un régulateur positif de la prolifération cellulaire, en favorisant l'expression de gènes comme *CCND1* et *CCND2*, (régulateurs positifs du cycle cellulaire) et l'expression de gènes causant la dégradation de *CDKN1A* (p21), (un inhibiteur du cycle cellulaire) (Nomiyama et al., 2006). Une diminution de son expression pourrait induire une sortie du cycle cellulaire des progéniteurs neuraux.

A l'inverse des 3 gènes mentionnés ci-dessus, *H-Ras*, fait partie des gènes surreprésentés en aval d'une surexpression de *CDC25B*. De façon intéressante, on sait qu'une stabilisation de *H-Ras* par la signalisation de l'acide rétinoïque (AR), promeut la différenciation des cellules souches neurales au cours du développement cortical murin (Park et al., 2016). Enfin la surreprésentation de *H2AZ2* suggère qu'une modulation de la conformation de la chromatine aurait lieu en aval de *CDC25B*. On sait également, dans le contexte du développement cortical, qu'une perte de fonction de *H2AZ*, induit une augmentation de la prolifération des progéniteurs neuraux et une diminution de la différenciation neuronale (Shen et al., 2018).

L'ensemble de ces éléments suggèrent qu'en aval d'une surexpression de *CDC25B*, une modulation du transcriptome des NPCs a lieu. Il semblerait au vu des gènes surreprésentés et sous-représentés décrits ci-dessus, que les voies de l'auto-renouvellement et de la maintenance de la pluripotence cellulaire sont diminuées. A l'inverse, celles induisant la sortie du cycle et la différenciation cellulaire sont activées. Mais de toute évidence, des expériences complémentaires doivent être menées pour confirmer cette hypothèse.

J'ai observé également dans ces données de RNA-Seq, qu'une surexpression de CDC25B induit une surreprésentation de gènes impliqués dans la machinerie traductionnelle.

En effet, cette analyse globale du transcriptome, nous a permis de mettre en évidence que CDC25B induit une surreprésentation 22/82 gènes codant des protéines ribosomiques, parmi eux, on retrouve *RPS26*, *RPS28*, *RPS20*, *RPL24*, *RPL4* et *RPL10*. Par la suite, nous avons souhaité confirmer par hybridation *in situ*, que ces gènes étaient effectivement surexprimés dans des régions d'initiation de la neurogenèse, dans le tube neural du poulet. Cependant, l'expression de ces gènes étant ubiquitaire, il était difficile d'observer un patron d'expression différentiel avec cette stratégie. De même, nous avons tenté de quantifier le transcrit de ces différents gènes par RT-qPCR mais nous avons été confrontés à une limite de quantité de matériel.

Par ailleurs, nous avons vu que *IMP3* est surreprésenté et *MDM4* est sous-représenté en aval d'une surexpression de CDC25B.

IMP3 (aussi appelé *BRMS2*) est un composant du complexe 60-80S U3 snoRNP (U3 small nucleolar ribonucleoprotein). Ce gène est requis durant les phases précoces du clivage de l'ARN ribosomique pre-18S et jouerait donc un rôle dans la biogenèse des ribosomes (Granneman et al., 2003; Liu et al., 2021; Watkins and Bohnsack, 2012).

Quant à *MDM4*, la protéine codée par ce gène est connue pour être essentielle à l'inhibition de p53 et à la différenciation des cellules ESCs (Ménendez et al., 2011). De plus, *MDM4* est connu pour inhiber la voie mTOR (Lucà et al., 2021; Mancini et al., 2017). Quant à p53 on sait qu'il joue un rôle de régulateur positif de l'expression de p21 (Engeland, 2022). Une levée de son inhibition par une altération de *MDM4*, permettrait la transcription de p21. Cette dernière va à son tour, inhiber les complexes Cyclines /CDK régulant la transition G1/S et favoriser une sortie du cycle cellulaire.

Au premier abord, ces gènes surprenants se sont révélés très intéressants au vu de notre question biologique. Dans la littérature, de nombreux liens entre régulation de la biogenèse des ribosomes, de la synthèse protéique, de l'efficacité de la traduction et transition de l'état prolifératif/différenciatif des cellules souches ont été établis (Ni and Buszczak, 2023; Ross and Zarbalis, 2014; Saba et al., 2021b; Sanchez et al., 2016).

Mais à ce stade, une surreprésentation de gènes codant des protéines ribosomiques n'implique pas forcément une modulation de la machinerie traductionnelle.

Afin d'approfondir cette question, nous avons initié une collaboration avec des spécialistes dans l'étude des ribosomes en conditions physiologiques et pathologiques, Célia Plisson-Chastang et Simon Lebaron.

Grâce à cette collaboration, nous avons obtenu des données préliminaires produites à partir d'un modèle murin perte de fonction pour CDC25B (*CDC25B^{nesKO}*). **Il semblerait qu'une perte de fonction de CDC25B altère la biogenèse des ribosomes et affecte la machinerie traductionnelle en réduisant la quantité de ribosomes en cours de traduction.**

Dans le modèle du tube neural de poulet, **nous avons également mis en évidence qu'une diminution de la durée de la phase G2 (déjà caractérisée pour mimer partiellement les fonctions neurogéniques de CDC25B), induit une augmentation de la quantité de ribosomes en cours de traduction.** Nous n'avons cependant pas pu corrélérer cette augmentation de la synthèse protéique à une augmentation de la biogenèse des ribosomes dans ce modèle. En effet, nous avons testé différentes stratégies : immunomarquage du nucléole (Fibrillarine et NPM1), marquage des nucléoles au nitrate d'argent, courte incorporation de *5-Fluorouridine* (5-Fluorouracil 1 β -D-ribofuranoside) pour marquer les ARNr et les ARNm des RP en cours de transcription. Mais aucune de ces expériences n'a fonctionné.

Cependant les résultats complémentaires obtenus sur le modèle murin perte de fonction pour CDC25B et le modèle poulet, nous permettent de **suggérer qu'une augmentation de la biogenèse des ribosomes et de la synthèse protéique serait concomitante avec une initiation de la différenciation des progéniteurs neuraux.**

Des résultats préliminaires obtenus par analyse de densité cytoplasmique des ribosomes sur embryons précoces (E2.5) et embryons plus matures (E3.5), tendent également vers cette hypothèse. **Les embryons plus matures auraient une densité cytoplasmique de ribosomes plus élevée que des embryons plus précoces.**

Mais comment pouvons-nous expliquer cette modulation de la biogenèse des ribosomes et de la synthèse protéique dans notre contexte ?

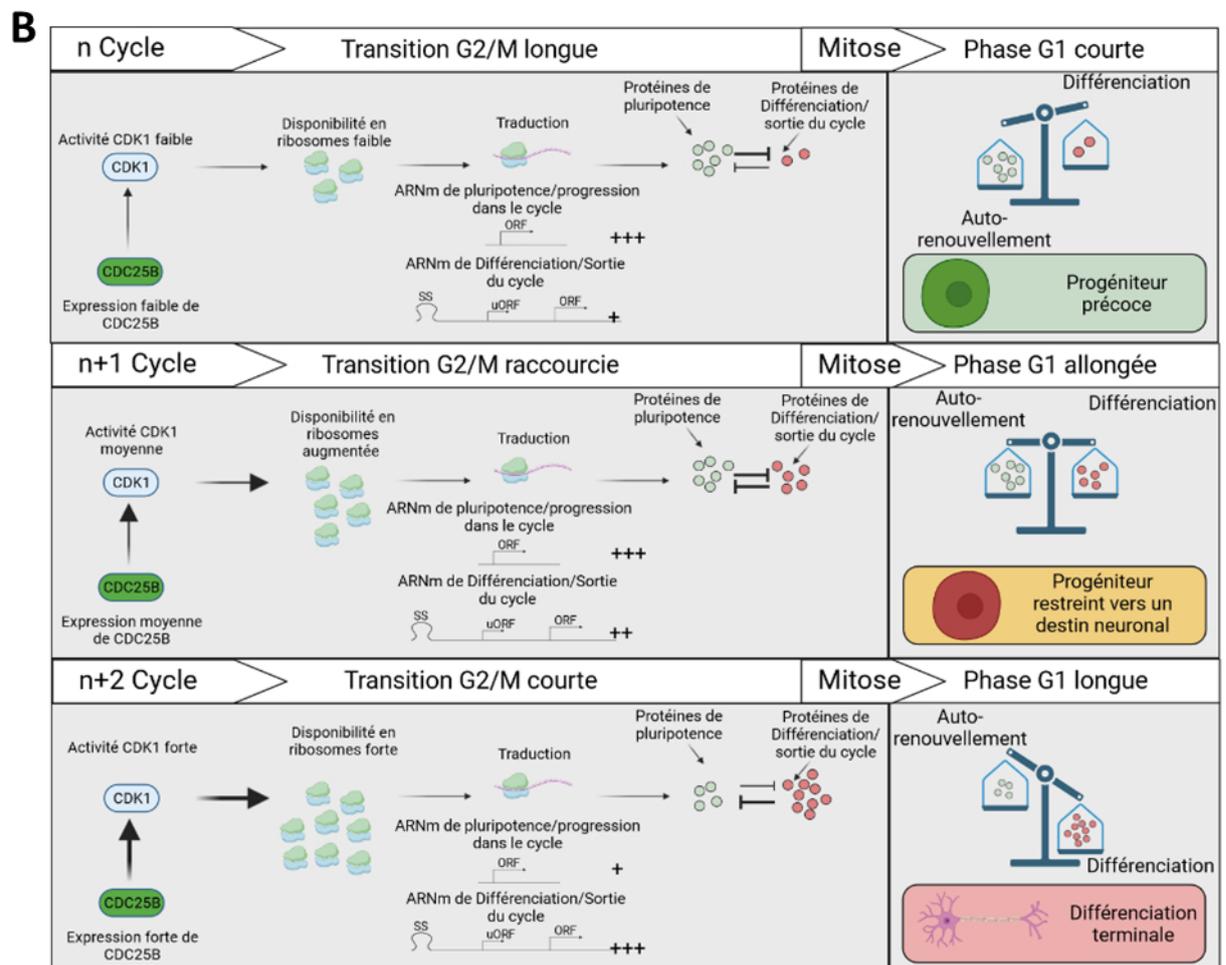
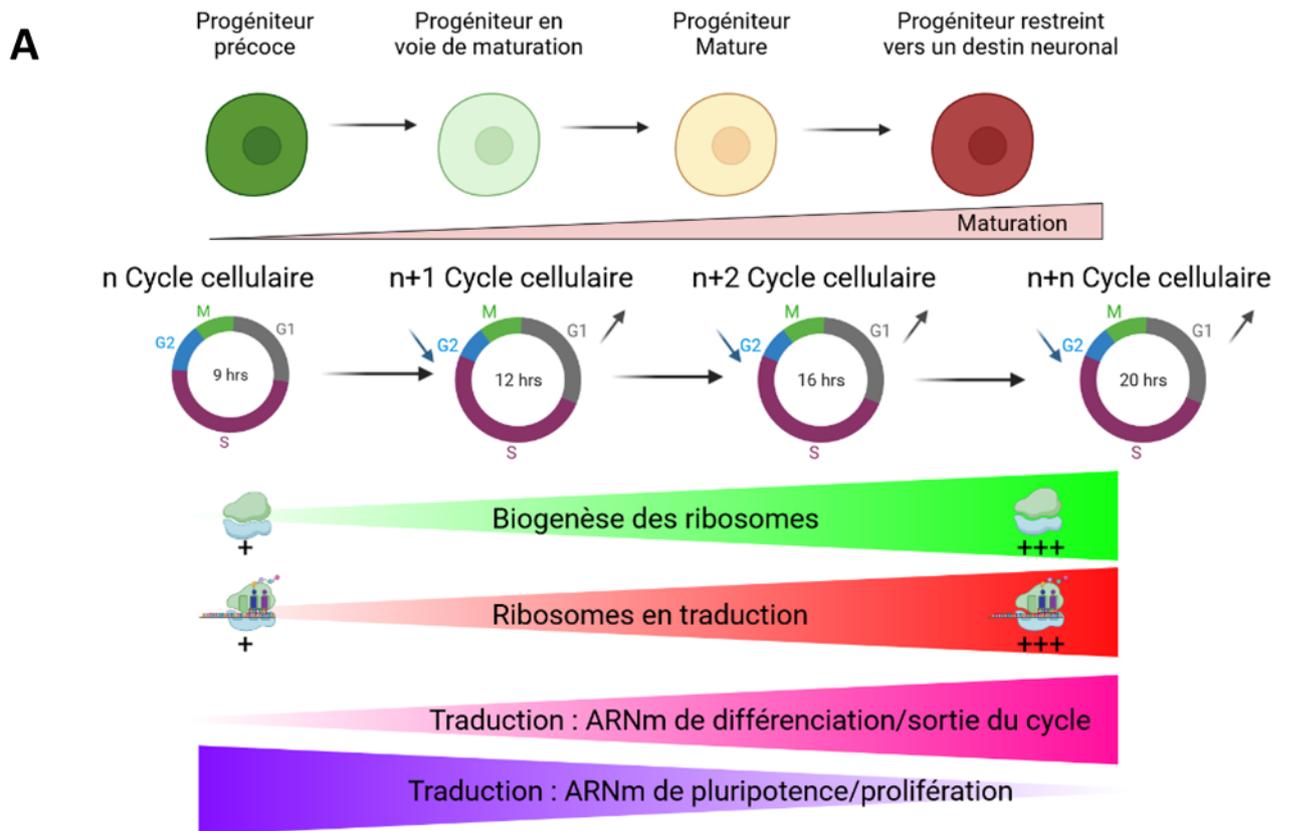


Figure 60. Modèle proposé des fonctions neurogéniques de CDC25B au cours de la phase G2 :

- (A) A chaque cycle cellulaire, les progéniteurs neuraux mûrissent et se restreignent peu à peu vers un destin neurogénique. Cette maturation est concomitante avec une modulation du traductome des progéniteurs et serait médiée par une augmentation de la biogenèse des ribosomes et de la quantité de ribosomes en traduction.
- (B) La nature du traductome des progéniteurs serait défini dès la phase G2 par le niveau d'expression de CDC25B et le niveau d'activité de CDK1. CDK1 étant impliqué dans la régulation directe et indirecte de la machinerie traductionnelle, le niveau de disponibilité des ribosomes serait proportionnel au niveau d'activité de CDK1. Certains ARNm possèdent des structures secondaires (SS) ou des séquences uORF (upstream open reading frame) et nécessitent une grande quantité de ribosomes disponibles pour être traduits. On peut donc proposer l'hypothèse que certains ARNm favorisant la maturation/différenciation neuronale, sont progressivement traduits au fur et à mesure que le niveau d'expression de CDC25B et la disponibilité en ribosomes augmentent.

Comme mentionné dans l'introduction (Cf. Chapitre 3), la régulation de la biogenèse des ribosomes est oscillatoire au cours du cycle cellulaire et atteint son pic lors de la phase G2. On sait aussi que cette régulation est dépendante d'acteurs du cycle cellulaire comme Cyclines D1/CDK4 et Cycline A/CDK2 (Heix et al., 1998; Kuhn et al., 1998; Mailand et al., 2002; Voit et al., 1999; Voit and Grummt, 2001). On sait aussi que CDK1 est impliqué dans la régulation de la machinerie traductionnelle en régulant notamment des activateurs positifs ou négatifs de la traduction comme eIF2 α , 4E-BP, et S6K1. CDK1 joue également un rôle dans la traduction directe des ARNm à motifs 5'TOR, et donc des ARNm codant des protéines ribosomiques (Clemm von Hohenberg et al., 2022; Haneke et al., 2020; Imami et al., 2018; Kalous et al., 2020; Yoon et al., 2011).

Aussi, CDC25B joue un rôle de régulateur positif de la voie mTOR, voie majeure de la régulation de la traduction (Baser et al., 2019; Brenner et al., 2014; R. Chen et al., 2009; Cloëtta et al., 2013; Paliouras et al., 2012) (**Figure 60**).

En prenant en considération l'ensemble de ces éléments, la surreprésentation de gènes codant pour des protéines ribosomiques et une modulation de la synthèse protéique, en aval d'une modulation de la phase G2 et/ou de l'expression de CDC25B ne paraîtrait donc pas étonnante. L'activité de CDK1 et de CDC25B étant entretenue par une boucle de rétrocontrôle positive (Gabrielli et al., 1996; Lammer et al., 1998), ces deux acteurs participeraient à une modulation de la biogenèse des ribosomes et de la synthèse protéique.

Par ailleurs, grâce à des données récemment publiées par l'équipe, nous savons que la durée de la phase G1 des cellules filles augmente à chaque nouvelle division cellulaire et que cet

allongement est principalement dû à un retard du point de restriction favorisant la transition G1/S (Molina et al., 2022). Cet allongement de la durée de la phase G1 à chaque nouveau cycle, restreindrait peu à peu les cellules vers un destin neurogénique et une sortie du cycle cellulaire. De plus, dans d'autres contextes biologiques nous savons que le passage en mitose est dépendant de la synthèse protéique (Lockhead et al., 2020) et que le destin cellulaire est déterminé dès la phase G2 grâce à une signature traductomique spécifique (Min et al., 2020; Moser et al., 2018; Spencer et al., 2013). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse, qu'au cours de la neurogenèse, CDC25B/CDK1 en modulant la biogenèse des ribosomes et la synthèse protéique lors de la phase G2, restreindraient peu à peu le destin des cellules filles et influenceraient leur entrée dans un nouveau cycle ou au contraire leur sortie du cycle et leur différenciation. Les acteurs CDC25B et CDK1 favoriseraient directement ou indirectement lors de la phase G2 de la cellule mère, la traduction d'ARNm spécifiques. Comme mentionné dans l'introduction, l'équilibre prolifération/différenciation repose sur un rétrocontrôle constant entre les facteurs de la pluripotence et les facteurs de la différenciation. On peut faire référence notamment à Olig2 et NeuroG2 qui entrent en compétition mutuelle pour réguler l'expression de Hb9, ou le rétrocontrôle négatif entre Pax6 et NeuroG2 (Bel-Vialar et al., 2007; Lee et al., 2005). Ce rétrocontrôle étant régulé par un seuil d'expression de répresseurs/activateurs transcriptionnels (R/A), on pourrait penser qu'à chaque cycle cellulaire, CDC25B/CDK1, modifieraient ce seuil R/A, en modulant la machinerie traductionnelle. Ces modifications du traductome, ayant lieu à chaque cycle cellulaire lors de la phase G2, restreindrait donc peu à peu les progéniteurs neuraux vers un destin neurogénique.

Mais qu'en est-il des ARNm traduits et est-ce que la composition des ribosomes en cours de traduction change au cours de la maturation des progéniteurs neuraux ?

Comme mentionné dans le chapitre 3, la notion de ribosome spécialisé est de plus en plus abordée dans la littérature (Bastide and David, 2018a; Genuth and Barna, 2022; Norris et al., 2021). Ces ribosomes spécialisés seraient caractérisés par une composition en RP ou en ARNr spécifiques et auraient la capacité de traduire des ARNm spécifiques (Carroll et al., 2008; Kearse et al., 2011; Kondrashov et al., 2011; Locati et al., 2017; Natchiar et al., 2017; Shi et al., 2017; Simsek et al., 2017).

Il serait donc également intéressant d'explorer cette notion à partir des fractions de polysomes obtenues sur les différents RiboMegaSec réalisés au cours de ma thèse. Nous pourrions déterminer à partir de ces fractions, les ARNm préférentiellement traduits par Ribosome profiling (Brar and Weissman, 2015). Nous pourrions également déterminer si la composition des ribosomes en RP est variable d'un contexte à l'autre, en réalisant une quantification absolue des protéines ribosomiques composant les ribosomes par spectrométrie de masse (Shi et al., 2017)

C. **PARTIE 3** : LIEN CAUSAL ENTRE BIOGENESE DES RIBOSOMES (RIBI)/SYNTHESE PROTEIQUE ET DESTIN CELLULAIRE

Par la suite, nous avons tenté de confirmer le lien causal entre biogenèse des ribosomes et synthèse protéique. Pour cela nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique de l'ARN polymérase I, le BMH-21.

Dans un premier temps, j'ai confirmé que **dans le tube neural de poulet le BMH-21 altère la quantité de ribosomes en cours de traduction.**

Cependant, les expériences visant à déterminer le lien causal entre RiBi/Traduction et destin cellulaire, ne nous permettent pas de confirmer qu'une altération de la machinerie traductionnelle affecte ce paramètre, puisque l'impact de cet inhibiteur sur la production neuronale est variable d'une expérience à l'autre.

Le BMH-21 n'affectant pas forcément toute la population cellulaire, nous envisageons d'affiner l'analyse par un pulse d'EdU afin de marquer les cellules en phase S et réaliser l'analyse uniquement sur les cellules EdU positives, qui auront franchi la phase G2 pendant le traitement. De plus, nous savons que pour le traitement PDO166285 aucun effet sur la neurogenèse n'a été observé à 24h post-traitement. Tout comme après une modulation de l'expression de CDC25B; où l'impact de ces modulations sur la production neuronale n'est détectable qu'à 48h post-traitement/électroporation (Bonnet et al., 2018; Peco et al., 2012). Nous devons donc envisager de reproduire ces expériences 48h post-traitement et/ou d'utiliser des marqueurs plus précoces de la neurogenèse comme NeuroM ou p27^{Kip1}.

Malgré tout, on peut mentionner que l'on observe en réponse au BMH-21 une légère augmentation de la proportion de cellules réalisant des divisions PP et une diminution de celle

réalisant des divisions NN et PN. D'autres expériences sont nécessaires pour confirmer cet effet sur le mode de division des progéniteurs neuraux.

D'autre part, comme mentionné précédemment, nous avons également envisagé la possibilité de quantifier la biogenèse des ribosomes par reconstruction 3D des nucléoles dans le tube neural de poulet. Si nous arrivons à réaliser un marquage des nucléoles dans ce modèle, nous aurons la possibilité de voir à l'échelle cellulaire l'impact d'un gain de fonction de CDC25B ou d'une modulation de la phase G2 sur la biogenèse des ribosomes. Nous pourrions également quantifier ce paramètre dans des cellules réalisant des divisions PP, PN ou NN.

En parallèle, en collaboration avec Célia Plisson-Chastang et avec l'aide de la plateforme microscopie électronique (METi), nous travaillons sur la mise au point d'un protocole de fixation d'échantillons co-électroporés avec les marqueurs des cellules PP, PN et NN. Notre objectif serait de déterminer à l'échelle « single-cell » par analyse corrélative, l'état traductionnel des NPCs en fonction de leurs modes de division. Si cette méthode se révèle fructueuse, nous aurons également la possibilité de déterminer « l'état traductionnel » d'autres types cellulaires.

D. CONCLUSION :

Ce projet de thèse a permis de mettre en évidence d'une part, que la diminution de la durée de la phase G2 est suffisante pour mimer les fonctions neurogéniques de CDC25B. Des données préliminaires permettent également d'émettre l'hypothèse que l'importance de la durée de la phase G2 dans la régulation de la maturation des progéniteurs neuraux serait également conservée dans les structures corticales d'organoïdes cérébraux humains.

Par ailleurs, ce projet a permis de mettre en évidence que les processus biologiques les plus représentés en aval d'une surexpression de CDC25B sont la traduction et biogenèse des ribosomes. Ce qui suggère qu'une modulation de la machinerie traductionnelle a lieu lors de la maturation des progéniteurs neuraux et de nombreuses données dans la littérature, soutiennent cette hypothèse. Ce projet a également permis, par des approches complémentaires, de formuler une hypothèse plus précise, en proposant qu'une augmentation de la RiBi associée à une augmentation de la synthèse protéique, seraient concomitantes avec la maturation des progéniteurs neuraux et l'initiation de leur différenciation. Nous espérons que les approches complémentaires que nous développons

dans l'équipe et en collaboration avec Célia Plisson-Chastang et Simon Lebaron, nous permettront de confirmer ces hypothèses et de révéler toute l'importance de la machinerie traductionnelle dans la régulation du destin cellulaire.

Plus généralement, ce projet a contribué d'une part à améliorer les connaissances sur les fonctions neurogéniques du régulateur de la transition G2/M, CDC25B. D'autre part, ce projet a également participé à préciser les événements moléculaires et processus biologiques recrutés en aval de son action au cours du développement du tube neural. Cette étude permettra à l'avenir, de mieux comprendre les liens entre modulation de la dynamique du cycle cellulaire, machinerie traductionnelle et destin cellulaire.

X. MATERIEL ET METHODE

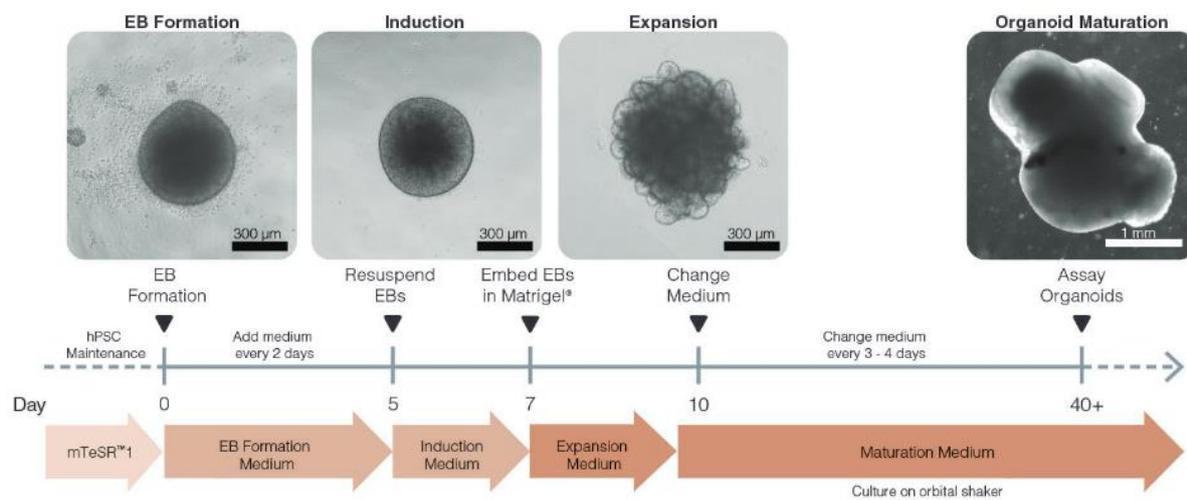
A. EMBRYONS DE POULET :

Des œufs fécondés ont été incubés à 38°C dans un incubateur en atmosphère humide jusqu'au stade embryonnaire souhaité (Hamburger and Hamilton, 1992).

B. LIGNEE PERTE DE FONCTION CONDITIONNELLE DE CDC25B :

Ces souris sont générées à partir du croisement de souris $CDC25B^{+/-}$; *Nestin-Cre* et de souris $CDC25B^{flox/flox}$ (dont les exons 4 à 7 du gène sont flanquée par des sites loxP). Les embryons issus de ce croisement sont soit des mutants conditionnels ($CDC25B^{flox/-}$; *Nestin-Cre*) ($CDC25B^{nesKO}$), soit des souris ayant un phénotype WT ($CDC25B^{flox/-}$) ($CDC25B^{flox/+}$) ou ($CDC25B^{flox/+}$; *Nestin-Cre*) (WT) (Bonnet et al., 2018). Les embryons sont collectés et prélevés séparément jusqu'à détermination de leur génotype obtenu par PCR à partir d'ADN génomique extrait de queues d'embryons.

C. CULTURES D'ORGANOÏDES CEREBRAUX :



Étapes de cultures d'organoïdes : Illustration provenant du protocole de culture fourni par STEMCELL Technologies (STEMdiff™ Cerebral Organoid Kit)

Les organoïdes cérébraux humains ont été générés à partir de cellules pluripotentes induites humaines (hIPS : LUMC0004iCTRL10) issus de fibroblastes différenciées. Les hIPSS, sont amplifiées au préalable en matrigel sur plaques 6 puits. Après amplification, les hIPSS sont ensemencées à une concentration de 9000 cellules/puit, dans une plaque 96 puits à fond

incurvé (96-well round-bottom ultra-low attachment plate). Les cellules subissent différentes étapes de croissance et de maturation, en commençant par la formation des corps embryoides (EB : embryoid body), suivie de l'induction, de l'expansion et enfin de la maturation. Ces étapes de culture ont été réalisées en suivant le protocole détaillé du fournisseur (STEMdiff™ Cerebral Organoid Kit, STEMCELL Technologies). Les organoïdes cérébraux ont été collectés après 15 jours de maturation (J-25).

D. CONSTRUCTIONS D'ADN ET ELECTROPORATION *IN OVO* :

Des électroporations *in ovo* ont été réalisées sur des embryons de poulet entre le stade HH13 et HH14, selon les conditions décrites dans (Peco et al., 2012). Des expériences de gain de fonction ont été réalisées en utilisant un vecteur exprimant différents isoformes humains de CDC25B (hCDC25B3 et hCDC25B^{ΔCDK}) sous le contrôle d'un élément cis régulateur de souris de CDC25B appelé pccRE. Un vecteur contrôle a été généré à partir du gène de βGal sous le contrôle de pccRE. Ces différents vecteurs sont injectés à une concentration de 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ et co-électroporés avec un vecteur pCIG-GFP injecté à une concentration de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Les constructions Sox2p-GFP et Tis21p-RFP ont été obtenues par E. Marti et utilisées respectivement à 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ et 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, comme décrit dans (Bonnet et al., 2018). Pour visualiser les cellules en phase G1, nous avons utilisé le marqueur FUCCI G1-PCNA décrit dans (Molina et al., 2022). Ce vecteur a été transfecté à 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

E. TRAITEMENT PHARMACOLOGIQUE :

Une solution de PD0166285 (MedChemExpress) concentrée à 1 μM , diluée en PBS1X est administrée dans les tubes neuraux d'embryons de poulet aux stades HH13-14 et sont prélevés 24h ou 48h post traitement. La même concentration a été administrée dans les cultures d'organoïdes cérébraux à J-24 et ils ont été collectés 24h post-traitement.

F. IMMUNOFLUORESCENCE :

Les embryons de poulet ont été fixés dans une solution de paraformaldéhyde 4% en PBS pendant 4h à température ambiante. Afin d'étudier le développement du tube neural de poulet, seule la région brachiale a été prélevée et incluse en agarose (5% PBS). Des coupes transversales de 45 μm de tubes neuraux sont ensuite réalisées au vibratome (Leica VT1000 S Vibrating blade microtome). Les coupes sont ensuite perméabilisées avec une solution de blocage (BSA 1% en PBS 0.1% Triton) pendant 45 minutes. Cette étape permet de

perméabiliser les coupes et de bloquer les sites d'interactions non spécifiques 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 1h30 à température ambiante.

Les organoïdes cérébraux humains sont fixés dans une solution de paraformaldéhyde 2% en PBS et stockés à 4°C sur la nuit. Les organoïdes sont ensuite lavés en PBS et placés à 4°C dans une solution de sucrose 30% pendant 3 jours. Enfin, les échantillons sont enrobés en OCT et des coupes de 18 µm sont réalisées au cryostat (BK-2318) et collectées sur lames adhésives (SuperFrost Plus, Menzel Gläser, Thermo Scientific) puis stockées à -20°C. Après réhydratation au PBS1X, les étapes d'immunofluorescences sont similaires à celles décrites ci-dessus.

Pour le marquage EdU, la révélation est réalisée 30 minutes à température ambiante en suivant les instructions du fournisseur (Click-iT™ EdU Cell Proliferation Kit for Imaging, Alexa Fluor™ 647 dye : C10340). Pour le marquage BrdU, les coupes sont dénaturées au préalable avec du HCL 2N puis lavées Na₄B₄O₇ 0.1M, puis incubées avec les anticorps primaires sur la nuit à 4°C.

Les coupes sont ensuite lavées au PBS 0.1% Triton et montées entre lame et lamelles dans un milieu de montage Mowiol 4-88.

Tableau 1 : Liste des anticorps primaires utilisés pour les immunofluorescences :

Antigène détecté	Isotype	Marque	Dilution
H3P	Lapin	Upstate Biotechnology	1 : 1000
BrdU	Souris	G3G4	1 : 400
Olig2	Lapin	Millipore	1 : 500
Islet-1/2	Souris	39.4D5	1 : 3
Par 7	Souris	Hybridoma bank	1 : 6
Pax 2	Lapin	Covance	1 : 200
Pax 6	Lapin	Covance	1 : 300
Tbr2	Lapin	Millipore	1 : 100
Tbr2	Rat	eBioscience	1 : 50
Cycline D1	Lapin	CST	1 : 100
NPM1/B23	Souris	proteintech	1 : 200

G. MESURE DES PARAMETRES DU CYCLE CELLULAIRE :

1. EMBRYONS DE POULET :

a) Phase G2

La durée relative de la phase G2 est déterminée par le paradigme de pourcentage de mitose marquée (PLM) décrit par Quastler et Sherman en 1959 (Takahashi, 1966). Les embryons de poulet sont injectés au niveau du cœur avec 10 μ l de 5-ethynyl-2'-deoxyuridine concentrée à 4 mM (EdU, Click-iT™ EdU Cell Proliferation Kit for Imaging, Alexa Fluor™ 647 dye, Invitrogen). Les embryons sont collectés 90 minutes post-injection. Le marquage EdU est révélé par réaction chimique visualisée par fluorescence à 647 nm. Le pourcentage de cellules co-marquées H3P⁺ ; EdU⁺ par rapport au nombre total de cellules H3P⁺ est quantifié et comparé à la condition de référence (contrôle). Ce pourcentage est inversement proportionnel à la durée de la phase G2.

b) Phase S et Cycle total

La longueur de la phase S et du cycle total sont déterminés par la méthode décrite par (Locker and Perron, 2019; Martynoga et al., 2005). Les embryons sont injectés au niveau du cœur avec 10 μ l d'EdU à 4 mM suivi d'une injection de 10 μ l de 5-bromo-2'-désoxyuridine concentrée à 250 μ M (BrdU, Sigma), respectivement à 90 minutes et 30 minutes préfixation.

Les durées du cycle cellulaire (T_c) et de la phase S (T_s) sont calculées à partir des comptages de cellules EdU⁺ ; BrdU⁻ et EdU⁺ ; BrdU⁺.

c) Phase G1

La proportion de cellules en phase G1 a été calculée en faisant le rapport du nombre de cellules marquées FUCCI-G1⁺ et du nombre de cellules électroporées marquée PCNA⁺.

2. ORGANOÏDES CEREBRAUX HUMAINS :

a) Durée moyenne de la phase G2

La durée moyenne de la phase G2 sur organoïdes cérébraux humains WT, a été calculée par le PLM mentionné ci-dessus. Une incorporation d'EdU à 250 μ M a été réalisée sur différents lots d'organoïdes à 6, 5, 4, 3, 2 et 1 heure préfixation. La durée moyenne de la phase G2 (TG2) correspond à la valeur en abscisse pour Y = 50% :

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

b) Phase G2

L'estimation de l'impact d'une modulation de la phase G2 à l'issue d'un traitement pharmacologique a été faite à partir d'une incorporation d'EdU à 250 µM réalisée 90 minutes préfixation. Le pourcentage de cellules co-marquées H3P⁺; EdU⁺ par rapport au nombre total de cellules H3P⁺ est quantifié et comparé à la condition de référence (contrôle)

c) Phase G1

La proportion de cellules en phase G1 a été estimée en faisant le rapport du nombre de cellules Cycline D1⁺ et du nombre de cellules Pax6⁺.

H. TRI-CELLULAIRE :

24 h post-électroporation des plasmides (Contrôle, CDC25B et CDC25B^{ΔCDK}), les embryons électroporés sont conservés et prélevés. Les embryons sont ensuite épinglés dans des boîtes à fond noir et immergés en PBS1X froid. Les tubes neuraux sont ensuite disséqués et immergés en solution de trypsines à 37°C sous agitation pendant 10 minutes. Les cellules sont ensuite dissociées mécaniquement, puis centrifugées pour éliminer la trypsine et re-suspendues en solution de BSA1% diluées en PBS 1X. Les cellules GFP⁺ sont enfin triées par cytométrie en flux (ARIA fusion L1, BD Biosciences), immergées en TRIzol (TRIzol Reagent – 15596018, Invitrogen) et stockées à -80°C.

Chaque condition a été reproduite 5 fois et chaque réplicat correspond aux cellules triées à partir de tubes neuraux de 10 à 13 embryons.

I. EXTRACTION ARN :

Après l'ajout de 100µl de chloroforme et homogénéisation, les cellules dissociées à partir de tubes neuraux ont été centrifugées pendant 15 min à 12 000g à 4°C. La phase aqueuse a alors été récupérée et les ARN ont été précipités 10 minutes à température ambiante, après ajout de 1µl de glycogènes et 400 µl d'isopropanol. Les tubes ont ensuite été centrifugés et les culots lavés en éthanol 75% puis recentrifugés une dernière fois afin d'éliminer l'éthanol. Les culots d'ARN ont ensuite été repris en H2O RNase free et quantifiés au Qubit (Qubit 4 Fluorometer, Invitrogen) en suivant les recommandations du fournisseur (200 µg

d'ARN total minimum étaient requis pour le séquençage). Nous avons vérifié en amont que ce protocole d'extraction ARN n'affectait pas la qualité des ARN sur puce Bioanalyzer 2100 (Agilent) à l'aide du kit RNA 6000 Nano selon les recommandations du fournisseur.

Les ARN ont été envoyés pour séquençage à Beijing Genomics Institute (BGI) <https://en.genomics.cn/>. Le séquençage a été réalisé en paire (Paired end) avec une profondeur de 60 millions de reads.

J. ANALYSE RNA-SEQ :

En utilisant la plateforme Galaxy (<https://galaxy.migale.inra.fr/>) la qualité des fichiers FASTA composée des reads bruts de chaque échantillon (100 pb/read), a été validée grâce au programme FastQC (Read Quality report). L'ensemble des reads ont un score de qualité supérieur à 30.

Sur HISAT2, ces reads bruts ont été alignés au génome de référence (séquence de référence : galGal6.fa et annotation de référence : Gallus_gallus.GRCg6a.104_chr.gtf). En moyenne, sur l'ensemble des échantillons 87% des reads sont alignés sur l'ensemble du génome et représentent près de 55 millions de reads par échantillons. Enfin, le comptage du nombre de reads par gène a été réalisé sur le programme HTseq count à l'issue duquel les matrices de comptage pour chaque condition ont été extraites. A partir de ces matrices de comptage, une analyse de composantes principales sur R, a été réalisée grâce au package gg2plot pour caractériser le clustering des réplicats issus des différentes conditions. La condition CDC25B^{ACDK} n'étant pas discriminée des deux autres conditions a été écartée de l'analyse.

L'analyse d'expression différentielle des conditions Contrôle et CDC25B a été réalisée sur R grâce au programme DESeq2. Une analyse de Gene Ontology a été réalisée sur Genecodis 4 (<https://genecodis.genyo.es/>) à partir des gènes différentiellement exprimés avec un FDR<0.05 et un FDR<0.1 (False discovery rate) afin d'identifier les principaux processus biologiques et composants cellulaires représentatifs de ces listes de gènes.

En parallèle de cette analyse, l'alignement des reads bruts sur un génome de référence « personnalisé » a été réalisé. Ce génome de référence est composé des séquences du gène endogène *cCDC25B* du poulet, de *LacZ* (Contrôle), *hCDC25B3*, *hCDC25B3^{ACDK}* et *H2B-eGFP*. Ensuite, les matrices de comptage ont été générées sur HTseq count et la quantité de reads

alignés sur ces différentes séquences a été visualisée sur Integrative Genomics Viewer (IGV). Ceci nous a permis de confirmer que l'ensemble des séquences électroporées étaient bien exprimées et spécifiques de chacune des conditions.

K. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION :

Les échantillons sont fixés avec un mélange 2.5% glutaraldéhyde/ 2% paraformaldéhyde (PFA) en tampon Cacodylate 0.1M pH 7.2 une nuit à 4°C. Le lendemain les échantillons sont lavés au Cacodylate 0.1M et transmis à la plateforme METi qui prend en charge la préparation des échantillons pour l'acquisition au microscope électronique à transmission.

L'acquisition des images est réalisée sur le MET JEM-1400Flash (JEOL), à un grossissement de X15000. L'analyse d'image est réalisée sur le logiciel RELION. L'auto-picking des ribosomes cytoplasmiques a été réalisé en utilisant un filtre Laplacien de Gaussienne. Le diamètre minimal des particules sélectionnées par comptage automatique a été fixé à 280 Å et le diamètre maximal à 320 Å.

L. RIBOMEGASEC :

Les embryons sont prélevés, les tubes neuraux disséqués, placés dans une solution cycloheximide 2mg/ml et congelés en azote liquide puis placés à -80°C. Chaque condition comprend 10 à 13 tubes neuraux. Les échantillons sont dilués dans un tampon d'extraction (20 mM Hepes-NaOH (pH 7.4), 130 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1% CHAPS, 0.2 mg/ml heparin, 2.5 mM DTT, 50 µg/ml cycloheximide, 20 U SUPERase In RNase inhibitor, cOmplete EDTA-free Protease inhibitor) et lysés par sonication. Le protocole détaillé de préparation des échantillons est décrit dans (Yoshikawa et al., 2018). L'extrait total protéique est ensuite quantifié par la méthode de Bradford.

Les extraits protéiques totaux sont ensuite injectés dans le système ÄKTA pure™ chromatography system (Cytiva). Les différentes fractions sont séparées par des colonnes SEC, par chromatographie d'exclusion de taille.

M. ANALYSES STATISTIQUES :

Les données quantitatives sont représentées par la moyenne et la SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées sur Graph Pad Prism 5 ou R-Studio. La significativité des données

a été déterminée en réalisant des tests t de Mann-Whitney, ou par l'utilisation du modèle mixte suivi du test ANOVA précédemment décrit dans (Bonnet et al., 2018).

Les symboles « ns » et « * » correspondent aux p-values suivantes : (ns) $p > 0.05$; (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$.

N. FIGURES ET ILLUSTRATIONS :

Les schémas adaptés ou reproduits d'articles scientifiques et les illustrations présents dans les parties introduction, résultats et discussion/perspectives ont été réalisées sur [BioRender.com](https://www.biorender.com).

Development/Plasticity/Repair

Control of G₂ Phase Duration by CDC25B Modulates the Switch from Direct to Indirect Neurogenesis in the Neocortex

Melanie Roussat, Thomas Jungas, Christophe Audouard, Sofiane Omerani, Francois Medevielle, Eric Agius, Alice Davy, Fabienne Pituello, and Sophie Bel-Vialar

Molecular, Cellular and Developmental biology unit (UMR 5077), Center for Integrative Biology, Université Paul Sabatier, Toulouse, cedex 09, France

During development, cortical neurons are produced in a temporally regulated sequence from apical progenitors, directly or indirectly, through the production of intermediate basal progenitors. The balance between these major progenitor types is critical for the production of the proper number and types of neurons, and it is thus important to decipher the cellular and molecular cues controlling this equilibrium. Here we address the role of a cell cycle regulator, the CDC25B phosphatase, in this process. We show that, in the developing mouse neocortex of both sex, deleting CDC25B in apical progenitors leads to a transient increase in the production of TBR1⁺ neurons at the expense of TBR2⁺ basal progenitors. This phenotype is associated with lengthening of the G₂ phase of the cell cycle, the total cell cycle length being unaffected. Using *in utero* electroporation and cortical slice cultures, we demonstrate that the defect in TBR2⁺ basal progenitor production requires interaction with CDK1 and is because of the G₂ phase lengthening in CDC25B mutants. Together, this study identifies a new role for CDC25B and G₂ phase length in direct versus indirect neurogenesis at early stages of cortical development.

Key words: CDC25B; cell cycle; differentiation; neocortex; neural stem cells; neurogenesis

Significance Statement

This study is the first analysis of the function of CDC25B, a G₂/M regulator, in the developing neocortex. We show that removing CDC25B function leads to a transient increase in neuronal differentiation at early stages, occurring simultaneously with a decrease in basal intermediate progenitors (bIPs). Conversely, a CDC25B gain of function promotes production of bIPs, and this is directly related to CDC25B's ability to regulate CDK1 activity. This imbalance of neuron/progenitor production is linked to a G₂ phase lengthening in apical progenitors; and using pharmacological treatments on cortical slice cultures, we show that shortening the G₂ phase is sufficient to enhance bIP production. Our results reveal the importance of G₂ phase length regulation for neural progenitor fate determination.

Introduction

During mammalian brain development, neural progenitor cells (NPCs) undergo precise sequential transitions that will define the number and type of neurons that will compose the neocortex (Kawaguchi, 2019). It is therefore important that the proliferation

and differentiation rates of these progenitors be tightly regulated during neurogenesis, to avoid dramatic cortical defects, such as microcephaly in humans (Barbelanne and Tsang, 2014).

At the onset of corticogenesis, NPCs initially divide symmetrically to expand the stem cell pool, before giving rise to apical dividing progenitors (Govindan and Jabaudon, 2017). Apical radial glial cells (aRGs) first divide symmetrically and then shift to an asymmetric self-renewing division, producing an aRG and either a neuron (direct neurogenesis) or a basal intermediate progenitor (bIP), that divide once to produce two neurons (indirect neurogenesis) (Govindan and Jabaudon, 2017; Kawaguchi, 2019). Another type of basal progenitor, basal radial glia (BRG, also called outer radial glia), has emerged during evolution and is also present in very small proportions in the subventricular zone (SVZ) and intermediate zone of rodents (Namba and Huttner, 2017; Ostrem et al. 2017). All these progenitors produce sequentially the different types of

Received Apr. 29, 2022; revised Nov. 15, 2022; accepted Nov. 23, 2022.

Author contributions: M.R. and S.B.-V. designed research; M.R., T.J., C.A., S.O., F.M., and S.B.-V. performed research; M.R. and S.B.-V. analyzed data; M.R., A.D., F.P., and S.B.-V. edited the paper; E.A., A.D., and F.P. contributed unpublished reagents/analytic tools; S.B.-V. wrote the paper.

Work in F.P.'s laboratory was supported by Center National de la Recherche Scientifique, Université P. Sabatier, and Agence Nationale de la Recherche ANR-19-CE16-0006-01. M.R. was supported by Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. We thank Valerie Lobjois for fruitful discussions; and Myriam Roussigné, Elise Cau, and Mohamad Fawal for critical reading of the manuscript.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to Sophie Bel-Vialar at sophie.vialar@univ-tlse3.fr.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0825-22.2022>

Copyright © 2023 the authors

projection neurons that colonize the six layers of the adult neocortex (Kawaguchi, 2019). The temporal transitions from one type of progenitor to another are therefore key parameters in controlling the size and functionality of the adult neocortex (Wilsch-Bräuninger et al., 2016).

Cell cycle kinetics, and in particular cell cycle phase duration, is of major importance for controlling these transitions (Dehay and Kennedy, 2007; Agius et al., 2015). Several studies showed that G₁ lengthening is an important positive regulator of neuronal differentiation, G₁ phase lengthening being associated with the transition from aRGs to bIPs during corticogenesis (Lange et al., 2009; Pilaz et al., 2009; Arai et al., 2011). In addition, it has been shown that proliferating and neurogenic progenitors display different S phase duration, the latter having a shorter S phase (Arai et al., 2011). Mitosis lengthening is also linked to an increase in neurogenic divisions (Pilaz et al., 2016). However, even if correlations have been made in different organs between the duration of G₂ phase and cell fate (Locker et al., 2006; Agathocleous et al., 2007; Gonzales and Liang, 2015; Gonzales et al., 2015), the importance of controlling G₂ length during neurogenesis remains poorly documented.

A few years ago, we showed that the CDC25B phosphatase, a master regulator of mitosis entry, favors neurogenic division at the expense of proliferative ones, and that part of this function is independent of its interaction with CDK1 (Benazerf 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 that activates CDK1-cyclinB complexes and thus promotes mitosis entry (Boutros et al., 2007). It is also recruited to the mother centrosome and is involved in the centrosome duplication cycle, as well as in microtubule nucleation (Boutros et al., 2007, 2011, 2013; Boutros and Ducommun, 2008). Our previous work shows that it allows progenitor maturation in the developing spinal cord, but it remains an open question whether this phosphatase can be considered a general player in neuronal maturation and whether regulation of G₂ phase duration has a role to play in this process.

In this study, we investigate the role of CDC25B in corticogenesis. Using a conditional CDC25B KO mouse line, we show that CDC25B loss of function in apical progenitors leads to a transient imbalance in neuronal and bIP production, accompanied by a significant lengthening of the G₂ phase. We provide evidence that this change in G₂ duration in apical progenitors causes the switch in fate, producing neurons instead of bIPs. This study sheds light on an important role of CDC25B and G₂ phase modulation for controlling the fate of apical progenitors, thus impacting the switch between direct to indirect neurogenesis.

Materials and Methods

Mice. Experiments were performed in accordance with European Community guidelines regarding care and use of animals, in agreement with the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (number C3155511, reference 0102401) and CNRS recommendations. *Cdc25b*^{+/−}; Nestin-Cre, and *Cdc25b*^{lox/lox} lines have been described previously (Tronche et al., 1999; Bonnet et al., 2018). These lines were crossed to obtain conditional mutant embryos *Cdc25b*^{lox/+}; nestin-Cre (cKO) and control embryos *Cdc25b*^{lox/+}, *Cdc25b*^{lox/+} and *Cdc25b* *lox/+*; nestin-Cre (Control) of either sex. *Tis21-GFP* line (*Tis21*^{−/tm2(Cfp)Wb}) has been described previously (Haubensak et al., 2004). This line was crossed to obtain conditional mutant embryos *Cdc25b*^{lox/+}; nestin-Cre; *Tis21-GFP* that express GFP under the control of the *Tis21* promoter. Embryonic (E) day 0.5 was assumed to start at midday of the day of the vaginal plug.

Table 1. Cell cycle parameters in Ctl and cKO aRGs

E14.5	T _C	T _S	T _{G2}	*T _{G1}
Control	17 h 58	4 h 47	2 h 12	10 h 29
<i>Cdc25b</i> ^{lox/lox}	18 h 15	4 h 41	4 h 05	8 h 59
ΔT	0 h 18	−0 h 06	1 h 53	−1 h 30
%FC	1.7%	−2%	85%	−14%

ISH and immunohistochemistry. ISH was performed on 60 μm vibratome coronal sections of mouse brain embryos as described previously (Bonnet et al., 2018). For immunohistochemistry, embryos were fixed in 4% PFA at 4°C overnight, washed in PBS, and embedded in paraffin using an STP 120 Spin Tissue Processor. Brains were sliced in 6–14 μm transversal sections using a HM 355 Microtome. Sections were directly mounted on coated histologic slides. Sections were rehydrated in successive baths of histoclear (twice), 100% ethanol (twice), 95% ethanol, 70% ethanol, 50% ethanol, and deionized H₂O for 5 min each. Sections were heated in 1% citrate in H₂O at ~100°C for 45 min, permeabilized with PBS-0.5% Tween + 3% BSA + 1% horse serum and incubated with primary antibody overnight at 4°C. The following primary antibodies were used against: P-H3 (Millipore Biotechnology, 1:1000, rabbit), BrdU (G3G4, 1:400, mouse), active caspase 3 (BD Biosciences, 1:100, rabbit), GFP (Abcam, 1:1000, chick), CCND1 (Fisher Scientific, 1:200, 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), CTIP2 (Abcam, 1:200, rat), and CUX1 (Santa Cruz Biotechnology, 1:100). Sections were then washed in PBS and incubated with secondary antibodies for 2 h at room temperature. We counterstained the sections with DAPI (1:1000, Invitrogen) to identify nuclei. For BrdU detection, we treated sections with 2N HCl and then with 0.1 M Na₂B₄O₇ before incubation with primary antibodies.

Cell proliferation, cell cycle, and birth dating analysis/5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU)/BrdU experiments. We determined G₂ phase length using the percentage of labeled mitoses (PLM) paradigm (Quastler and Sherman, 1959). We injected pregnant mice intraperitoneally with 100 μl of EdU (Click-iT EdU AlexaFluor-647 Imaging Kit, Invitrogen) at 1 mg/ml. Embryos were harvested 120, 180, 240, 300, 360, or 480 min after EdU administration, and we quantified the percentage of P-H3⁺EdU⁺ colabeled nuclei with increasing times of exposure to EdU. The progression of this percentage is proportional to G₂ phase duration. To determine cell proliferation, we injected pregnant mice intraperitoneally with 1 mg/ml of EdU. Embryos were harvested 60 min later. Total cell cycle length and S phase length were determined as described previously (Martynoga et al., 2005). We injected pregnant mice intraperitoneally with 100 μl of EdU 10 mg/ml, followed by 100 μl of BrdU (Sigma) at 10 mg/ml 90 min later. Embryos were collected 30 min later. We calculated T_C and T_S from counts of EdU⁺BrdU[−] and EdU⁺BrdU⁺ cells. To determine generation of neurons by pulse-chase experiments (birth dating), we injected pregnant mice intraperitoneally with EdU at E16.5, and we harvested embryos at birth (P0). We deduced G₁ phase length by removing the average length of G₂ + S + M phases from the average total cell cycle length in control and *CDC25B*^{CKO} littermates.

Flow cytometry analysis. Flow cytometry analysis was conducted as described by Jungas et al. (2020). Cortical hemispheres were collected in PBS-1% FCS and cells mechanically dissociated through a 40 μm nylon mesh (Clearline). We suspended cells in 1.2 ml ice-cold PBS and fixed them 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 μl PI/RNase solution for 30 min in the dark. Acquisition was performed using cytoflexS with a minimum of 1000 cells with the Cytexpert software. We excluded debris and doublets using morphometric parameters (FSC/SSC) and pulse area parameters from PI emission, respectively. To set the threshold of PAX6-, TBR2-, CTIP2-, SATB2-, and GFP-positive cells, control samples cells were incubated with secondary antibody and PI only.

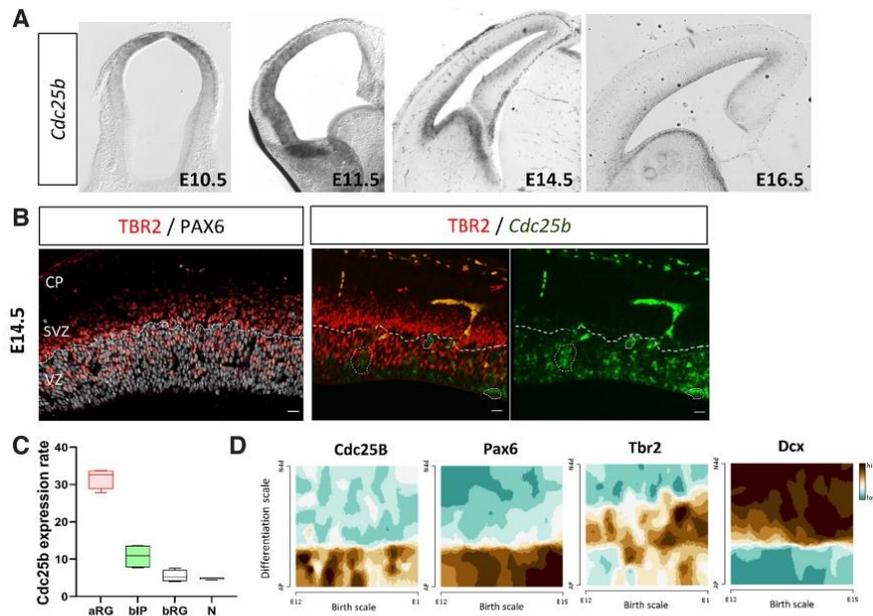


Figure 1. *Cdc25b* expression pattern during corticogenesis. *Cdc25b* is expressed in aRG progenitors (PAX6⁺ in the VZ) and progressively downregulated in basal progenitors (TBR2⁺). **A**, *Cdc25b* ISH on mouse embryo coronal sections at E10.5, E11.5, E14.5, and E16.5. **B**, PAX6 and TBR2 immunostaining and costaining of *Cdc25b* (ISH) and TBR2 expression (immunofluorescence) on E14.5 coronal brain sections. **C, D**, Quantification of *CDC25B* transcripts in progenitors and neurons using bulk RNA-Seq data from Florio et al. (2015) (**C**) and single-cell RNA-Seq from Telley et al. (2019) using the gene browser at <http://genbrowser.unige.ch/telagirdon/> (**D**).

aRG progenitor DNA content was estimated by analyzing PI emission intensity of PAX6-positive cells only.

Organotypic brain slice culture and drug treatment. Coronal slices of E13.5 control and *CDC25B*^{CKO} embryos were sectioned at 250 μm on a vibratome (Leica Microsystems). We deposited coronal slices on Millicell Cell Culture insert (0.4 μm, Millipore) in culture medium DMEM-F12, 1 × penicillin/streptavidin. Slices remained incubated in 5% CO₂ at 38°C for 24 h. For drug treatment, brain slices were incubated in culture medium containing 1 μM PD0166285 (Selleckchem).

To determine cell proliferation and the PLM paradigm, 250 μm EdU was dropped off directly on each slice, for the duration required, depending on the analysis (see above cell proliferation section). Brain slices were fixed 1 h at room temperature in 4% PFA, and sectioned at 60 μm with a vibratome before immunostaining.

DNA constructs and in utero electroporation. In utero electroporation experiments were performed in cortices of E13.5 embryos inside the pregnant mother as described previously (Fawal et al., 2018). Embryos were harvested 28 h later. Gain-of-function experiments were performed using a vector expressing two human *Cdc25B* forms, hCDC25B3 (*Cdc25B* WT) or hCDC25B3delCDK (*Cdc25BdelCDK*), under the control of a *cis* regulatory element of the mouse *Cdc25B* called pccRE (Körner et al., 2001; Bonnet et al., 2018). A control vector was generated with the β-Gal gene downstream of the pccRE; 1.5 mg/ml of either plasmid expressing *Cdc25b* or control plasmid was coinjected with 1 μg/μl pCIG-GFP and Fast Green (Sigma) in the lateral ventricle of embryos neocortex, manually using a beveled and calibrated glass micropipette. For electroporation, five 50 ms pulses of 35 V with a 950 ms interval were delivered across the uterus with two 3 mm electrode paddles positioned on either side of the head. Before surgery, mice were subcutaneously injected with 100 μl of morphine at 2.5 mg/kg. Mice were anesthetized with 4% isoflurane. After surgery, mice were subcutaneously injected with 100 μl of 2 mg/ml metacam.

Imaging and statistical analysis. All images of immunostained sections were acquired using a SP8 Leica confocal microscope. For each

experiment, we analyzed at least three independent litters and three different slides per embryo. The quantifications were performed in the lateral half of the intermediary cortex, except for the G₂ length estimation, for which the P-H3/EdU count was performed in the entire hemisection. For each experiment, we verified that the cell density was the same between Ctl and cKO. Quantitative data are expressed as mean ± SEM. They are represented as scatter plots with a bar, each point showing the value for one embryo, or as a violin plot, when the number of measures was large enough (see Fig. 5). Table 1 was established from the values reported in Figure 6. Statistical analyses were performed using Graph Pad Prism 9 or the RStudio software. Significance was assessed by performing the Mann–Whitney *t* test, the Wilcoxon test, or using the mixed effect model followed by an ANOVA test as described previously (Bonnet et al., 2018).

Results

Cdc25b is expressed in apical progenitors

To determine whether *Cdc25b* is expressed in all cortical progenitors or in a subset of them, we performed ISH on brain coronal sections at key stages of corticogenesis (Fig. 1A). *Cdc25b* is detected in neuroepithelial cells from E10.5. At E11.5, *Cdc25b* is expressed in the ventricular zone (VZ) of the cortex, consisting of proliferating progenitors. At E14.5 and E16.5, it still appears restricted to the VZ that contains PAX6⁺ apical progenitors (aRGs) and TBR2⁺ newborn basal progenitors (bIPs) (Fig. 1A). To determine whether it is also expressed in the SVZ, we performed immunostaining for TBR2 following ISH of *Cdc25b* transcripts at E14.5. We observed that *Cdc25b* is not expressed in the SVZ, which contains TBR2⁺ bIPs, and that the TBR2⁺ cells in the VZ (newborn bIPs) (Arai et al., 2011) do not overlap with *Cdc25b*-

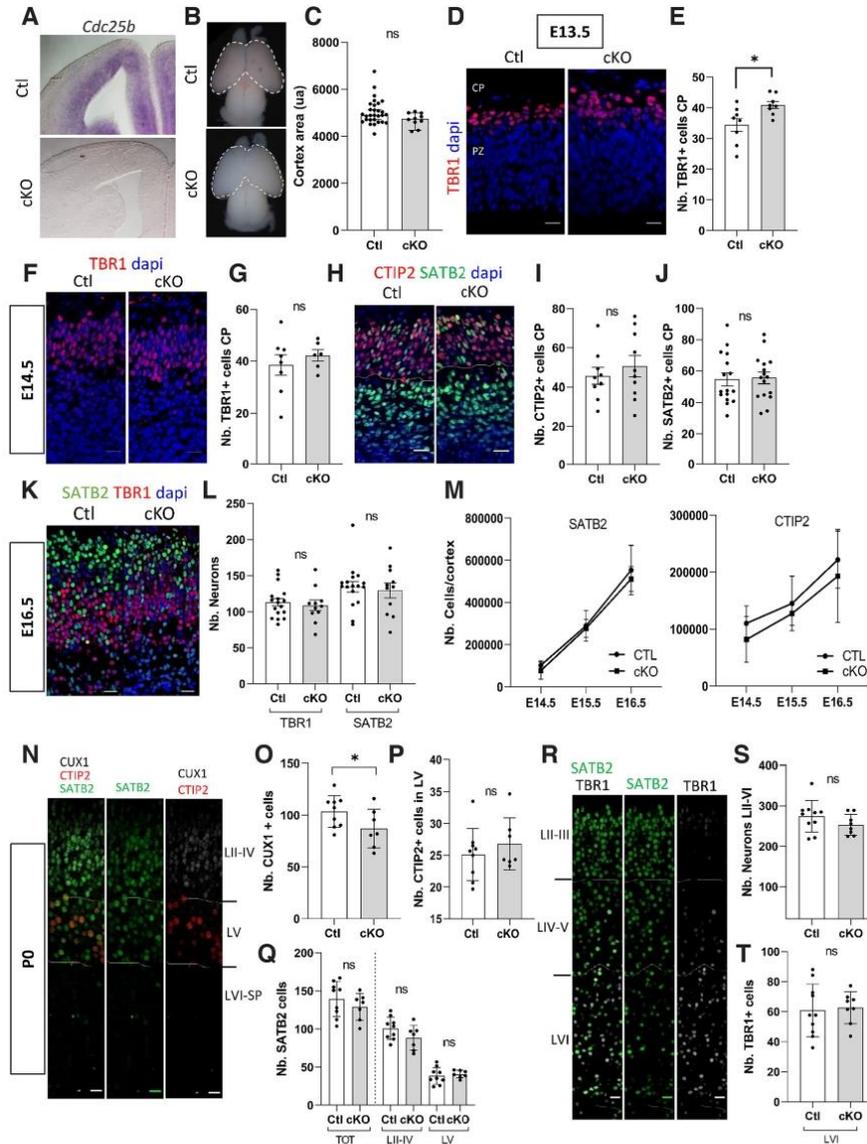


Figure 2. *Cdc25b* loss of function triggers a transient increase of neuronal differentiation and a defect of neuronal specification. **A**, *Cdc25b* ISH at E14.5 on control (Ctl) and *Cdc25b* cKO embryo coronal sections. **B**, **C**, Cortical area (white dotted line) measurement in Ctl and cKO embryos at P0. **C**, Each point represents the cortex area in arbitrary unit (ua) for one embryo. Mann–Whitney *t* test and mixed model. Ctl, *n* = 29; cKO, *n* = 10. **D**, **F**, TBR1 immunostaining on coronal sections at E13.5 (**D**) and E14.5 (**F**). Nuclei are stained with DAPI (blue nuclei). **E**, **G**, Quantification of TBR1 neurons in the cortical plate (red nuclei) at E13.5 and E14.5. Each point is the mean value of 3 sections/embryo. Mixed model. E13.5, *n* = 9 or 10. **p* = 0.019. E14.5, *n* = 6–8. **H–J**, Quantification of CTIP2 (**H**) and SATB2 neurons (**J**) in the cortical plate at E14.5. Each point is the mean value of 3 sections/embryo. Mixed model. CTIP2, *n* = 9 or 10; SATB2, *n* = 16. **K**, TBR1 (red nuclei) and SATB2 (green nuclei) immunostaining on coronal sections at E16.5; nuclei are stained with DAPI (blue nuclei). **L**, Quantification of SATB2⁺ and TBR1⁺ neurons in Ctl and cKO embryos at E16.5. Each point is the mean value of 3 sections/embryo. Ctl, *n* = 17; cKO, *n* = 11. Mixed model. **M**, Dynamics of neuronal production in Ctl and cKO quantified by FACS of SATB2 and CTIP2 neurons from E14.5 to E16.5. Each point represents the mean number of cells of several cortices: E14.5, Ctl, *n* = 6; cKO, *n* = 5; E15.5, Ctl, *n* = 6; cKO, *n* = 3; E16.5, Ctl, *n* = 6; cKO, *n* = 2. **N**, CUX1, CTIP2, and SATB2 immunostaining on P0 coronal brain sections of Ctl embryos. **O–Q**, Quantification of CUX1 (**O**), CTIP2 (**P**), and SATB2 (**Q**) cells in Ctl and cKO embryos at P0. Ctl, *n* = 9; cKO, *n* = 7. Mixed model. **p* = 0.043. Each point is the mean value of 3 sections/embryo. **R**, TBR1 (gray nuclei) and SATB2 (green nuclei) immunostaining on coronal sections at P0. **S**, Total number of neurons in layers II–VI (SATB2 + TBR1 neurons) at P0 in 100 μ m wide on coronal sections from **R**. **T**, Quantification of TBR1⁺ neurons in layer VI in 100 μ m wide on coronal sections from **R**. Each point represents the mean value of 3 sections/embryo. Ctl, *n* = 10; cKO, *n* = 8. Mixed model. CP, Cortical plate; PZ, progenitor zone. Scale bars, 20 μ m.

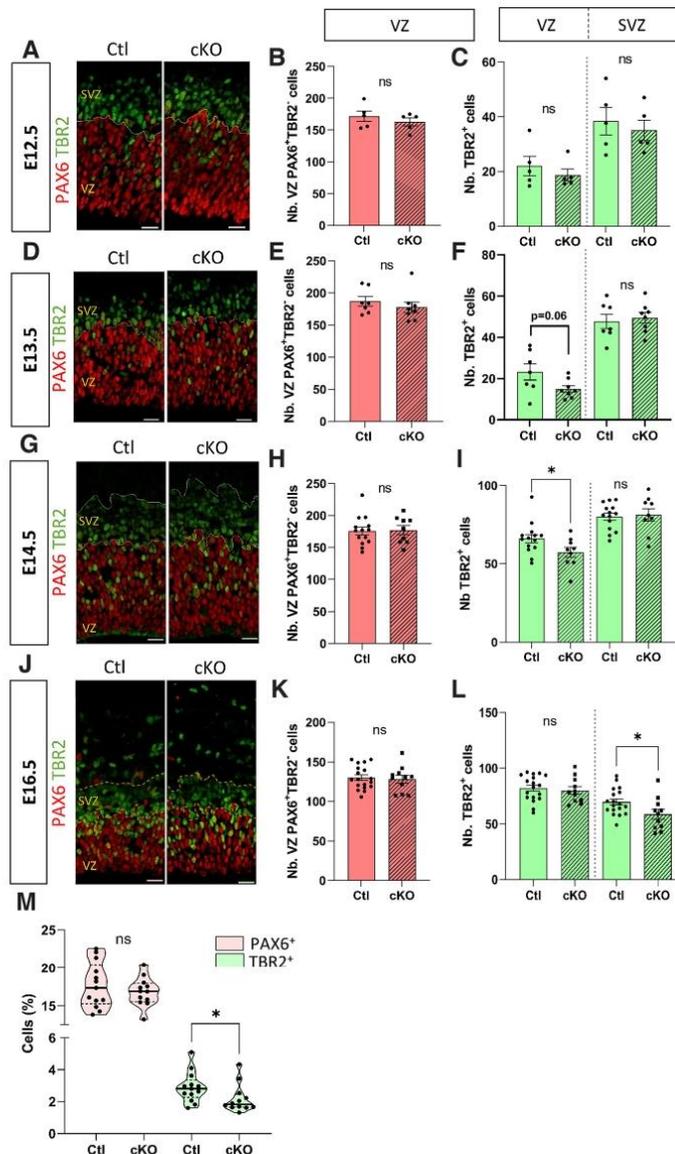


Figure 3. Cdc25b loss of function impairs basal progenitor production. *A, D, G, J*, PAX6 and TBR2 immunostaining on E12.5 (*A*), E13.5 (*D*), E14.5 (*G*), and E16.5 (*J*) coronal brain sections, in Ctl and *cKO* embryos. *B, C, E, F, H, I, K, L*, Quantification of PAX6⁺ cells in the VZ (aRGs) and TBR2⁺ cells in the VZ and SVZ (bIPs) at E12.5 (*B, C*), *n* = 5; E13.5 (*E, F*), *n* = 7 or 8; E14.5 (*H, I*), *n* = 9–14; E16.5 (*K, L*), *n* = 11–18 in Ctl and *cKO* embryos. Each point is the mean value of 3 sections/embryo. Mann–Whitney *t* test and mixed model. *I*, **p* = 0.05. *L*, **p* = 0.025, mixed model. *M*, Flow cytometry analysis of the proportion of PAX6⁺ + (aRGs + bRGs) and TBR2⁺ (bIPs) singulates cells for Ctl and *cKO* E14.5 cortices. Each point represents the percentage of cells for one embryo. Ctl, *n* = 13; *cKO*, *n* = 12. Mann–Whitney. **p* = 0.03. Scale bars, 20 μ m.

expressing cells either (Fig. 1*B*). To confirm this observation, we analyzed published bulk RNA-Seq data from E14.5 samples (Florio et al., 2015) and scRNA-Seq data from E12 to E15 cortices (Telley et al., 2019). This data mining confirmed that *Cdc25b* is highly

expressed in aRGs, barely in bIPs, and is not expressed in bRGs and neurons (Fig. 1*C, D*). Overall, these analyses indicate that, in the developing cortex, *Cdc25b* is predominantly expressed in aRGs, progressively extinguished in bIPs, and absent in neurons.

Cdc25b deletion transiently leads to increased neuronal differentiation and decreased basal progenitor production

Having determined that *Cdc25b* expression is restricted to the apical progenitors, we next investigated its function during the early phases of corticogenesis in *Cdc25b*^{fl/fl}; *NestinCre* (*Cdc25b*^{*cKO*} or *cKO*) embryos, in which *Cdc25b* expression is specifically extinguished in NPCs from the onset of neurogenesis (Bonnet et al., 2018). In these embryos, deletion is complete in the cortex from E10.5 (Madisen et al., 2010); and at E14.5, *Cdc25b* expression is abolished in the whole brain (Fig. 2*A*). We first measured cortical hemisphere size at the postnatal stage (P0) and did not observe any gross size defect in *Cdc25b*^{*cKO*} newborns (Fig. 2*B, C*). We then checked the production of different types of neurons over time. TBR1⁺, CTIP2⁺, and SATB2⁺ neurons are sequentially produced between E12.5 and E16.5 (Molyneaux et al., 2007; Vasistha et al., 2015). At E13.5, the majority of neurons express TBR1. In *Cdc25b*^{*cKO*}, the number of TBR1⁺ neurons is transiently increased in the most lateral part of the cortical plate at E13.5 (Fig. 2*D, E*). This increase is no longer significant at E14.5 (Fig. 2*F, G*). We then checked CTIP2⁺ and SATB2⁺ neurons at E14.5 and found that their production occurs normally at this stage in *Cdc25b*^{*cKO*} (Fig. 2*H–J*). At E15.5 and E16.5, no difference is observed in the number of TBR1⁺, CTIP2⁺, or SATB2⁺ neurons (Fig. 2*K–M*). These results indicate that, in *Cdc25b*^{*cKO*}, neuronal production is transiently increased at E13.5 but has returned to normal at later stages.

To examine whether this transient increase of neuron production at E13.5 induces a change in neuron specification, we quantified the number of neurons in several layers at P0 using CTIP2 (layer V), SATB2, CUX1 (LII–III), and TBR1 (LVI) (Fig. 2*N–T*). Only the CUX1⁺ neuron number was slightly reduced in layers II–III (Fig. 2*O*). As CUX1⁺ neurons are mainly produced from TBR2⁺ basal progenitors (Vasistha et al., 2015), this suggests that, in *cKO*, the increased production of TBR1 neurons at E13.5 is made at the expense of basal progenitor production.

The production of basal progenitors is impaired in cKO

To assess whether basal progenitor production is impaired in cKOs or whether the increased number of TBR1⁺ neurons is because of premature differentiation of bIPs, we analyzed the dynamics of the production of the different progenitor types in *Cdc25b*^{cKO} embryos. We examined aRG distribution (PAX6⁺ cells in the VZ and SVZ), bIP cell production (TBR2⁺ newborn cells in the VZ), and bIP accumulation (TBR2⁺ cells that have migrated in the SVZ), in the lateral part of the hemicortex between E12.5 and E16.5 (Fig. 3). The number of aRGs is not significantly affected at any of the four stages analyzed in *Cdc25b*^{cKO} embryos (Fig. 3*B, E, H, K*), and they are correctly located in the VZ (Fig. 3*A, D, G, J*). bIP production starts to be impaired from E12.5, being significantly reduced by E13.5 (Fig. 3*G, I*), and this decrease leads to a deficit of bIP in the SVZ at E16.5 (Fig. 3*J, L*). To consolidate these data, we also quantified the total number of PAX6⁺ and TBR2⁺ cells in control (Ctl) and *Cdc25b*^{cKO} cortices using cytometry (Jungas et al., 2020). While the total number of PAX6⁺ cells is not modified, the number of TBR2⁺ cells is significantly reduced in *Cdc25b*^{cKO} at E14.5, confirming that bIP but not aRG production is affected in *Cdc25b*^{cKO} (Fig. 3*M*). We verified that this reduction was not because of apoptosis, by quantifying activated Caspase3⁺ cells in the progenitor zone at E13.5 and E16.5, and we observed no difference between Ctl and *Cdc25b*^{cKO} cortices (Fig. 4*A, B*). In addition, we quantified proliferation of bIPs (TBR2⁺ cells in VZ and SVZ) at E14.5 and found that proliferative and mitotic indexes were normal, ruling out that the reduced bIP number was because of a proliferation defect in these cells (Fig. 4*C, D*). Together, these results indicate that the reduced number of basal progenitors in *Cdc25b*^{cKO} is most likely because of a reduction in their production from aRGs. As the number of aRGs is not modified, this suggests that, at E13.5, in the absence of CDC25B, the progeny of aRGs is changed from giving one aRG + one bIP to one aRG + one neuron. If this scenario is true, the balance between proliferative versus neurogenic division should not change in *Cdc25b*^{cKO}, as all three types of division mentioned above are neurogenic divisions. To assess this, we generated *Cdc25b*^{cKO} mice carrying a Tis21-GFP allele to distinguish aRGs committed to a neuronal or bIP fate (TIS21⁺) from self-expanding aRGs (TIS21⁻) (Haubensack et al., 2004; Attardo et al., 2008). We did not detect any change in the number of TIS21-GFP cells among aRGs at E13.5 in *Cdc25b*^{cKO} compared with the Ctl (Fig. 4*F, G*), confirming that CDC25B does not change the mode of division of aRGs from proliferative to neurogenic but rather influences the fate of neurogenic divisions.

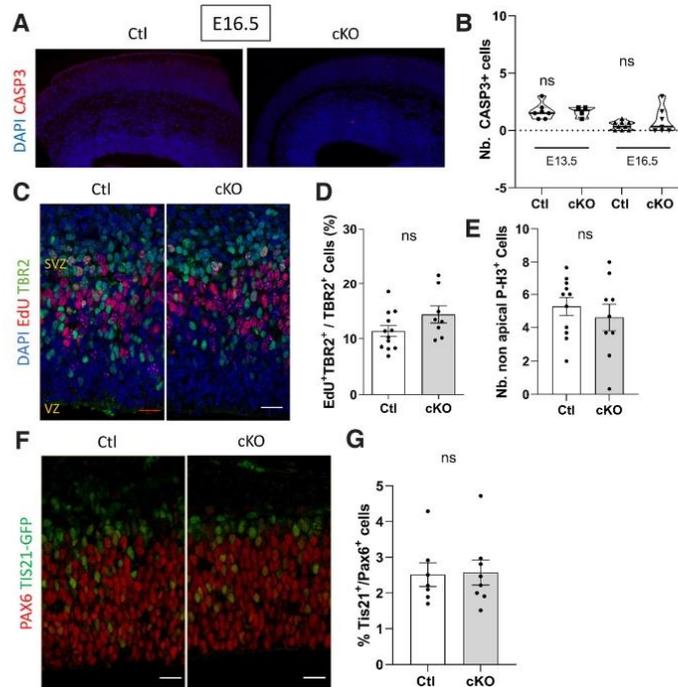


Figure 4. The reduction of bIP cells in cKOs is not because of increased cell death, reduced proliferation rate, or a change of the mode of division of aRGs. **A**, Immunostaining of CASP3⁺ cells on E16.5 coronal sections. **B**, Quantification of activated CASP3⁺ cells on frontal brain sections of Ctl and cKO embryos at E13.5 and E16.5. Each point is the mean value of counting in 3 sections/embryo. E13.5: Ctl, *n* = 7; cKO, *n* = 4; E16.5: Ctl, *n* = 9; cKO, *n* = 7. Mann–Whitney. **C**, Tbr2 and EdU labeling on coronal section after 1h EdU pulse just before harvesting embryos at E14.5. **D**, Quantification of EdU⁺ cells among total Tbr2⁺ cells (bIPs) in Ctl and cKO embryos at E14.5. Ctl, *n* = 12; cKO, *n* = 8. Mann–Whitney. **E**, Quantification of P-H3⁺TBR2⁺ cells (nonapical mitotic bIPs) in E14.5 Ctl and cKO embryos. Ctl, *n* = 11; cKO, *n* = 9. Mixed model. **F**, PAX6 immunostaining on brain coronal sections at E13.5 in TIS21-GFP⁺ Ctl or cKO embryos. **G**, Quantification of PAX6⁺ TIS21-GFP⁺ cells (differentiating aRGs) among PAX6⁺ cells. Each point is the mean value of 3 sections/embryo. Mixed model. Scale bars, 20 μm.

Overall, these analyses of neuron and progenitor production at several developmental stages indicate a transient increase in neuron production, accompanied by a transient decrease in bIP production in *Cdc25b*^{cKO} embryos, with no change in aRG numbers. This suggests that in *Cdc25b*^{cKO}, aRGs transiently produce neurons instead of bIPs, and that CDC25B controls the tempo of switch between direct versus indirect neurogenesis.

The control of basal progenitor production by CDC25B requires CDK interaction

We previously showed that CDC25B can act independently of CDK interaction and G₂ phase regulation in the developing spinal cord (Bonnet et al., 2018). To test whether its role in cortical neurogenesis is dependent or independent of CDK interaction, we compared the effect of CDC25B gain of function with that of a mutated form of CDC25B, CDC25BdelCDK, which is no longer able to interact with CDK1 to regulate G₂ phase length (Bonnet et al., 2018). We used *in utero* electroporation at E13.5 and analyzed the fate of electroporated cells 28 h later (Fig. 5*A*). Compared with a GFP⁺ control vector, overexpressing CDC25B increases the number of TBR2⁺ cells without changing the number of aRGs (TBR2⁻ cells in the VZ), indicating that CDC25B is

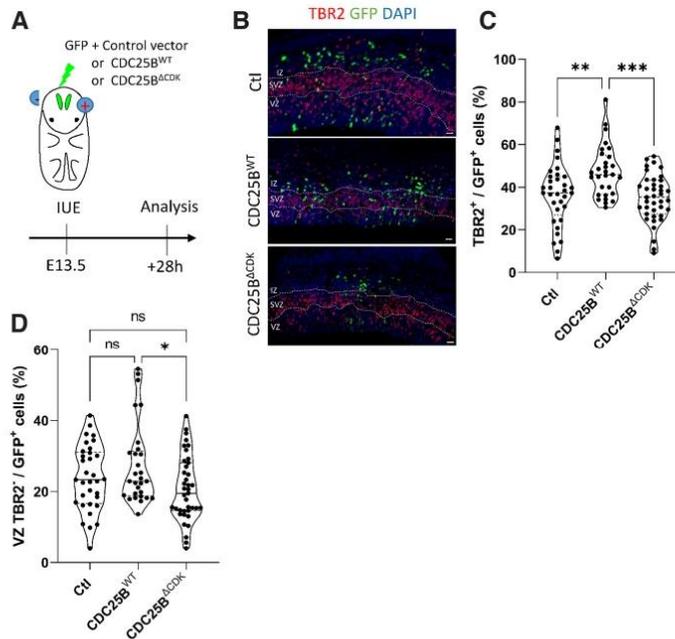


Figure 5. Cdc25b regulation of bIP production is CDK1-dependent. **A**, Schematic representation and timeline of *in utero* electroporation experiments. **B**, GFP and TBR2 immunostaining on E14.5 brain coronal sections after *in utero* electroporation of a pmp-LacZ (Ctl), pmp-CDC25BWT (CDC25BWT), or pmp-CDC25BΔCDK (CDC25BΔCDK) expression vectors at E13.5. **C**, Quantification of GFP⁺ cells, which are TBR2⁺ (bIPs) per section of Ctl, CDC25BWT, or CDC25BΔCDK electroporated embryos. ***p* = 0.007; ****p* < 0.0004; Kruskal–Wallis. **D**, Quantification of GFP⁺ cells that are TBR2⁺ in the VZ (aRGs) after electroporation. Kruskal–Wallis. **p* = 0.003. **C, D**, Each point represents the mean value for 3 z sections/embryo. Ctl, *n* = 33; CDC25BWT, *n* = 29; CDC25BΔCDK, *n* = 39. IZ, Intermediate zone. Scale bars, 20 μm.

sufficient to promote bIP production (Fig. 5B–D). Unlike WT CDC25B, ectopic expression of CDC25BΔCDK does not alter the number of TBR2⁺ cells (Fig. 5B,C). These results clearly show that CDC25B is sufficient to enhance bIP production and that this effect requires an interaction with CDK, suggesting that this control is exerted via a modification of the duration of the G₂ phase.

Cdc25b loss of function severely increases the length of the G₂ phase without affecting the total duration of the cell cycle
Knowing the role of CDC25B in the control of G₂/M cell cycle phase transition, and as bIP production involves CDC25B/CDK interaction, the defect in bIP production could be because of a defect in cell cycle parameters in aRGs of *Cdc25b*^{CKO} embryos. We first measured the duration of the G₂ phase using the PLM paradigm (Quastler and Sherman, 1959). Embryos were harvested 2, 3, 4 h (Fig. 6A) or 6 h (not shown) after EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) administration, and we quantified the percentage of P-H3⁺ (Phospho-histone 3) EdU⁺/P-H3⁺ with increasing exposure times to EdU (Fig. 6A,B). We found that this percentage was consistently lower in aRGs from *Cdc25b*^{CKO} embryos.

Because the progression of this percentage is proportional to the duration of the G₂ phase, we were able to extract an average length of the G₂ phase. Loss of function of *Cdc25b* in aRGs led to a significant increase in the duration of the G₂ phase at E14.5, from 2 h 12 in controls to 4 h 05 in *Cdc25b*^{CKO} already detected

at E12.5 (Fig. 6B; Table 1). In addition, we observed a strong delay in apical migration of EdU-labeled cycling progenitors (Fig. 6C), resulting in a reduction in the number of apical mitosis (P-H3⁺ cells; Fig. 6D), coherent with the G₂ phase lengthening. We then determined whether this lengthening of G₂ phase duration in progenitors affects their proliferation rate. We collected embryos after 1 h of EdU administration at E14.5 and quantified the EdU⁺ cells among the aRGs (VZ, TBR2⁺ cells; Fig. 6E). This percentage reflects the proportion of aRGs in S phase, and we did not observe any difference between Ctl and *Cdc25b*^{CKO} embryos (Fig. 6E). As the rate of proliferating cells was unaffected, we next investigated whether the lengthening of the G₂ phase caused a general slowdown of the total cell cycle length in aRGs. We performed dual EdU and BrdU labeling to estimate total cell cycle length (Tc) and S phase (TS) durations, as described by Martynoga et al. (2005). As shown in Figure 6F, neither the total cell cycle length nor the TS phase is significantly modified in aRGs of *Cdc25b*^{CKO} embryos. From this result, we conclude that a shortening of the G₁ phase duration may be associated to the significant lengthening of the G₂ phase. To confirm this hypothesis, we directly assessed the length of the G₁ phase by counting the number of cells expressing CCND1 (specifically expressed during the G₁ phase) among the aRGs. We observed a reduction in the number of CCND1⁺ labeled nuclei

in *Cdc25b*^{CKO} aRGs (Fig. 6G), indicating that the G₁ phase is shorter in these cells.

In conclusion, the removal of CDC25B in aRGs leads to a substantial lengthening of the G₂ phase (85% length increase; Table 1), as well as a shortening of the G₁, resulting in a normal cell cycle length and proliferation rate. If these length changes are considered in proportion to their average length, then the most considerable change we observed is in the duration of the G₂ phase (Table 1).

G₂ phase shortening drives an increase in bIP production

As the duration of the G₂ phase is almost doubled in *Cdc25b*^{CKO}, we next investigated whether this lengthening could play a role in controlling the rate of bIP production. To this end, we turned to cortical slice cultures and applied pharmacological treatments to modulate the duration of the G₂ phase. First, we treated cortical slices of E13.5 WT embryos with PD0166285, a Wee1/Myt1 inhibitor in conditions that do not induce toxicity (Fig. 7A) (Baffet et al. 2015). As Wee1 and Myt1 prevent mitosis entry through negatively regulating CDK1 activity (Potapova et al., 2009), their inhibition leads to an increase in CDK1 activity and thus to a shortening of the G₂ phase. We first determined that PD0166285 treatment at 1 μm has an effect on G₂ length in our cultures. For that, we quantified the number of EdU⁺/P-H3⁺ cells among the P-H3⁺ cells, following 2 h EdU incorporation

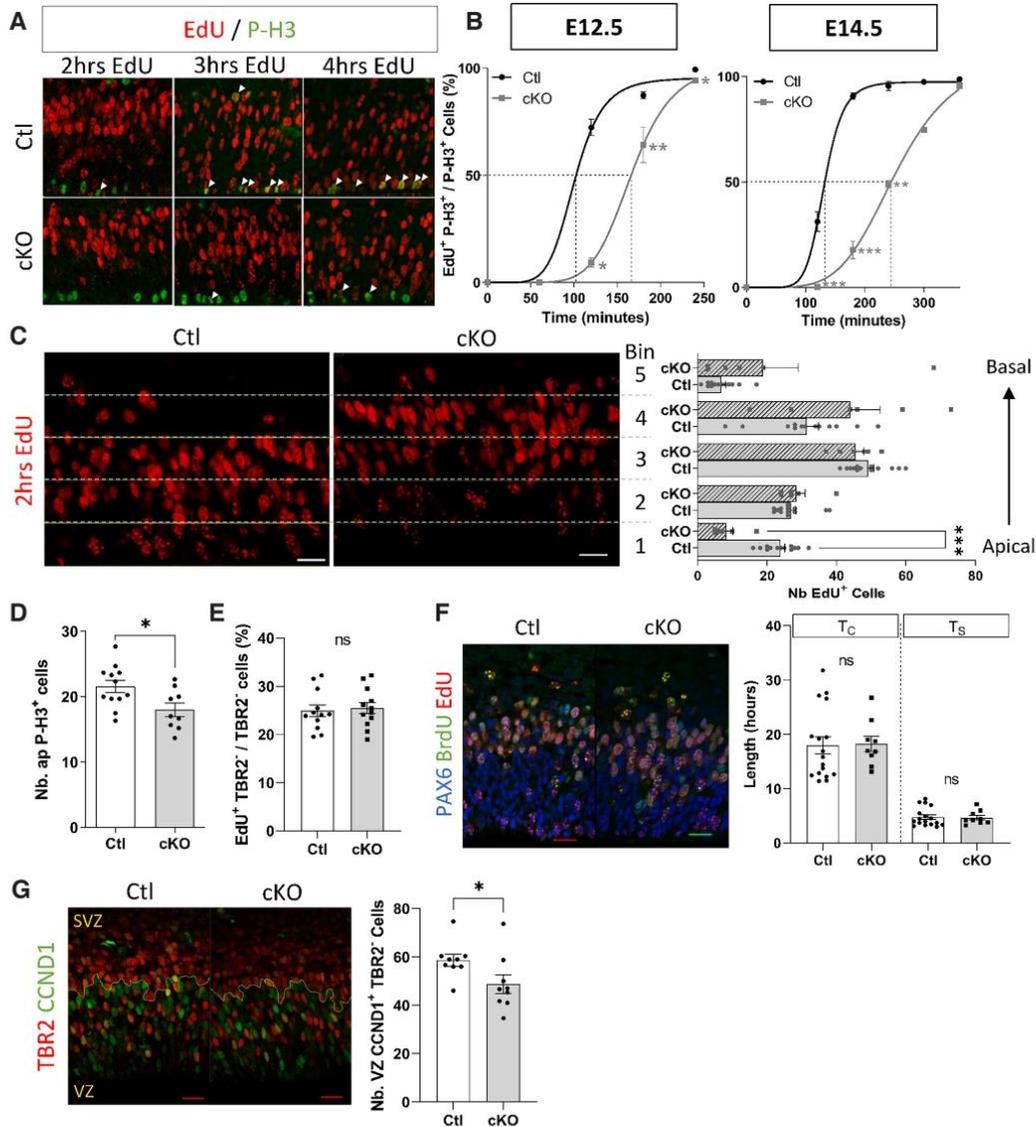


Figure 6. Cdc25b removal significantly lengthens the G₂ phase of aRG progenitors. **A**, P-H3 labeling after 2, 3, and 4 h of EdU pulse in Ctl and cKO embryos at E14.5. **B**, Quantification of the proportion of apical (aRG) EdU⁺ P-H3⁺/P-H3⁺ cells (**A**, arrowheads). T₅₀ corresponds to the time when 50% of P-H3⁺ cells are EdU⁺ (indicated by the dotted lines). Mann–Whitney *t* test. *n* = 2–10. **p* < 0.05. ***p* < 0.01. ****p* < 0.0001. **C**, EdU⁺ cell quantification after 2 h EdU pulse, in 30 μm high bin from apical (bin 1) to basal side (bin 5), in Ctl and cKO embryos at E14.5. Mann–Whitney *t* test. *n* = 6–13. ****p* < 0.0001. **D**, Quantification of apical P-H3⁺ cells in Ctl and cKO E14.5 cortices. Mann–Whitney and mixed model. *n* = 9–12. **p* = 0.023. **E**, Quantification of EdU⁺ cells among VZ TBR2[−] (aRGs) cells after 1 h EdU pulse in Ctl and cKO E14.5 embryos. Mixed model. *n* = 12. **F**, EdU/BrdU double-labeling experiments to determine total cell cycle length (T_c) and S phase duration (T_s) of VZ PAX6⁺ cells (aRG), which were calculated from counts of EdU⁺ BrdU[−] and EdU⁺ BrdU⁺ cells as described previously (Martynoga et al., 2005). Bar plots represent the average length of measured T_c and T_s in aRGs of Ctl and cKO E14.5 embryos. Mann–Whitney *t* test and mixed model. *n* = 9–17. **G**, CCND1/TBR2 double immunostaining to determine the proportion of progenitor in G₁ phase. Quantification of CCND1⁺ cells among VZ TBR2[−] (aRGs) cells in Ctl and cKO E14.5 cortices. Mixed model. *n* = 9. **p* = 0.023. In bar plots, each point is the mean value of 3 sections/embryo. Scale bars, 20 μm.

just before culture arrest. The percentage of EdU⁺ cells was identical between untreated and treated controls (~22% in both conditions, not shown). This indicates that the rate of proliferation is not significantly altered by pharmacological treatment and

that the cortical slices are still in good physiological state at the end of the culture. We confirmed that this treatment effectively reduces the time spent in G₂ phase by considering the percentage of EdU⁺ P-H3⁺/P-H3⁺ cells in untreated and treated samples

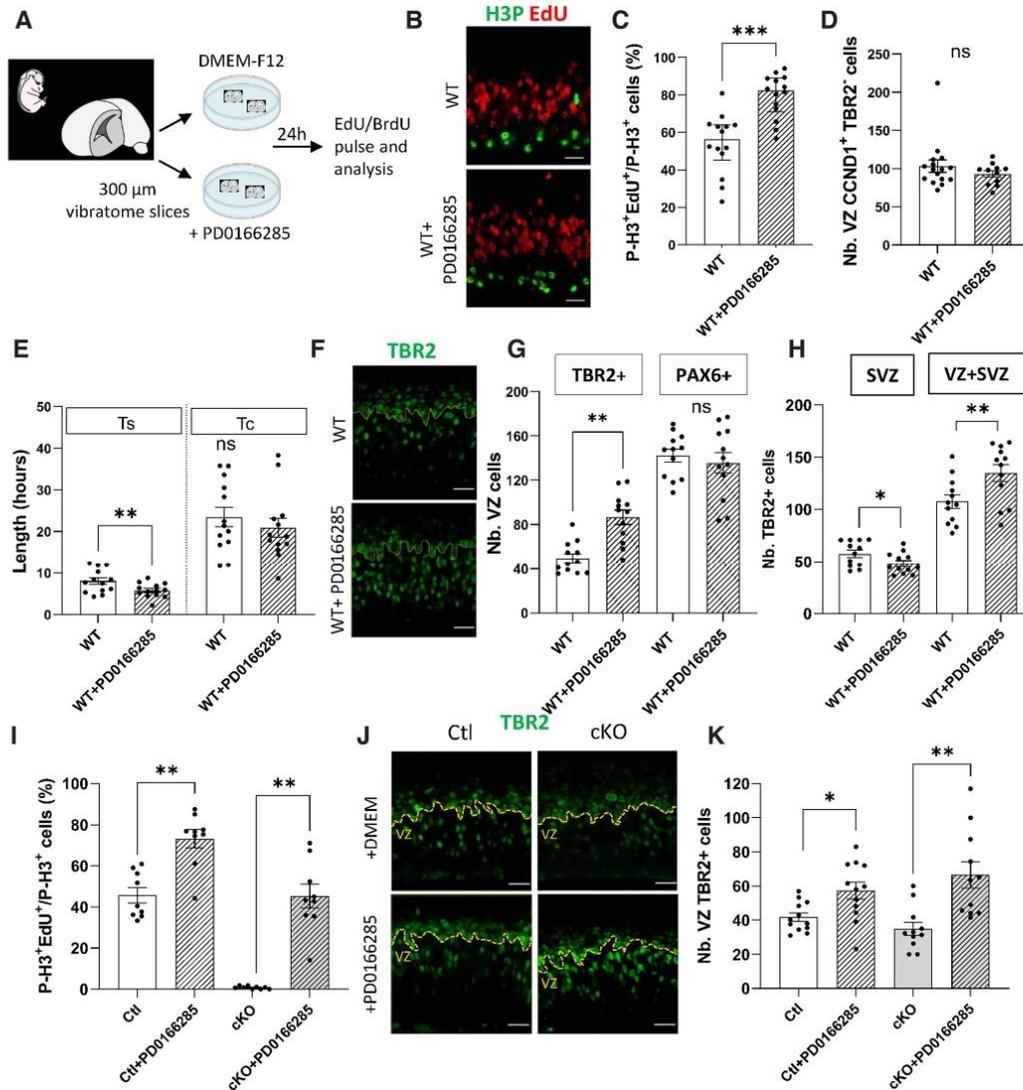


Figure 7. G₂ phase shortening triggers bIP production. **A**, Schematic representation of embryo brain slice culture experiments. **B**, P-H3 labeling after 2 h of EdU pulse in Ctl and cKO embryos at the end of the culture. **C**, Percentage of EDU⁺H3P⁺/H3P⁺ cells following 2 h EdU pulse, in untreated and PD0166285-treated WT brain slices. Wilcoxon test. $n = 14$. $***p < 0.0001$. **D**, Quantification of CCND1⁺ TBR2⁺ cells (aRG in G₁ phase) in WT and PD0166285 brain slices. Wilcoxon test. $n = 11-16$. **E**, Total cell cycle length (T_c) and S phase duration (T_s) of VZ TBR2⁺ cells (aRGs) in WT and PD0166285 brain slices. Wilcoxon test. $n = 13$. $**p < 0.01$. **F**, TBR2 immunostaining on WT and PD0166285 brain slices. **G**, Quantification of bIPs (TBR2⁺ cells) and aRGs (TBR2⁺ cells) in the VZ of WT and PD0166285 brain slices. Wilcoxon test. $n = 17$. $**p < 0.01$. **H**, Quantification of the number of TBR2⁺ cells in the SVZ and VZ+SVZ in the same sections as in Figure 6F. **G** (WT and PD0166285 brain slices). Wilcoxon test. $*p = 0.02$. $**p = 0.007$. **I**, Percentage of EDU⁺H3P⁺/H3P⁺ cells following a 2 h EdU pulse in untreated or PD0166285-treated, Ctl or cKO brain slices. Wilcoxon test. $n = 9$. $**p < 0.01$. **J**, TBR2 immunostaining on untreated or PD0166285-treated Ctl or cKO brain slices. **K**, Quantification of TBR2⁺ cells (bIPs) in the VZ of untreated or PD0166285-treated, Ctl or cKO brain slices. Wilcoxon test. $n = 9$. $*p < 0.05$. $**p < 0.01$. Each point represents the mean value of 3 sections/embryo. Scale bars, 20 μm.

(increased 1.5× in treated cortices; Fig. 7B,C). We analyzed the impact of this treatment on the duration of the G₁ and S phases and on the total duration of the cell cycle. We found that S phase is significantly reduced by PD0166285 treatment, whereas G₁

phase duration and total cell cycle length are not significantly modified (Fig. 7D,E). We then counted the number of TBR2⁺ cells in treated and untreated slices and observed that pharmacological shortening of the G₂ phase leads to a doubling of the

number of bIPs in the VZ (Fig. 7F–H), leading to a global increase of bIP cells in the progenitor zone. We then investigated whether this treatment would be sufficient to correct the defect of bIP production in *Cdc25b*^{CKO} cortices. We therefore applied the same experimental protocol as above to *Cdc25b*^{CKO} and control littermates. As observed on WT embryos, treatment with 1 μM PD0166285 leads to a marked increase in EdU⁺P-H3⁺/P-H3⁺ cells in both control and *Cdc25b*^{CKO}-treated slices, indicating a shortening of the G₂ phase, with the EdU⁺P-H3⁺/P-H3⁺ ratio in treated *Cdc25b*^{CKO} slices now at the level of untreated control littermates (Fig. 7I). We then checked the number of TBR2⁺ cells in the VZ and observed a significant increase of these cells in treated versus untreated *Cdc25b*^{CKO} slices (1.9-fold increase) and treated versus untreated control littermates (1.5-fold increase) (Fig. 7J,K). This indicates that shortening the G₂ length in *Cdc25b*^{CKO} is sufficient to restore efficient bIP production.

Overall, these results indicate that the duration of the G₂ phase is an important parameter when controlling bIP production during early phases of cortical development.

Discussion

In this study, we investigate the function of CDC25B during corticogenesis. We show that removing CDC25B function leads to a transient increase in neuron numbers at early stages, accompanied by a decrease in the number of intermediate basal progenitors. This imbalance of neuron/progenitor number is because of a modification of the G₂ phase length in apical progenitors. We propose a model in which CDC25B expression in aRGs controls the switch from direct to indirect neurogenesis through modulation of G₂ phase length.

In the developing neocortex, neurons can be produced either directly from asymmetric division of apical progenitors or indirectly from symmetric division of intermediate basal progenitors (Govindan and Jabaudon, 2017). Controlling the balance between these two modes of production is important for the integrity and size of the cortex, but it also has an impact on the type of neurons that are produced (Haubensak et al., 2004; Attardo et al., 2008; Govindan and Jabaudon, 2017). In *Cdc25b*^{CKO}, we observe a specific increase in TBR1⁺ neurons at E13.5, concomitant with a decrease in bIP number. Conversely, a CDC25B gain of function at E13.5 leads to an increase in bIPs in the VZ. We can exclude that the increase in neuron production is because of an increase in aRG production, as the number of aRG is not altered in *Cdc25b*^{CKO}. Furthermore, if this scenario were true, one would expect that there would also be more bIPs produced. This alteration in the number of bIPs and neurons is also not because of an overproduction of neurons from bIPs. Indeed, the increase in neuron production in *Cdc25b*^{CKO} embryos precedes the decrease in bIPs of the SVZ; and if bIPs differentiated into neurons prematurely, we should detect a decrease in bIP cells in the SVZ as early as E13.5, which is not the case. Since the number of aRGs is normal and the ratio of proliferative to neurogenic division is unchanged in *Cdc25b*^{CKO}, our results indicate a change in the progeny of asymmetrically dividing aRGs, producing neurons instead of bIPs (Fig. 8). This phenotype is transient, as at E16.5 we no longer observe a defect in bIP number in the VZ, and the total number of neurons is unchanged in *Cdc25b*^{CKO}. This could indicate either a compensation mechanism (Freret-Hodara et al., 2017) or, alternatively, that CDC25B is only required during early corticogenesis stages, at the time of the direct to indirect neurogenesis

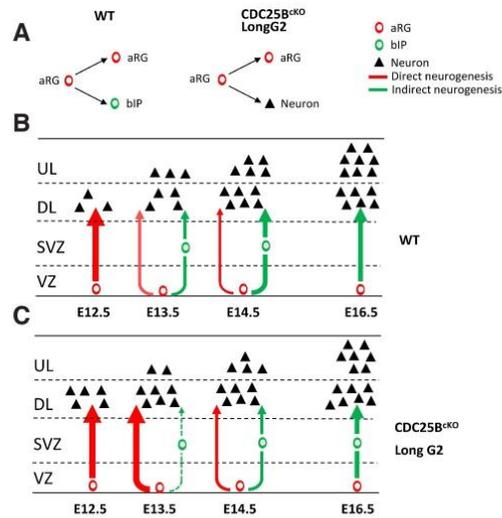


Figure 8. Model for CDC25B function during cortical neurogenesis. *A*, In *CDC25B*^{CKO}, apical progenitor asymmetric divisions produce a neuron instead of a basal progenitor. *B*, In a normal situation, deep layer neurons are produced mainly between E12.5 and E13.5, directly from APs (direct neurogenesis). At E13.5, the production of bIPs begins in the VZ, which later divides in the SVZ to give rise to neurons (indirect neurogenesis). Indirect neurogenesis gradually becomes the main mechanism of neuron production. *C*, In *CDC25B*^{CKO}, the ratio between direct and indirect neurogenesis is disturbed. Direct neurogenesis is maintained for a longer period of time, leading to an early production of deep layer neurons at the expense of bIP production. This imbalance is progressively compensated to reach normal neuronal production around E16.5. Because of this delay in the direct to indirect neurogenesis switch, upper layer neuron number is slightly reduced at P0.

switch. Hence, we propose that, in *Cdc25b*^{CKO}, the switch from direct to indirect neurogenesis is delayed, leading to a bIP/neuron production imbalance that is progressively compensated for (Fig. 8). This delay and the resulting decrease in the number of TBR2⁺ progenitors lead to a slight reduction of the CUX1⁺ upper layer neuron number at birth. This is consistent with the fact that these neurons are mainly produced from TBR2⁺ bIPs (Vasistha et al., 2015).

In a previous study, we have shown that, in the developing spinal cord, CDC25B promotes progenitor maturation as it increases the number of progenitors performing neurogenic divisions at the expense of those that self-renew (Bonnet et al., 2018). Other studies have also made indirect links between defects in the balance between proliferative versus neurogenic division during cortical neurogenesis and CDC25B misregulation (Gruber et al., 2011; Wu et al., 2014). We did not see any change in the proliferative versus neurogenic mode of division in *CDC25B* mutant cortices. Our previous observations made in the chicken neural tube indicate that part of CDC25B function during neurogenesis is independent of its function on the cell cycle (Bonnet et al., 2018). In the neocortex, the phenotype we describe requires interaction with CDK1; but in both tissues, CDC25B promotes progenitor maturation.

Another important result is that this neurogenesis defect is linked to a significant modification of the G₂ phase length. First, in *Cdc25b*^{CKO}, the most important change in cell cycle parameters in aRGs is a substantial lengthening of the G₂ length. Second, the *CDC25B*Δ^{CDK} gain of function that cannot regulate G₂ phase

length (Bonnet et al., 2018) does not phenocopy the WT form of CDC25B that increases bIP production, indicating that the defect in bIP production is directly related to the ability of CDC25B to regulate CDK1 activity. Third, we provide evidence that shortening the G₂ phase in WT embryos using a pharmacological treatment is sufficient to stimulate bIP production. Fourth, this treatment is sufficient to restore an efficient bIP production in *Cdc25b*^{KO}. In these experiments, either the G₁ phase length or the S phase length was slightly reduced. However, the changes in these phases are well below the levels that have been described as leading to alterations in aRG progenitor mode of division and fate (Lange et al., 2009; Pilaz et al., 2009; Arai et al., 2011). Furthermore, the only parameter that varies dramatically and significantly in both *Cdc25b*^{KO} and PD0166285 treatment is the length of the G₂ phase. This argues for a role of G₂ phase duration, rather than a role of duration in these experimental conditions. In *Cdc25b*^{KO}, the G₂ lengthening is associated with a perturbation of the apical nuclear migration, as BrdU⁺ aRGs nuclei take more time to reach the apical surface to perform mitosis. This perturbation is likely because apical migration and G₂ phase processing are linked, and cell cycle progression is a prerequisite to normal apical migration (Ueno et al., 2006; Baffet et al., 2015).

What is the relevance of this finding concerning the link between G₂ phase length and bIP production in a normal context? Most studies in which GAP phase length has been measured indicate that, while G₁ phase length increases during tissue maturation, G₂ phase length appears to be more stable, ~2 h in aRGs and bIPs, and does not change significantly during embryonic cortex maturation (Pilaz et al., 2009; Arai et al., 2011; Hasenpusch-Theil et al., 2018). However, these studies were performed at the level of cell population, which could have masked some heterogeneity in the duration of the G₂ phase between different progenitors. Live imaging analysis performed in the developing spinal cord indicates that the length of G₂ phase is more heterogeneous than previously described, ranging from 40 to 175 min (Molina et al., 2022). In the developing neocortex, data provided using real-time analysis of proliferating cell nuclear antigen-expressing apical progenitors show that the proportion of aRGs in G₂ phase varies between E12 and E16 (Fousse et al., 2019). A recent study from Hagey et al. (2020) also emphasizes that cortical progenitors are not equivalent regarding G₂/M phase length. Indeed, by performing single-cell RNA-Seq at different stages (from E9.5 to E18.5), they identify two temporally distinct cortical differentiation trajectories. At E11.5, progenitors can be separated into two groups: one group of lineage-committed progenitors, giving rise to deep layer neurons; and one group of uncommitted multipotent aRGs that will give rise to later born lineages. The group of lineage-committed progenitors spends more time in G₁ and expresses G₁-associated cyclin, whereas the uncommitted ones are more prone to be found in G₂/M and express high levels of M phase associated genes, including CDK1. Interestingly, *Cdc25B* is found among the overrepresented genes in the upper layer path, compared with the deep layer 1 (Hagey et al., 2020, their supplementary data 5) (*Cdc25B* in upper-layer trajectory gene sets, p-adjust = 4.04E-15). Moreover, data mining (Telley et al., 2019; Hagey et al., 2020) indicates that *Cdc25B* transcripts have the same spatial and temporal profile than genes specifically expressed in the uncommitted E11.5 aRGs (not shown). Hence, CDC25B activity, by accelerating mitosis entry, could contribute to the maintenance of the uncommitted progenitor pool at early stages, to ensure correct production of upper layer neurons later on. Different G₂ length duration, by changing the exposure time to instructive signaling

pathways such as the Slit-Robo and/or the Notch signaling pathways (Murciano et al., 2002; Cárdenas et al., 2018; Fousse et al., 2019; Hagey et al., 2020), could lead to different fate decisions after mitosis.

In conclusion, our study sheds light on a new role for CDC25B and G₂ phase length in controlling the fate of apical progenitors during early steps of corticogenesis, thereby controlling the switch from direct to indirect neuronal differentiation. The apparition of indirect neurogenesis is considered a milestone of mammalian cortical evolution leading to cortical expansion (Borrell, 2019). Expression of CDC25B in aRGs, by favoring bIP production, would be a way of supporting this evolutive trait. Future investigation will be necessary to understand the molecular mechanisms that support this function.

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.
- 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 Tissue Res* 359:201–213.
- Arai Y, Pulvers JN, Haffner C, Schilling B, Nusslein I, Calegari F, Huttner WB (2011) Neural stem and progenitor cells shorten S phase on commitment to neuron production. *Nat Commun* 2:154.
- Attardo A, Calegari F, Haubensak W, Wilsch-Brauninger M, Huttner WB (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 AD, Hu DJ, Vallee RB (2015) Cdk1 activates pre-mitotic nuclear envelope dynein recruitment and apical nuclear migration in neural stem cells. *Dev Cell* 33:703–716.
- Barbelanne M, Tsang WY (2014) Molecular and cellular basis of autosomal recessive primary microcephaly. *Biomed Res Int* 2014:547986.
- Benazeraf B, Chen Q, Peco E, Lobjois V, Medevielle F, Ducommun B, 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.
- Bonnet F, Molina A, Roussat M, Azais M, Vialar S, Gautrais J, Pituello F, Agius E (2018) Neurogenic decisions require a cell cycle independent function of the CDC25B phosphatase. *Elife* 7:e32937.
- Borrell V (2019) Recent advances in understanding neocortical development. *F1000Res* 8:1791.
- Boutros R, Ducommun B (2008) Asymmetric localization of the CDC25B phosphatase to the mother centrosome during interphase. *Cell Cycle* 7:401–406.
- Boutros R, Lobjois V, Ducommun B (2007) CDC25B involvement in the centrosome duplication cycle and in microtubule nucleation. *Cancer Res* 67:11557–11564.
- Boutros R, Lorenzo C, Mondesert O, Jauneau A, Oakes V, Dozier C, Gabrielli B, Ducommun B (2011) CDC25B associates with a centrin 2-containing complex and is involved in maintaining centrosome integrity. *Biol Cell* 103:55–68.
- Boutros R, Mondesert O, Lorenzo C, Astuti P, McArthur G, Chircop M, Ducommun B, Gabrielli B (2013) CDC25B overexpression stabilises centrin 2 and promotes the formation of excess centriolar foci. *PLoS One* 8:e67822.
- Cárdenas A, Villalba A, de Juan Romero C, Picó E, Kyrousi C, Tzika AC, Tessier-Lavigne M, Ma L, Drukker M, Cappello S, Borrell V (2018) Evolution of cortical neurogenesis in amniotes controlled by Robo signaling levels. *Cell* 174:590–606.e21.
- Dehay C, Kennedy H (2007) Cell-cycle control and cortical development. *Nat Rev Neurosci* 8:438–450.
- Fawal MA, Jungas T, Kischel A, Audouard C, Iacovoni JS, Davy A (2018) Cross talk between one-carbon metabolism, Eph signaling, and histone methylation promotes neural stem cell differentiation. *Cell Rep* 23:2864–2873.e7.
- Florio M, Albert M, Taverna E, Namba T, Brandl H, Lewitus E, Haffner C, Sykes A, Wong FK, Peters J, Guhr E, Klemroth S, Prüfer K, Kelso J, Naumann R, Nusslein I, Dahl A, Lachmann R, Pääbo S, Huttner WB

- (2015) Human-specific gene ARHGAP11B promotes basal progenitor amplification and neocortex expansion. *Science* 347:1465–1470.
- Fousse J, Gautier E, Patti D, Dehay C (2019) Developmental changes in interkinetic nuclear migration dynamics with respect to cell-cycle progression in the mouse cerebral cortex ventricular zone. *J Comp Neurol* 527:1545–1557.
- Freret-Hodara B, Cui Y, Griveau A, Vigier L, Arai Y, Touboul J, Pierani A (2017) Enhanced Abventricular Proliferation Compensates Cell Death in the Embryonic Cerebral Cortex. *Cereb Cortex* 27:4701–4718.
- Gonzales KA, Liang H (2015) Transcriptomic profiling of human embryonic stem cells upon cell cycle manipulation during pluripotent state dissolution. *Genom Data* 6:118–119.
- 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.
- Govindan S, Jabaudon D (2017) Coupling progenitor and neuronal diversity in the developing neocortex. *FEBS Lett* 591:3960–3977.
- 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. *Nat Cell Biol* 13:1325–1334.
- Hagey DW, Topcic D, Kee N, Reynaud F, Bergsland M, Perlmann T, Muhr J (2020) CYCLIN-B1/2 and -D1 act in opposition to coordinate cortical progenitor self-renewal and lineage commitment. *Nat Commun* 11:2898.
- Hasenpusch-Theil K, West S, Kelman A, Kozic Z, Horrocks S, McMahon AP, Price DJ, Mason JO, Theil T (2018) Gli3 controls the onset of cortical neurogenesis by regulating the radial glial cell cycle through. *Development* 145:dev163147.
- Haubensak W, Attardo A, Denk W, Huttner WB (2004) Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:3196–3201.
- Jungas T, Joseph M, Fawal MA, Davy A (2020) Population dynamics and neuronal polyploidy in the developing neocortex. *Cereb Cortex Commun* 1:tgaa063.
- Kawaguchi A (2019) Temporal patterning of neocortical progenitor cells: how do they know the right time? *Neurosci Res* 138:3–11.
- 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. *J Biol Chem* 276:9662–9669.
- Lange C, Huttner WB, Calegari F (2009) Cdk4/cyclinD1 overexpression in neural stem cells shortens G₁, delays neurogenesis, and promotes the generation and expansion of basal progenitors. *Cell Stem Cell* 5:320–331.
- 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 Dev* 20:3036–3048.
- Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, Oh SW, Zariwala HA, Gu H, Ng LL, Palmiter RD, Hawrylycz MJ, Jones AR, Lein ES, Zeng H (2010) A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci* 13:133–140.
- Martynoga B, Morrison H, Price DJ, Mason JO (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.
- Molina A, Bonnet F, Pignolet J, Lobjois V, Bel-Vialar S, Gautrais J, Pituello F, Agius E (2022) Single-cell imaging of the cell cycle reveals CDC25B-induced heterogeneity of G₁ phase length in neural progenitor cells. *Development* 149:dev199660.
- Molyneux BJ, Arlotta P, Menezes JR, Macklis JD (2007) Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 8:427–437.
- Murciano A, Zamora J, López-Sánchez J, Frade JM (2002) Interkinetic nuclear movement may provide spatial clues to the regulation of neurogenesis. *Mol Cell Neurosci* 21:285–300.
- Namba T, Huttner WB (2017) Neural progenitor cells and their role in the development and evolutionary expansion of the neocortex. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 6:1.
- Ostrem B, Lullo ED, Kriegstein A (2017) oRGs and mitotic somal translocation: a role in development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 42:61–67.
- 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.
- Pilaz LJ, Patti D, Marcy G, Ollier E, Pfister S, Douglas RJ, Betzeau 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:21924–21929.
- Pilaz LJ, McMahon JJ, Miller EE, Lennox AL, Suzuki A, Salmon E, Silver DL (2016) Prolonged mitosis of neural progenitors alters cell fate in the developing brain. *Neuron* 89:83–99.
- Potapova TA, Daum JR, Byrd KS, Gorbosky GJ (2009) Fine tuning the cell cycle: activation of the Cdk1 inhibitory phosphorylation pathway during mitotic exit. *Mol Biol Cell* 20:1737–1748.
- Quastler H, Sherman FG (1959) Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exp Cell Res* 17:420–438.
- Telley L, Agirman G, Prados J, Amberg N, Fièvre S, Oberst P, Bartolini G, Vitali I, Cadilhac C, Hippenmeyer S, Nguyen L, Dayer A, Jabaudon D (2019) Temporal patterning of apical progenitors and their daughter neurons in the developing neocortex. *Science* 364:eaav2522.
- 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. *Nat Genet* 23:99–103.
- Ueno M, Katayama K, Yamauchi H, Nakayama H, Doi K (2006) Cell cycle progression is required for nuclear migration of neural progenitor cells. *Brain Res* 1088:57–67.
- Vasistha NA, Garcia-Moreno F, Arora S, Cheung AF, Arnold SJ, Robertson EJ, Molnár Z (2015) Cortical and clonal contribution of Tbr2 expressing progenitors in the developing mouse brain. *Cereb Cortex* 25:3290–3302.
- Wilsch-Bräuninger M, Florio M, Huttner WB (2016) Neocortex expansion in development and evolution: from cell biology to single genes. *Curr Opin Neurobiol* 39:122–132.
- Wu X, Gu X, Han X, Du A, Jiang Y, Zhang X, Wang Y, Cao G, Zhao C (2014) A novel function for Foxm1 in interkinetic nuclear migration in the developing telencephalon and anxiety-related behavior. *J Neurosci* 34:1510–1522.

XII. BIBLIOGRAPHIE

- Aaku-Saraste, E., Hellwig, A., Huttner, W.B., 1996. Loss of Occludin and Functional Tight Junctions, but Not ZO-1, during Neural Tube Closure—Remodeling of the Neuroepithelium Prior to Neurogenesis. *Developmental Biology* 180, 664–679. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0336>
- Adhikari, D., Busayavalasa, K., Zhang, J., Hu, M., Risal, S., Bayazit, M.B., Singh, M., Diril, M.K., Kaldis, P., Liu, K., 2016. Inhibitory phosphorylation of Cdk1 mediates prolonged prophase I arrest in female germ cells and is essential for female reproductive lifespan. *Cell Res* 26, 1212–1225. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.119>
- Agathocleous, M., Locker, M., Harris, W.A., Perron, M., 2007. A general role of hedgehog in the regulation of proliferation. *Cell Cycle* 6, 156–159. <https://doi.org/10.4161/cc.6.2.3745>
- Agirman, G., Broix, L., Nguyen, L., 2017. Cerebral cortex development: an outside-in perspective. *FEBS Letters* 591, 3978–3992. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12924>
- 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 Tissue Res* 359, 201–213. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1998-2>
- Albert, V., Hall, M.N., 2015. mTOR signaling in cellular and organismal energetics. *Current Opinion in Cell Biology, Cell regulation* 33, 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.12.001>
- Alvarez-Medina, R., Cayuso, J., Okubo, T., Takada, S., Martí, E., 2008. Wnt canonical pathway restricts graded Shh/Gli patterning activity through the regulation of Gli3 expression. *Development* 135, 237–247. <https://doi.org/10.1242/dev.012054>
- Arai, Y., Pulvers, J.N., Haffner, C., Schilling, B., Nüsslein, I., Calegari, F., Huttner, W.B., 2011. Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nat Commun* 2, 154. <https://doi.org/10.1038/ncomms1155>
- Arai, Y., Taverna, E., 2017. Neural Progenitor Cell Polarity and Cortical Development. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11, 384. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00384>
- Artegiani, B., Lindemann, D., Calegari, F., 2011. Overexpression of cdk4 and cyclinD1 triggers greater expansion of neural stem cells in the adult mouse brain. *Journal of Experimental Medicine* 208, 937–948. <https://doi.org/10.1084/jem.20102167>
- Asano, K., 2021. Origin of translational control by eIF2 α phosphorylation: insights from genome-wide translational profiling studies in fission yeast. *Curr Genet* 67, 359–368. <https://doi.org/10.1007/s00294-020-01149-w>
- Ayeni, J.O., Audibert, A., Fichelson, P., Srayko, M., Gho, M., Campbell, S.D., 2016. G2-phase arrest prevents bristle progenitor self-renewal and synchronizes cell divisions with cell fate differentiation. *Development* dev.134270. <https://doi.org/10.1242/dev.134270>
- Azevedo, F.A.C., Carvalho, L.R.B., Grinberg, L.T., Farfel, J.M., Ferretti, R.E.L., Leite, R.E.P., Filho, W.J., Lent, R., Herculano-Houzel, S., 2009. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *Journal of Comparative Neurology* 513, 532–541. <https://doi.org/10.1002/cne.21974>
- Backman, M., Machon, O., Mygland, L., van den Bout, C.J., Zhong, W., Taketo, M.M., Krauss, S., 2005. Effects of canonical Wnt signaling on dorso-ventral specification of the mouse telencephalon. *Dev Biol* 279, 155–168. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.12.010>
- Baldin, V., Cans, C., Superti-Furga, G., Ducommun, B., 1997. Alternative splicing of the human CDC25B tyrosine phosphatase. Possible implications for growth control? *Oncogene* 14, 2485–2495. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201063>
- Ballatori, S.E., Hinds, P.W., 2016. Osteosarcoma: prognosis plateau warrants retinoblastoma pathway targeted therapy. *Sig Transduct Target Ther* 1, 1–12. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2016.1>
- Bar-On, O., Shapira, M., Skorecki, K., Hershko, A., Hershko, D.D., 2010. Regulation of APC/C (Cdh1) ubiquitin ligase in differentiation of human embryonic stem cells. *Cell Cycle* 9, 1986–1989. <https://doi.org/10.4161/cc.9.10.11727>
- Barr, F.A., Silljé, H.H.W., Nigg, E.A., 2004. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 429–441. <https://doi.org/10.1038/nrm1401>

- Baser, A., Skabkin, M., Kleber, S., Dang, Y., Gülcüler Balta, G.S., Kalamakis, G., Göpferich, M., Ibañez, D.C., Schefzik, R., Lopez, A.S., Bobadilla, E.L., Schultz, C., Fischer, B., Martin-Villalba, A., 2019. Onset of differentiation is post-transcriptionally controlled in adult neural stem cells. *Nature* 566, 100–104. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0888-x>
- Bastide, A., David, A., 2018a. The ribosome, (slow) beating heart of cancer (stem) cell. *Oncogenesis* 7, 34. <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0044-8>
- Bastide, A., David, A., 2018b. Interaction of rRNA with mRNA and tRNA in Translating Mammalian Ribosome: Functional Implications in Health and Disease. *Biomolecules* 8, 100. <https://doi.org/10.3390/biom8040100>
- Becker, K.A., Ghule, P.N., Therrien, J.A., Lian, J.B., Stein, J.L., van Wijnen, A.J., Stein, G.S., 2006. Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase. *J Cell Physiol* 209, 883–893. <https://doi.org/10.1002/jcp.20776>
- Becker, K.A., Stein, J.L., Lian, J.B., van Wijnen, A.J., Stein, G.S., 2010. Human embryonic stem cells are pre-mitotically committed to self-renewal and acquire a lengthened G1 phase upon lineage programming. *J. Cell. Physiol.* 222, 103–110. <https://doi.org/10.1002/jcp.21925>
- 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. <https://doi.org/10.1242/dev.129.22.5103>
- Bel-Vialar, S., Médevielle, F., Pituello, F., 2007. The on/off of Pax6 controls the tempo of neuronal differentiation in the developing spinal cord. *Developmental Biology* 305, 659–673. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.02.012>
- Bénazéraf, B., Chen, Q., Peco, E., Lobjois, V., Médevielle, F., Ducommun, B., 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. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.02.035>
- Bertrand, N., Médevielle, F., Pituello, F., 2000. FGF signalling controls the timing of Pax6 activation in the neural tube. *Development* 127, 4837–4843. <https://doi.org/10.1242/dev.127.22.4837>
- Bienvendu, F., Jirawatnotai, S., Elias, J.E., Meyer, C.A., Mizeracka, K., Marson, A., Frampton, G.M., Cole, M.F., Odom, D.T., Odajima, J., Geng, Y., Zagodzón, A., Jecrois, M., Young, R.A., Liu, X.S., Cepko, C.L., Gygi, S.P., Sicinski, P., 2010. Transcriptional role of cyclin D1 in development revealed by a genetic–proteomic screen. *Nature* 463, 374–378. <https://doi.org/10.1038/nature08684>
- Blanco, S., Bandiera, R., Popis, M., Hussain, S., Lombard, P., Aleksic, J., Sajini, A., Tanna, H., Cortés-Garrido, R., Gkatza, N., Dietmann, S., Frye, M., 2016. Stem cell function and stress response are controlled by protein synthesis. *Nature* 534, 335–340. <https://doi.org/10.1038/nature18282>
- Bonnet, F., Molina, A., Roussat, M., Azais, M., Bel-Vialar, S., Gautrais, J., Pituello, F., Agius, E., 2018. Neurogenic decisions require a cell cycle independent function of the CDC25B phosphatase. *eLife* 7, e32937. <https://doi.org/10.7554/eLife.32937>
- Boutros, R., Dozier, C., Ducommun, B., 2006. The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Current Opinion in Cell Biology, Cell regulation* 18, 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.02.003>
- Boutros, R., Lobjois, V., Ducommun, B., 2007. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer* 7, 495–507. <https://doi.org/10.1038/nrc2169>
- Boward, B., Wu, T., Dalton, S., 2016. Concise Review: Control of Cell Fate Through Cell Cycle and Pluripotency Networks. *Stem Cells* 34, 1427–1436. <https://doi.org/10.1002/stem.2345>
- Brar, G.A., Weissman, J.S., 2015. Ribosome profiling reveals the what, when, where and how of protein synthesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 651–664. <https://doi.org/10.1038/nrm4069>
- Brenner, A.K., Reikvam, H., Lavecchia, A., Bruserud, Ø., 2014. Therapeutic Targeting the Cell Division Cycle 25 (CDC25) Phosphatases in Human Acute Myeloid Leukemia — The Possibility to Target Several Kinases through Inhibition of the Various CDC25 Isoforms. *Molecules* 19, 18414–18447. <https://doi.org/10.3390/molecules191118414>

- Briscoe, J., Chen, Y., Jessell, T.M., Struhl, G., 2001. A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube. *Mol Cell* 7, 1279–1291. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00271-4](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00271-4)
- Briscoe, J., Novitsch, B.G., 2008. Regulatory pathways linking progenitor patterning, cell fates and neurogenesis in the ventral neural tube. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363, 57–70. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.2012>
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T.M., Ericson, J., 2000. A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 101, 435–445. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80853-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80853-3)
- Brunn, G.J., Hudson, C.C., Sekulić, A., Williams, J.M., Hosoi, H., Houghton, P.J., Lawrence, J.C., Abraham, R.T., 1997. Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science* 277, 99–101. <https://doi.org/10.1126/science.277.5322.99>
- Budde, A., Grummt, I., 1999. p53 represses ribosomal gene transcription. *Oncogene* 18, 1119–1124. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202402>
- Bukhari, A.B., Lewis, C.W., Pearce, J.J., Luong, D., Chan, G.K., Gamper, A.M., 2019. Inhibiting Wee1 and ATR kinases produces tumor-selective synthetic lethality and suppresses metastasis. *J Clin Invest* 129, 1329–1344. <https://doi.org/10.1172/JCI122622>
- Burdon, T., Smith, A., Savatier, P., 2002. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends in Cell Biology* 12, 432–438. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(02\)02352-8](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(02)02352-8)
- Bylund, M., Andersson, E., Novitsch, B.G., Muhr, J., 2003. Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1–3 activity. *Nat Neurosci* 6, 1162–1168. <https://doi.org/10.1038/nn1131>
- Cadwell, C.R., Bhaduri, A., Mostajo-Radji, M.A., Keefe, M.G., Nowakowski, T.J., 2019. Development and Arealization of the Cerebral Cortex. *Neuron* 103, 980–1004. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.07.009>
- Calegari, F., Haubensak, W., Haffner, C., Huttner, W.B., 2005. Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development. *J Neurosci* 25, 6533–6538. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0778-05.2005>
- Cárdenas, A., Villalba, A., de Juan Romero, C., Picó, E., Kyrousi, C., Tzika, A.C., Tessier-Lavigne, M., Ma, L., Drukker, M., Cappello, S., Borrell, V., 2018. Evolution of Cortical Neurogenesis in Amniotes Controlled by Robo Signaling Levels. *Cell* 174, 590–606.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.007>
- Carnero, A., Hannon, G.J., 1998. The INK4 Family of CDK Inhibitors. *Cyclin Dependent Kinase (CDK) Inhibitors* 43–55. https://doi.org/10.1007/978-3-642-71941-7_3
- Carroll, A.J., Heazlewood, J.L., Ito, J., Millar, A.H., 2008. Analysis of the Arabidopsis cytosolic ribosome proteome provides detailed insights into its components and their post-translational modification. *Mol Cell Proteomics* 7, 347–369. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700052-MCP200>
- Carruthers, S., Mason, J., Papalopulu, N., 2003. Depletion of the cell-cycle inhibitor p27Xic1 impairs neuronal differentiation and increases the number of ElrC+ progenitor cells in *Xenopus tropicalis*. *Mechanisms of Development* 120, 607–616. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(03\)00010-8](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(03)00010-8)
- Caspary, T., Anderson, K.V., 2003. Patterning cell types in the dorsal spinal cord: what the mouse mutants say. *Nat Rev Neurosci* 4, 289–297. <https://doi.org/10.1038/nrn1073>
- Cazales, M., Schmitt, E., Montembault, E., Dozier, C., Prigent, C., Ducommun, B., 2005. CDC25B phosphorylation by Aurora-A occurs at the G2/M transition and is inhibited by DNA damage. *Cell Cycle* 4, 1233–1238. <https://doi.org/10.4161/cc.4.9.1964>
- Chau, K.F., Shannon, M.L., Fame, R.M., Fonseca, E., Mullan, H., Johnson, M.B., Sendamarai, A.K., Springel, M.W., Laurent, B., Lehtinen, M.K., 2018. Downregulation of ribosome biogenesis during early forebrain development. *Elife* 7, e36998. <https://doi.org/10.7554/eLife.36998>
- Chen, C., Liu, Yu, Liu, Yang, Zheng, P., 2009. mTOR Regulation and Therapeutic Rejuvenation of Aging Hematopoietic Stem Cells. *Sci Signal* 2, ra75. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000559>

- Chen, R., Yang, Q., Lu, B., Yi, W., Cantin, G., Chen, Y., Fearn, C., Yates, J.R., Lee, J.-D., 2009. CDC25B mediates rapamycin-induced oncogenic responses in cancer cells. *Cancer Res* 69, 2663–2668. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3222>
- Chenn, A., Walsh, C.A., 2002. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science* 297, 365–369. <https://doi.org/10.1126/science.1074192>
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H., Beachy, P.A., 1996. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383, 407–413. <https://doi.org/10.1038/383407a0>
- Clemm von Hohenberg, K., Müller, S., Schleich, S., Meister, M., Bohlen, J., Hofmann, T.G., Teleman, A.A., 2022. Cyclin B/CDK1 and Cyclin A/CDK2 phosphorylate DENR to promote mitotic protein translation and faithful cell division. *Nat Commun* 13, 668. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28265-0>
- Cloëtta, D., Thomanetz, V., Baranek, C., Lustenberger, R.M., Lin, S., Oliveri, F., Atanasoski, S., Rüegg, M.A., 2013. Inactivation of mTORC1 in the developing brain causes microcephaly and affects gliogenesis. *J Neurosci* 33, 7799–7810. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3294-12.2013>
- Colis, L., Peltonen, K., Sirajuddin, P., Liu, H., Sanders, S., Ernst, G., Barrow, J.C., Laiho, M., 2014. DNA intercalator BMH-21 inhibits RNA polymerase I independent of DNA damage response. *Oncotarget* 5, 4361–4369.
- Cooper, J.A., 2008. A mechanism for inside-out lamination in the neocortex. *Trends Neurosci* 31, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.12.003>
- Coronado, D., Godet, M., Bourillot, P.-Y., Tapponnier, Y., Bernat, A., Petit, M., Afanassieff, M., Markossian, S., Malashicheva, A., Iacone, R., Anastasiadis, K., Savatier, P., 2013. A short G1 phase is an intrinsic determinant of naïve embryonic stem cell pluripotency. *Stem Cell Research* 10, 118–131. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2012.10.004>
- Das, R.M., Storey, K.G., 2012. Mitotic spindle orientation can direct cell fate and bias Notch activity in chick neural tube. *EMBO reports* 13, 448–454. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.42>
- Dasen, J.S., Jessell, T.M., 2009. Hox networks and the origins of motor neuron diversity. *Curr Top Dev Biol* 88, 169–200. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(09\)88006-X](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(09)88006-X)
- Del Corral, R.D., 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. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00565-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00565-8)
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.026>
- Dessaud, E., McMahon, A.P., Briscoe, J., 2008. Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development* 135, 2489–2503. <https://doi.org/10.1242/dev.009324>
- Dewey, E., Taylor, D., Johnston, C., 2015. Cell Fate Decision Making through Oriented Cell Division. *JDB* 3, 129–157. <https://doi.org/10.3390/jdb3040129>
- di Pietro, F., Echard, A., Morin, X., 2016. Regulation of mitotic spindle orientation: an integrated view. *EMBO Rep* 17, 1106–1130. <https://doi.org/10.15252/embr.201642292>
- Dickinson, M.E., Krumlauf, R., McMahon, A.P., 1994. Evidence for a mitogenic effect of Wnt-1 in the developing mammalian central nervous system. *Development* 120, 1453–1471. <https://doi.org/10.1242/dev.120.6.1453>
- Diez del Corral, R., Morales, A.V., 2017. The Multiple Roles of FGF Signaling in the Developing Spinal Cord. *Front Cell Dev Biol* 5, 58. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00058>
- Diez del Corral, R., Storey, K.G., 2004. Opposing FGF and retinoid pathways: a signalling switch that controls differentiation and patterning onset in the extending vertebrate body axis. *Bioessays* 26, 857–869. <https://doi.org/10.1002/bies.20080>

- Dimova, D.K., Stevaux, O., Frolov, M.V., Dyson, N.J., 2003. Cell cycle-dependent and cell cycle-independent control of transcription by the *Drosophila* E2F/RB pathway. *Genes Dev.* 17, 2308–2320. <https://doi.org/10.1101/gad.1116703>
- Dinman, J.D., 2016. Pathways to specialized ribosomes: The Brussels Lecture. *J Mol Biol* 428, 2186–2194. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.12.021>
- Dupé, V., Dubourg, C., Tayrac, M. de, David, V., 2017. Du cyclope à la réalité - Un nouveau regard sur la génétique de l'holoprosencéphalie. *Med Sci (Paris)* 33, 924–926. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173311003>
- Easley, C.A., Ben-Yehudah, A., Redinger, C.J., Oliver, S.L., Varum, S.T., Eisinger, V.M., Carlisle, D.L., Donovan, P.J., Schatten, G.P., 2010. mTOR-Mediated Activation of p70 S6K Induces Differentiation of Pluripotent Human Embryonic Stem Cells. *Cell Reprogram* 12, 263–273. <https://doi.org/10.1089/cell.2010.0011>
- Elbæk, C.R., Petrosius, V., Benada, J., Erichsen, L., Damgaard, R.B., Sørensen, C.S., 2022. WEE1 kinase protects the stability of stalled DNA replication forks by limiting CDK2 activity. *Cell Reports* 38, 110261. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110261>
- Engeland, K., 2022. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ* 29, 946–960. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00988-z>
- Englund, C., Fink, A., Lau, C., Pham, D., Daza, R.A.M., Bulfone, A., Kowalczyk, T., 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* 25, 247–251. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2899-04.2005>
- Ericson, J., Rashbass, P., Schedl, 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. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80323-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80323-2)
- Ferguson, A.M., White, L.S., Donovan, P.J., Piwnica-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. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.7.2853-2860.2005>
- Ferreira, R., Schneekloth, J.S., Panov, K.I., Hannan, K.M., Hannan, R.D., 2020. Targeting the RNA Polymerase I Transcription for Cancer Therapy Comes of Age. *Cells* 9, 266. <https://doi.org/10.3390/cells9020266>
- Filipczyk, A.A., Laslett, A.L., Mummery, C., Pera, M.F., 2007. Differentiation is coupled to changes in the cell cycle regulatory apparatus of human embryonic stem cells. *Stem Cell Research* 1, 45–60. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2007.09.002>
- Florio, M., Huttner, W.B., 2014. Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. *Development* 141, 2182–2194. <https://doi.org/10.1242/dev.090571>
- Fluckiger, A.-C., Marcy, G., Marchand, M., Nègre, D., Cosset, F.-L., Mitalipov, S., Wolf, D., Savatier, P., Dehay, C., 2006. Cell cycle features of primate embryonic stem cells. *Stem Cells* 24, 547–556. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0194>
- Fonseca, B.D., Zakaria, C., Jia, J.-J., Graber, T.E., Svitkin, Y., Tahmasebi, S., Healy, D., Hoang, H.-D., Jensen, J.M., Diao, I.T., Lussier, A., Dajadian, C., Padmanabhan, N., Wang, W., Matta-Camacho, E., Hearnden, J., Smith, E.M., Tsukumo, Y., Yanagiya, A., Morita, M., Petroulakis, E., González, J.L., Hernández, G., Alain, T., Damgaard, C.K., 2015. La-related Protein 1 (LARP1) Represses Terminal Oligopyrimidine (TOP) mRNA Translation Downstream of mTOR Complex 1 (mTORC1). *J Biol Chem* 290, 15996–16020. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.621730>
- Fousse, J., Gautier, E., Patti, D., Dehay, C., 2019. Developmental changes in interkinetic nuclear migration dynamics with respect to cell-cycle progression in the mouse cerebral cortex ventricular zone. *J Comp Neurol* 527, 1545–1557. <https://doi.org/10.1002/cne.24641>
- Frade, J.M., 2002. Interkinetic nuclear movement in the vertebrate neuroepithelium: encounters with an old acquaintance. *Prog Brain Res* 136, 67–71. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(02\)36007-2](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(02)36007-2)
- Franco, S.J., Müller, U., 2013. Shaping our minds: stem and progenitor cell diversity in the mammalian neocortex. *Neuron* 77, 19–34. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.022>
- Friend, K., Brooks, H.A., Propson, N.E., Thomson, J.A., Kimble, J., 2015. Embryonic Stem Cell Growth Factors Regulate eIF2 α Phosphorylation. *PLOS ONE* 10, e0139076. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139076>

- Fuccillo, M., Joyner, A.L., Fishell, G., 2006. Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci* 7, 772–783. <https://doi.org/10.1038/nrn1990>
- Fujii, K., Shi, Z., Zhulyn, O., Denans, N., Barna, M., 2017. Pervasive translational regulation of the cell signalling circuitry underlies mammalian development. *Nat Commun* 8, 14443. <https://doi.org/10.1038/ncomms14443>
- Fujii-Yamamoto, H., Kim, J.M., Arai, K., Masai, H., 2005. Cell cycle and developmental regulations of replication factors in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem* 280, 12976–12987. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412224200>
- Furuta, Y., Piston, D.W., Hogan, B.L., 1997. Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulators of dorsal forebrain development. *Development* 124, 2203–2212. <https://doi.org/10.1242/dev.124.11.2203>
- Gabrielli, B.G., De Souza, C.P., Tonks, I.D., Clark, J.M., Hayward, N.K., Ellem, K.A., 1996. Cytoplasmic accumulation of cdc25B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells. *J Cell Sci* 109 (Pt 5), 1081–1093. <https://doi.org/10.1242/jcs.109.5.1081>
- Gabut, M., Bourdelais, F., Durand, S., 2020. Ribosome and Translational Control in Stem Cells. *Cells* 9, 497. <https://doi.org/10.3390/cells9020497>
- Gan, Q., Lee, A., Suzuki, R., Yamagami, T., Stokes, A., Nguyen, B.C., Pleasure, D., Wang, J., Chen, H.-W., Zhou, C.J., 2014. Pax6 mediates β -catenin signaling for self-renewal and neurogenesis by neocortical radial glial stem cells. *Stem Cells* 32, 45–58. <https://doi.org/10.1002/stem.1561>
- Gantner, C.W., Hunt, C.P.J., Niclis, J.C., Penna, V., McDougall, S.J., Thompson, L.H., Parish, C.L., 2021. FGF-MAPK signaling regulates human deep-layer corticogenesis. *Stem Cell Reports* 16, 1262–1275. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.03.014>
- Garner-Hamrick, P.A., Fisher, C., 1998. Antisense phosphorothioate oligonucleotides specifically down-regulate cdc25B causing S-phase delay and persistent antiproliferative effects. *Int J Cancer* 76, 720–728. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19980529\)76:5<720::aid-ijc18>3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19980529)76:5<720::aid-ijc18>3.0.co;2-7)
- Genuth, N.R., Barna, M., 2022. Ribosome specialization in glioblastoma. *Nat Cell Biol* 24, 1451–1453. <https://doi.org/10.1038/s41556-022-01000-z>
- Genuth, N.R., Barna, M., 2018. The discovery of ribosome heterogeneity and its implications for gene regulation and organismal life. *Mol Cell* 71, 364–374. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.07.018>
- Gingras, A.C., Gygi, S.P., Raught, B., Polakiewicz, R.D., Abraham, R.T., Hoekstra, M.F., Aebersold, R., Sonenberg, N., 1999. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev* 13, 1422–1437. <https://doi.org/10.1101/gad.13.11.1422>
- 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., Liou, Y.-C., Bard, F., Ng, H.-H., 2015. Deterministic Restriction on Pluripotent State Dissolution by Cell-Cycle Pathways. *Cell* 162, 564–579. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.001>
- Gonzalez, C., 2007. Spindle orientation, asymmetric division and tumour suppression in *Drosophila* stem cells. *Nat Rev Genet* 8, 462–472. <https://doi.org/10.1038/nrg2103>
- Göritz, C., Frisé, J., 2012. Neural Stem Cells and Neurogenesis in the Adult. *Cell Stem Cell* 10, 657–659. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.04.005>
- Götz, M., Huttner, W.B., 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrm1739>
- Govindan, S., Jabaudon, D., 2017. Coupling progenitor and neuronal diversity in the developing neocortex. *FEBS Lett* 591, 3960–3977. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12846>
- Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P., Pevny, L., 2003. SOX2 Functions to Maintain Neural Progenitor Identity. *Neuron* 39, 749–765. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00497-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00497-5)
- Granneman, S., Gallagher, J.E.G., Vogelzangs, J., Horstman, W., van Venrooij, W.J., Baserga, S.J., Pruijn, G.J.M., 2003. The human Imp3 and Imp4 proteins form a ternary complex with hMpp10, which only interacts with the U3 snoRNA in 60-80S ribonucleoprotein complexes. *Nucleic Acids Res* 31, 1877–1887. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg300>

- Gruber, R., Zhou, Z., Sukchev, M., Joerss, T., Frappart, P.-O., Wang, Z.-Q., 2011. MCPH1 regulates the neuroprogenitor division mode by coupling the centrosomal cycle with mitotic entry through the Chk1–Cdc25 pathway. *Nat Cell Biol* 13, 1325–1334. <https://doi.org/10.1038/ncb2342>
- Gui, H., Li, S., Matisse, M.P., 2007. A cell-autonomous requirement for Cip/Kip cyclin-kinase inhibitors in regulating neuronal cell cycle exit but not differentiation in the developing spinal cord. *Developmental Biology* 301, 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.10.035>
- Guillemot, F., 2007. Cell fate specification in the mammalian telencephalon. *Progress in Neurobiology, Radial Glia and Neural Specification* 83, 37–52. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.02.009>
- Guzzi, N., Cieřła, M., Ngoc, P.C.T., Lang, S., Arora, S., Dimitriou, M., Pimková, K., Sommarin, M.N.E., Munita, R., Lubas, M., Lim, Y., Okuyama, K., Soneji, S., Karlsson, G., Hansson, J., Jönsson, G., Lund, A.H., Sigvardsson, M., Hellström-Lindberg, E., Hsieh, A.C., Bellodi, C., 2018. Pseudouridylation of tRNA-Derived Fragments Steers Translational Control in Stem Cells. *Cell* 173, 1204–1216.e26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.008>
- Hagey, D.W., Topcic, D., Kee, N., Reynaud, F., Bergsland, M., Perlmann, T., Muhr, J., 2020. CYCLIN-B1/2 and -D1 act in opposition to coordinate cortical progenitor self-renewal and lineage commitment. *Nat Commun* 11, 2898. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16597-8>
- Hamburger, V., Hamilton, H.L., 1992. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental Dynamics* 195, 231–272. <https://doi.org/10.1002/aja.1001950404>
- Hämmerle, B., Ulin, E., Guimera, J., Becker, W., Guillemot, F., Tejedor, F.J., 2011. Transient expression of Mnb/Dyrk1a couples cell cycle exit and differentiation of neuronal precursors by inducing p27KIP1 expression and suppressing NOTCH signaling. *Development* 138, 2543–2554. <https://doi.org/10.1242/dev.066167>
- Handler, M., Yang, X., Shen, J., 2000. Presenilin-1 regulates neuronal differentiation during neurogenesis. *Development* 127, 2593–2606. <https://doi.org/10.1242/dev.127.12.2593>
- Haneke, K., Schott, J., Lindner, D., Hollensen, A.K., Damgaard, C.K., Mongis, C., Knop, M., Palm, W., Ruggieri, A., Stoecklin, G., 2020. CDK1 couples proliferation with protein synthesis. *J Cell Biol* 219, e201906147. <https://doi.org/10.1083/jcb.201906147>
- Hannan, K.M., Soo, P., Wong, M.S., Lee, J.K., Hein, N., Poh, P., Wysoke, K.D., Williams, T.D., Montellese, C., Smith, L.K., Al-Obaidi, S.J., Núñez-Villacís, L., Pavy, M., He, J.-S., Parsons, K.M., Loring, K.E., Morrison, T., Diesch, J., Burgio, G., Ferreira, R., Feng, Z.-P., Gould, C.M., Madhamshettiwar, P.B., Flygare, J., Gonda, T.J., Simpson, K.J., Kutay, U., Pearson, R.B., Engel, C., Watkins, N.J., Hannan, R.D., George, A.J., 2022. Nuclear stabilization of p53 requires a functional nucleolar surveillance pathway. *Cell Reports* 41, 111571. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111571>
- Hara, K., Yonezawa, K., Kozłowski, M.T., Sugimoto, T., Andrabi, K., Weng, Q.P., Kasuga, M., Nishimoto, I., Avruch, J., 1997. Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *J Biol Chem* 272, 26457–26463. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.42.26457>
- Harashima, H., Dissmeyer, N., Schnittger, A., 2013. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends in Cell Biology* 23, 345–356. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.03.002>
- Hardwick, L.J.A., Ali, F.R., Azzarelli, R., Philpott, A., 2015. Cell cycle regulation of proliferation versus differentiation in the central nervous system. *Cell Tissue Res* 359, 187–200. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1895-8>
- Harnett, D., Ambrozkiwicz, M.C., Zinnall, U., Rusanova, A., Borisova, E., Drescher, A.N., Couce-Iglesias, M., Villamil, G., Dannenberg, R., Imami, K., Münster-Wandowski, A., Fauler, B., Mielke, T., Selbach, M., Landthaler, M., Spahn, C.M.T., Tarabykin, V., Ohler, U., Kraushar, M.L., 2022. A critical period of translational control during brain development at codon resolution. *Nat Struct Mol Biol* 29, 1277–1290. <https://doi.org/10.1038/s41594-022-00882-9>
- Hartman, N.W., Lin, T.V., Zhang, L., Paquelet, G.E., Feliciano, D.M., Bordey, A., 2013. mTORC1 targets the translational repressor 4E-BP2, but not S6 kinase 1/2, to regulate neural stem cell self-renewal in vivo. *Cell Rep* 5, 433–444. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.09.017>

- Hasenpusch-Theil, K., West, S., Kelman, A., Kozic, Z., Horrocks, S., McMahon, A.P., Price, D.J., Mason, J.O., Theil, T., 2018. Gli3 controls the onset of cortical neurogenesis by regulating the radial glial cell cycle through Cdk6 expression. *Development* 145, dev163147. <https://doi.org/10.1242/dev.163147>
- Hatakeyama, J., Bessho, Y., Katoh, K., Ookawara, S., Fujioka, M., Guillemot, F., Kageyama, R., 2004. Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development* 131, 5539–5550. <https://doi.org/10.1242/dev.01436>
- Hatakeyama, J., Wakamatsu, Y., Nagafuchi, A., Kageyama, R., Shigemoto, R., Shimamura, K., 2014. Cadherin-based adhesions in the apical endfoot are required for active Notch signaling to control neurogenesis in vertebrates. *Development* 141, 1671–1682. <https://doi.org/10.1242/dev.102988>
- He, J., Kang, L., Wu, T., Zhang, J., Wang, H., Gao, H., Zhang, Y., Huang, B., Liu, W., Kou, Z., Zhang, H., Gao, S., 2012. An elaborate regulation of Mammalian target of rapamycin activity is required for somatic cell reprogramming induced by defined transcription factors. *Stem Cells Dev* 21, 2630–2641. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0015>
- He, N., Li, C., Zhang, X., Sheng, T., Chi, S., Chen, K., Wang, Q., Vertrees, R., Logrono, R., Xie, J., 2005. Regulation of lung cancer cell growth and invasiveness by beta-TRCP. *Mol Carcinog* 42, 18–28. <https://doi.org/10.1002/mc.20063>
- Heix, J., Vente, A., Voit, R., Budde, A., Michaelidis, T.M., Grummt, I., 1998. Mitotic silencing of human rRNA synthesis: inactivation of the promoter selectivity factor SL1 by cdc2/cyclin B-mediated phosphorylation. *EMBO J* 17, 7373–7381. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7373>
- Helms, A.W., Johnson, J.E., 2003. Specification of dorsal spinal cord interneurons. *Curr Opin Neurobiol* 13, 42–49. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(03\)00010-2](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(03)00010-2)
- Hengst, L., Reed, S.I., 1998. Inhibitors of the Cip/Kip Family. *Cyclin Dependent Kinase (CDK) Inhibitors* 25–41. https://doi.org/10.1007/978-3-642-71941-7_2
- Hershey, J.W.B., Sonenberg, N., Mathews, M.B., 2012. Principles of Translational Control: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a011528. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011528>
- Hetman, M., Slomnicki, L.P., 2019. Ribosomal biogenesis as an emerging target of neurodevelopmental pathologies. *Journal of Neurochemistry* 148, 325–347. <https://doi.org/10.1111/jnc.14576>
- Hirabayashi, Y., Itoh, Y., Tabata, H., Nakajima, K., Akiyama, T., Masuyama, N., Gotoh, Y., 2004. The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development* 131, 2791–2801. <https://doi.org/10.1242/dev.01165>
- Ho, J.S.L., Ma, W., Mao, D.Y.L., Benchimol, S., 2005. p53-Dependent transcriptional repression of c-myc is required for G1 cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* 25, 7423–7431. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.17.7423-7431.2005>
- Hodge, R.D., Kowalczyk, T.D., Wolf, S.A., Encinas, J.M., Rippey, C., Enikolopov, G., Kempermann, G., Hevner, R.F., 2008. Intermediate Progenitors in Adult Hippocampal Neurogenesis: Tbr2 Expression and Coordinate Regulation of Neuronal Output. *J Neurosci* 28, 3707–3717. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4280-07.2008>
- Hoffmann, I., Draetta, G., Karsenti, E., 1994. Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. *EMBO J* 13, 4302–4310. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06750.x>
- Hong, S., Freeberg, M.A., Han, T., Kamath, A., Yao, Y., Fukuda, T., Suzuki, T., Kim, J.K., Inoki, K., 2017. LARP1 functions as a molecular switch for mTORC1-mediated translation of an essential class of mRNAs. *Elife* 6, e25237. <https://doi.org/10.7554/eLife.25237>
- Horton, L.E., Bushell, M., Barth-Baus, D., Tilleray, V.J., Clemens, M.J., Hensold, J.O., 2002. p53 activation results in rapid dephosphorylation of the eIF4E-binding protein 4E-BP1, inhibition of ribosomal protein S6 kinase and inhibition of translation initiation. *Oncogene* 21, 5325–5334. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205662>
- Hwang, S.-H., Somatilaka, B.N., White, K., Mukhopadhyay, S., 2021. Ciliary and extraciliary Gpr161 pools repress hedgehog signaling in a tissue-specific manner. *Elife* 10, e67121. <https://doi.org/10.7554/eLife.67121>

- Imami, K., Milek, M., Bogdanow, B., Yasuda, T., Kastelic, N., Zauber, H., Ishihama, Y., Landthaler, M., Selbach, M., 2018. Phosphorylation of the Ribosomal Protein RPL12/uL11 Affects Translation during Mitosis. *Mol Cell* 72, 84–98.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.019>
- Ingolia, N.T., Lareau, L.F., Weissman, J.S., 2011. Ribosome Profiling of Mouse Embryonic Stem Cells Reveals the Complexity and Dynamics of Mammalian Proteomes. *Cell* 147, 789–802. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.002>
- Izaki, T., Kamakura, S., Kohjima, M., Sumimoto, H., 2006. Two forms of human Inscuteable-related protein that links Par3 to the Pins homologues LGN and AGS3. *Biochem Biophys Res Commun* 341, 1001–1006. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.01.050>
- Jäkel, S., Dimou, L., 2017. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Front Cell Neurosci* 11, 24. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00024>
- Jarzebowski, L., Le Bouteiller, M., Coqueran, S., Raveux, A., Vandormael-Pournin, S., David, A., Cumano, A., Cohen-Tannoudji, M., 2018. Mouse adult hematopoietic stem cells actively synthesize ribosomal RNA. *RNA* 24, 1803–1812. <https://doi.org/10.1261/rna.067843.118>
- Jessell, T.M., Sanes, J.R., 2000. Development. The decade of the developing brain. *Curr Opin Neurobiol* 10, 599–611. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(00\)00136-7](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(00)00136-7)
- Kakizuka, A., Sebastian, B., Borgmeyer, U., Hermans-Borgmeyer, I., Bolado, J., Hunter, T., Hoekstra, M.F., Evans, R.M., 1992. A mouse cdc25 homolog is differentially and developmentally expressed. *Genes Dev* 6, 578–590. <https://doi.org/10.1101/gad.6.4.578>
- Kalani, M.Y.S., Cheshier, S.H., Cord, B.J., Bababegy, S.R., Vogel, H., Weissman, I.L., Palmer, T.D., Nusse, R., 2008. Wnt-mediated self-renewal of neural stem/progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 16970–16975. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808616105>
- Kalous, J., Jansová, D., Šušor, A., 2020. Role of Cyclin-Dependent Kinase 1 in Translational Regulation in the M-Phase. *Cells* 9, 1568. <https://doi.org/10.3390/cells9071568>
- Kanemori, Y., Uto, K., Sagata, N., 2005. β -TrCP recognizes a previously undescribed nonphosphorylated destruction motif in Cdc25A and Cdc25B phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6279–6284. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501873102>
- Kang, W., Wong, L.C., Shi, S.-H., Hébert, J.M., 2009. The transition from radial glial to intermediate progenitor cell is inhibited by FGF signaling during corticogenesis. *J Neurosci* 29, 14571–14580. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3844-09.2009>
- Kastenhuber, E.R., Lowe, S.W., 2017. Putting p53 in Context. *Cell* 170, 1062–1078. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.028>
- Kasteri, J., Das, D., Zhong, X., Persaud, L., Francis, A., Muharam, H., Sauane, M., 2018. Translation Control by p53. *Cancers (Basel)* 10, 133. <https://doi.org/10.3390/cancers10050133>
- Kearse, M.G., Chen, A.S., Ware, V.C., 2011. Expression of ribosomal protein L22e family members in *Drosophila melanogaster*: rpL22-like is differentially expressed and alternatively spliced. *Nucleic Acids Res* 39, 2701–2716. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1218>
- Keenan, I.D., Sharrard, R.M., Isaacs, H.V., 2006. FGF signal transduction and the regulation of Cdx gene expression. *Developmental Biology* 299, 478–488. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.040>
- Kicheva, A., Bollenbach, T., Ribeiro, A., Valle, H.P., Lovell-Badge, R., Episkopou, V., Briscoe, J., 2014. Coordination of progenitor specification and growth in mouse and chick spinal cord. *Science* 345, 1254927. <https://doi.org/10.1126/science.1254927>
- Kim, S., Nie, H., Nesin, V., Tran, U., Outeda, P., Bai, C.-X., Keeling, J., Maskey, D., Watnick, T., Wessely, O., Tsiokas, L., 2016. The polycystin complex mediates Wnt/Ca(2+) signalling. *Nat Cell Biol* 18, 752–764. <https://doi.org/10.1038/ncb3363>
- Kishi, M., Mizuseki, K., Sasai, N., Yamazaki, H., Shiota, K., Nakanishi, S., Sasai, Y., 2000. Requirement of Sox2-mediated signaling for differentiation of early *Xenopus* neuroectoderm. *Development* 127, 791–800. <https://doi.org/10.1242/dev.127.4.791>

- Koh, S.-B., 2022. The expanding role of WEE1. *Cellular Signalling* 94, 110310. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2022.110310>
- Komada, M., Saitsu, H., Kinboshi, M., Miura, T., Shiota, K., Ishibashi, M., 2008. Hedgehog signaling is involved in development of the neocortex. *Development* 135, 2717–2727. <https://doi.org/10.1242/dev.015891>
- Komili, S., Farny, N.G., Roth, F.P., Silver, P.A., 2007. Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. *Cell* 131, 557–571. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.037>
- Kondrashov, N., Pusic, A., Stumpf, C.R., Shimizu, K., Hsieh, A.C., Ishijima, J., Shiroishi, T., Barna, M., 2011. Ribosome mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell* 145, 383–397. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.028>
- Kongsuwan, K., Yu, Q., Vincent, A., Frisardi, M.C., Rosbash, M., Lengyel, J.A., Merriam, J., 1985. A Drosophila Minute gene encodes a ribosomal protein. *Nature* 317, 555–558. <https://doi.org/10.1038/317555a0>
- Konno, D., Shioi, G., Shitamukai, A., Mori, A., Kiyonari, H., Miyata, T., Matsuzaki, F., 2008. Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nat Cell Biol* 10, 93–101. <https://doi.org/10.1038/ncb1673>
- Körner, K., Jérôme, V., Schmidt, T., Müller, R., 2001. Cell Cycle Regulation of the Murine cdc25BPromoter: ESSENTIAL ROLE FOR NUCLEAR FACTOR-Y AND A PROXIMAL REPRESSOR ELEMENT *. *Journal of Biological Chemistry* 276, 9662–9669. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008696200>
- Kowalczyk, T., Pontious, A., Englund, C., Daza, R.A.M., Bedogni, F., Hodge, R., Attardo, A., Bell, C., Huttner, W.B., Hevner, R.F., 2009. Intermediate neuronal progenitors (basal progenitors) produce pyramidal-projection neurons for all layers of cerebral cortex. *Cereb Cortex* 19, 2439–2450. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhn260>
- Kuhn, A., Vente, A., Dorée, M., Grummt, I., 1998. Mitotic phosphorylation of the TBP-containing factor SL1 represses ribosomal gene transcription. *J Mol Biol* 284, 1–5. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2164>
- Kuwahara, A., Hirabayashi, Y., Knoepfler, P.S., Taketo, M.M., Sakai, J., Kodama, T., Gotoh, Y., 2010. Wnt signaling and its downstream target N-myc regulate basal progenitors in the developing neocortex. *Development* 137, 1035–1044. <https://doi.org/10.1242/dev.046417>
- 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. <https://doi.org/10.1128/MCB.06745-11>
- Lai, K., Kaspar, B.K., Gage, F.H., Schaffer, D.V., 2003. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci* 6, 21–27. <https://doi.org/10.1038/nn983>
- Lammer, C., Wagerer, S., Saffrich, R., Mertens, D., Ansorge, W., Hoffmann, I., 1998. The cdc25B phosphatase is essential for the G₂/M phase transition in human cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 16), 2445–2453. <https://doi.org/10.1242/jcs.111.16.2445>
- Lancaster, M.A., Renner, M., Martin, C.-A., Wenzel, D., Bicknell, L.S., Hurler, M.E., Homfray, T., Penninger, J.M., Jackson, A.P., Knoblich, J.A., 2013. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 501, 373–379. <https://doi.org/10.1038/nature12517>
- Lanctot, A.A., Guo, Y., Le, Y., Edens, B.M., Nowakowski, R.S., Feng, Y., 2017. Loss of Brap Results in Premature G₁/S Phase Transition and Impeded Neural Progenitor Differentiation. *Cell Rep* 20, 1148–1160. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.018>
- Lange, C., Huttner, W.B., Calegari, F., 2009. Cdk4/CyclinD1 Overexpression in Neural Stem Cells Shortens G₁, Delays Neurogenesis, and Promotes the Generation and Expansion of Basal Progenitors. *Cell Stem Cell* 5, 320–331. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.026>
- Le Dréau, G., 2022. BuMPing Into Neurogenesis: How the Canonical BMP Pathway Regulates Neural Stem Cell Divisions Throughout Space and Time. *Frontiers in Neuroscience* 15.
- Le Dréau, G., Saade, M., Gutiérrez-Vallejo, I., Martí, E., 2014. The strength of SMAD1/5 activity determines the mode of stem cell division in the developing spinal cord. *Journal of Cell Biology* 204, 591–605. <https://doi.org/10.1083/jcb.201307031>

- Lee, G., White, L.S., Hurov, K.E., Stappenbeck, T.S., 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900751106>
- Lee, K.J., Dietrich, P., Jessell, T.M., 2000. Genetic ablation reveals that the roof plate is essential for dorsal interneuron specification. *Nature* 403, 734–740. <https://doi.org/10.1038/35001507>
- Lee, S.-K., Lee, B., Ruiz, E.C., Pfaff, S.L., 2005. Olig2 and Ngn2 function in opposition to modulate gene expression in motor neuron progenitor cells. *Genes Dev.* 19, 282–294. <https://doi.org/10.1101/gad.1257105>
- Lee, S.-K., Pfaff, S.L., 2003. Synchronization of Neurogenesis and Motor Neuron Specification by Direct Coupling of bHLH and Homeodomain Transcription Factors. *Neuron* 38, 731–745. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00296-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00296-4)
- Lesage, B., Gutierrez, I., Martí, E., Gonzalez, C., 2010. Neural stem cells: the need for a proper orientation. *Current Opinion in Genetics & Development, Developmental mechanisms, patterning and evolution* 20, 438–442. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2010.04.013>
- Leung, B., Shimeld, S.M., 2019. Evolution of vertebrate spinal cord patterning. *Dev Dyn* 248, 1028–1043. <https://doi.org/10.1002/dvdy.77>
- Li, H., Collado, M., Villasante, A., Matheu, A., Lynch, C.J., Cañamero, M., Rizzoti, K., Carneiro, C., Martínez, G., Vidal, A., Lovell-Badge, R., Serrano, M., 2012. p27(Kip1) directly represses Sox2 during embryonic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell* 11, 845–852. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.09.014>
- Li, H., Huo, Y., He, X., Yao, L., Zhang, H., Cui, Y., Xiao, H., Xie, W., Zhang, D., Wang, Y., Zhang, S., Tu, H., Cheng, Y., Guo, Y., Cao, X., Zhu, Y., Jiang, T., Guo, X., Qin, Y., Sha, J., 2022. A male germ-cell-specific ribosome controls male fertility. *Nature* 612, 725–731. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05508-0>
- Li, L., Bhatia, R., 2011. Stem Cell Quiescence. *Clinical Cancer Research* 17, 4936–4941. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1499>
- Li, Q., Lozano, G., 2013. Molecular Pathways: Targeting Mdm2 and Mdm4 in Cancer Therapy. *Clin Cancer Res* 19, 34–41. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0053>
- Li, W., Cogswell, C.A., LoTurco, J.J., 1998. Neuronal Differentiation of Precursors in the Neocortical Ventricular Zone Is Triggered by BMP. *J. Neurosci.* 18, 8853–8862. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-21-08853.1998>
- Lim, S., Kaldis, P., 2012. Loss of Cdk2 and Cdk4 induces a switch from proliferation to differentiation in neural stem cells. *Stem Cells* 30, 1509–1520. <https://doi.org/10.1002/stem.1114>
- Lincoln, A.J., Wickramasinghe, D., Stein, P., Schultz, R.M., Palko, M.E., De Miguel, M.P., Tessarollo, L., Donovan, P.J., 2002. Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nat Genet* 30, 446–449. <https://doi.org/10.1038/ng856>
- Litingtung, Y., Chiang, C., 2000. Control of Shh activity and signaling in the neural tube. *Developmental Dynamics* 219, 143–154. [https://doi.org/10.1002/1097-0177\(2000\)9999:9999<::AID-DVDY1050>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1097-0177(2000)9999:9999<::AID-DVDY1050>3.0.CO;2-Q)
- Liu, A., Niswander, L.A., 2005. Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat Rev Neurosci* 6, 945–954. <https://doi.org/10.1038/nrn1805>
- Liu, F., Yang, X., Geng, M., Huang, M., 2018. Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B, SI: Targeted Cancer Therapy* 8, 552–562. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.01.008>
- Liu, J.P., Laufer, E., Jessell, T.M., 2001. Assigning the positional identity of spinal motor neurons: rostrocaudal patterning of Hox-c expression by FGFs, Gdf11, and retinoids. *Neuron* 32, 997–1012. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00544-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00544-x)
- Liu, L., Michowski, W., Inuzuka, H., Shimizu, K., Nihira, N.T., Chick, J.M., Li, N., Geng, Y., Meng, A.Y., Ordureau, A., Kołodziejczyk, A., Ligon, K.L., Bronson, R.T., Polyak, K., Harper, J.W., Gygi, S.P., Wei, W., Sicinski, P., 2017. G1 cyclins link proliferation, pluripotency and differentiation of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 19, 177–188. <https://doi.org/10.1038/ncb3474>
- Liu, L., Michowski, W., Kołodziejczyk, A., Sicinski, P., 2019. The cell cycle in stem cell proliferation, pluripotency and differentiation. *Nat Cell Biol* 21, 1060–1067. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0384-4>

- Liu, Y., Beyer, A., Aebersold, R., 2016. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell* 165, 535–550. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.014>
- Liu, Y., Shen, X., Zhang, Y., Zheng, X., Cepeda, C., Wang, Y., Duan, S., Tong, X., 2023. Interactions of glial cells with neuronal synapses, from astrocytes to microglia and oligodendrocyte lineage cells. *Glia* 71, 1383–1401. <https://doi.org/10.1002/glia.24343>
- Liu, Y., Xu, W., Xu, X., Tan, Z., Xu, J., Ma, L., Du, P., Yang, Y., 2021. Loss of BRMS2 induces cell growth inhibition and translation capacity reduction in colorectal cancer cells. *Am J Cancer Res* 11, 930–944.
- Llorens-Bobadilla, E., Zhao, S., Baser, A., Saiz-Castro, G., Zwadlo, K., Martin-Villalba, A., 2015. Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury. *Cell Stem Cell* 17, 329–340. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.002>
- Lobjois, V., Bel-Vialar, S., Trousse, F., 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 Development* 3, 4. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-3-4>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.05.031>
- Locati, M.D., Pagano, J.F.B., Girard, G., Ensink, W.A., van Olst, M., van Leeuwen, S., Nehrdich, U., Spink, H.P., Rauwerda, H., Jonker, M.J., Dekker, R.J., Breit, T.M., 2017. Expression of distinct maternal and somatic 5.8S, 18S, and 28S rRNA types during zebrafish development. *RNA* 23, 1188–1199. <https://doi.org/10.1261/rna.061515.117>
- Locker, M., Agathocleous, M., Amato, M.A., Parain, K., Harris, W.A., Perron, M., 2006. Hedgehog signaling and the retina: insights into the mechanisms controlling the proliferative properties of neural precursors. *Genes Dev* 20, 3036–3048. <https://doi.org/10.1101/gad.391106>
- Locker, M., Perron, M., 2019. In Vivo Assessment of Neural Precursor Cell Cycle Kinetics in the Amphibian Retina. *Cold Spring Harb Protoc* 2019. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot105536>
- Lockhead, S., Moskaleva, A., Kamenz, J., Chen, Y., Kang, M., Reddy, A.R., Santos, S.D.M., Ferrell, J.E., 2020. The Apparent Requirement for Protein Synthesis during G2 Phase Is due to Checkpoint Activation. *Cell Rep* 32, 107901. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107901>
- Lu, Q.R., Yuk, D., Alberta, J.A., Zhu, Z., Pawlitzky, I., Chan, J., McMahon, A.P., Stiles, C.D., Rowitch, D.H., 2000. Sonic Hedgehog–Regulated Oligodendrocyte Lineage Genes Encoding bHLH Proteins in the Mammalian Central Nervous System. *Neuron* 25, 317–329. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80897-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80897-1)
- Lu, R., Markowitz, F., Unwin, R.D., Leek, J.T., Airoidi, E.M., MacArthur, B.D., Lachmann, A., Rozov, R., Ma'ayan, A., Boyer, L.A., Troyanskaya, O.G., Whetton, A.D., Lemischka, I.R., 2009. Systems-level dynamic analyses of fate change in murine embryonic stem cells. *Nature* 462, 358–362. <https://doi.org/10.1038/nature08575>
- Lucà, R., Assenza, M.R., Maiullari, F., Pieroni, L., Maiullari, S., Federici, G., Marini, F., Rizzi, R., Urbani, A., Soddu, S., Moretti, F., 2021. Inhibition of the mTOR pathway and reprogramming of protein synthesis by MDM4 reduce ovarian cancer metastatic properties. *Cell Death Dis* 12, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03828-z>
- Lui, J.H., Hansen, D.V., Kriegstein, A.R., 2011. Development and evolution of the human neocortex. *Cell* 146, 18–36. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.030>
- Lukaszewicz, A.I., 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106230108>
- Ma, X.M., Blenis, J., 2009. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 307–318. <https://doi.org/10.1038/nrm2672>
- Machon, O., Backman, M., Machonova, O., Kozmik, Z., Vacik, T., Andersen, L., Krauss, S., 2007. A dynamic gradient of Wnt signaling controls initiation of neurogenesis in the mammalian cortex and cellular specification in the hippocampus. *Dev Biol* 311, 223–237. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.08.038>

- Maekawa, M., Takashima, N., Arai, Y., Nomura, T., Inokuchi, K., Yuasa, S., Osumi, N., 2005. Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis. *Genes Cells* 10, 1001–1014. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2005.00893.x>
- Magri, L., Cambiaghi, M., Cominelli, M., Alfaro-Cervello, C., Cursi, M., Pala, M., Bulfone, A., Garcia-Verdugo, J.M., Leocani, L., Minicucci, F., Poliani, P.L., Galli, R., 2011. Sustained activation of mTOR pathway in embryonic neural stem cells leads to development of tuberous sclerosis complex-associated lesions. *Cell Stem Cell* 9, 447–462. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.09.008>
- Mailand, N., Lukas, C., Kaiser, B.K., Jackson, P.K., Bartek, J., Lukas, J., 2002. Deregulated human Cdc14A phosphatase disrupts centrosome separation and chromosome segregation. *Nat Cell Biol* 4, 317–322. <https://doi.org/10.1038/ncb777>
- Mairet-Coello, G., Tury, A., Van Buskirk, E., Robinson, K., Genestine, M., DiCicco-Bloom, E., 2012. p57KIP2 regulates radial glia and intermediate precursor cell cycle dynamics and lower layer neurogenesis in developing cerebral cortex. *Development* 139, 475–487. <https://doi.org/10.1242/dev.067314>
- Mancini, F., Teveroni, E., Di Conza, G., Monteleone, V., Arisi, I., Pellegrino, M., Buttarelli, M., Pieroni, L., D’Onofrio, M., Urbani, A., Pontecorvi, A., Mazzone, M., Moretti, F., 2017. MDM4 actively restrains cytoplasmic mTORC1 by sensing nutrient availability. *Molecular Cancer* 16, 55. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0626-7>
- Manuel, M.N., Mi, D., Mason, J.O., Price, D.J., 2015. Regulation of cerebral cortical neurogenesis by the Pax6 transcription factor. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9.
- Manzari-Tavakoli, A., Babajani, A., Farjoo, M.H., Hajinasrollah, M., Bahrami, S., Niknejad, H., 2022. The Cross-Talks Among Bone Morphogenetic Protein (BMP) Signaling and Other Prominent Pathways Involved in Neural Differentiation. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 15.
- Martynoga, B., Morrison, H., Price, D.J., 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. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.04.005>
- Marygold, S.J., Roote, J., Reuter, G., Lambertsson, A., Ashburner, M., Millburn, G.H., Harrison, P.M., Yu, Z., Kenmochi, N., Kaufman, T.C., Leever, S.J., Cook, K.R., 2007. The ribosomal protein genes and Minute loci of *Drosophila melanogaster*. *Genome Biol* 8, R216. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-10-r216>
- Matsumoto, C.S., Almeida, L.O., Guimarães, D.M., Martins, M.D., Papagerakis, P., Papagerakis, S., Leopoldino, A.M., Castilho, R.M., Squarize, C.H., 2016. PI3K-PTEN dysregulation leads to mTOR-driven upregulation of the core clock gene BMAL1 in normal and malignant epithelial cells. *Oncotarget* 7, 42393–42407. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9877>
- Mauro, V.P., Edelman, G.M., 2002. The ribosome filter hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12031–12036. <https://doi.org/10.1073/pnas.192442499>
- Mauro, V.P., Matsuda, D., 2015. Translation regulation by ribosomes: Increased complexity and expanded scope. *RNA Biol* 13, 748–755. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1107701>
- Medina, L., Abellán, A., 2009. Development and evolution of the pallium. *Seminars in Cell & Developmental Biology, Regenerative Biology and Medicine: II and Patterning and Evolving the Vertebrate Forebrain* 20, 698–711. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.04.008>
- Ménendez, S., Goh, A.M., Camus, S., Ng, K.W., Kua, N., Badal, V., Lane, D.P., 2011. MDM4 downregulates p53 transcriptional activity and response to stress during differentiation. *Cell Cycle* 10, 1100–1108. <https://doi.org/10.4161/cc.10.7.15090>
- Mihalas, A.B., Elsen, G.E., Bedogni, F., Daza, R.A.M., Ramos-Laguna, K.A., Arnold, S.J., 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. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.072>
- Mihalas, A.B., Hevner, R.F., 2018. Clonal analysis reveals laminar fate multipotency and daughter cell apoptosis of mouse cortical intermediate progenitors. *Development* 145, dev164335. <https://doi.org/10.1242/dev.164335>

- Miller, S.C., MacDonald, C.C., Kellogg, M.K., Karamysheva, Z.N., Karamyshev, A.L., 2023. Specialized Ribosomes in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 24, 6334. <https://doi.org/10.3390/ijms24076334>
- Millonig, J.H., Millen, K.J., Hatten, M.E., 2000. The mouse Dreher gene *Lmx1a* controls formation of the roof plate in the vertebrate CNS. *Nature* 403, 764–769. <https://doi.org/10.1038/35001573>
- Mills, E.W., Green, R., 2017. Ribosomopathies: There's strength in numbers. *Science* 358, eaan2755. <https://doi.org/10.1126/science.aan2755>
- Min, M., Rong, Y., Tian, C., Spencer, S.L., 2020. Temporal integration of mitogen history in mother cells controls proliferation of daughter cells. *Science* 368, 1261–1265. <https://doi.org/10.1126/science.aay8241>
- Miyata, T., Okamoto, M., Shinoda, T., Kawaguchi, A., 2015. Interkinetic nuclear migration generates and opposes ventricular-zone crowding: insight into tissue mechanics. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8.
- Mizuguchi, R., Sugimori, M., Takebayashi, H., Kosako, H., Nagao, M., Yoshida, S., Nabeshima, Y., Shimamura, K., Nakafuku, M., 2001. Combinatorial Roles of *Olig2* and *Neurogenin2* in the Coordinated Induction of Pan-Neuronal and Subtype-Specific Properties of Motoneurons. *Neuron* 31, 757–771. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00413-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00413-5)
- Molina, A., Bonnet, F., Pignolet, J., Lobjois, V., Bel-Vialar, S., Gautrais, J., Pituello, F., Agius, E., 2022. Single-cell imaging of the cell cycle reveals CDC25B-induced heterogeneity of G1 phase length in neural progenitor cells. *Development* 149, dev199660. <https://doi.org/10.1242/dev.199660>
- Molina, A., Pituello, F., 2017. Playing with the cell cycle to build the spinal cord. *Developmental Biology* 432, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.12.022>
- Morin, X., Jaouen, F., Durbec, P., 2007. Control of planar divisions by the G-protein regulator LGN maintains progenitors in the chick neuroepithelium. *Nat Neurosci* 10, 1440–1448. <https://doi.org/10.1038/nn1984>
- Moser, J., Miller, I., Carter, D., Spencer, S.L., 2018. Control of the Restriction Point by Rb and p21. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E8219–E8227. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722446115>
- Munji, R.N., Choe, Y., Li, G., Siegenthaler, J.A., Pleasure, S.J., 2011. Wnt signaling regulates neuronal differentiation of cortical intermediate progenitors. *J Neurosci* 31, 1676–1687. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5404-10.2011>
- Murciano, A., Zamora, J., López-Sánchez, J., Frade, J.M., 2002. Interkinetic nuclear movement may provide spatial clues to the regulation of neurogenesis. *Mol Cell Neurosci* 21, 285–300. <https://doi.org/10.1006/mcne.2002.1174>
- Muroyama, Y., Fujihara, M., Ikeya, M., Kondoh, H., Takada, S., 2002. Wnt signaling plays an essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord. *Genes & Development* 16, 548. <https://doi.org/10.1101/gad.937102>
- Murray, A.W., 2004. Recycling the Cell Cycle: Cyclins Revisited. *Cell* 116, 221–234. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01080-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01080-8)
- Najas, S., Pijuan, I., Esteve-Codina, A., Usieto, S., Martínez, J.D., Zwijsen, A., Arbonés, M.L., Martí, E., Le Dréau, G., 2020. A SMAD1/5-YAP signalling module drives radial glia self-amplification and growth of the developing cerebral cortex. *Development* 147, dev187005. <https://doi.org/10.1242/dev.187005>
- Narla, A., Ebert, B.L., 2010. Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood* 115, 3196–3205. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-178129>
- Natchiar, S.K., Myasnikov, A.G., Kratzat, H., Hazemann, I., Klaholz, B.P., 2017. Visualization of chemical modifications in the human 80S ribosome structure. *Nature* 551, 472–477. <https://doi.org/10.1038/nature24482>
- Neganova, I., Zhang, X., Atkinson, S., Lako, M., 2009. Expression and functional analysis of G1 to S regulatory components reveals an important role for CDK2 in cell cycle regulation in human embryonic stem cells. *Oncogene* 28, 20–30. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.358>
- Nguyen, L., Besson, A., Heng, J.I.-T., Schuurmans, C., Teboul, L., Parras, C., Philpott, A., Roberts, J.M., Guillemot, F., 2006. p27kip1 independently promotes neuronal differentiation and migration in the cerebral cortex. *Genes Dev* 20, 1511–1524. <https://doi.org/10.1101/gad.377106>

- Ni, C., Buszczak, M., 2023. Ribosome biogenesis and function in development and disease. *Development* 150, dev201187. <https://doi.org/10.1242/dev.201187>
- Nomiyama, T., Nakamachi, T., Gizard, F., Heywood, E.B., Jones, K.L., Ohkura, N., Kawamori, R., Conneely, O.M., Bruemmer, D., 2006. The NR4A Orphan Nuclear Receptor NOR1 Is Induced by Platelet-derived Growth Factor and Mediates Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *J Biol Chem* 281, 33467–33476. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603436200>
- Nordström, U., Maier, E., Jessell, T.M., Edlund, T., 2006. An Early Role for Wnt Signaling in Specifying Neural Patterns of Cdx and Hox Gene Expression and Motor Neuron Subtype Identity. *PLoS Biol* 4, e252. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040252>
- Norris, K., Hopes, T., Aspden, J.L., 2021. Ribosome heterogeneity and specialization in development. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 12, e1644. <https://doi.org/10.1002/wrna.1644>
- Novitsch, B.G., Chen, A.I., Jessell, T.M., 2001. Coordinate Regulation of Motor Neuron Subtype Identity and Pan-Neuronal Properties by the bHLH Repressor Olig2. *Neuron* 31, 773–789. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00407-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00407-X)
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2003.08.006>
- Oberst, P., Fièvre, S., Baumann, N., Concetti, C., Bartolini, G., Jabaudon, D., 2019. Temporal plasticity of apical progenitors in the developing mouse neocortex. *Nature* 573, 370–374. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1515-6>
- Ohnuma, S., Philpott, A., Wang, K., Holt, C.E., Harris, W.A., 1999. p27Xic1, a Cdk Inhibitor, Promotes the Determination of Glial Cells in Xenopus Retina. *Cell* 99, 499–510. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81538-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81538-X)
- Olivera-Martinez, I., Schurch, N., Li, R.A., Song, J., Halley, P.A., Das, R.M., Burt, D.W., Barton, G.J., Storey, K.G., 2014. Major transcriptome re-organisation and abrupt changes in signalling, cell cycle and chromatin regulation at neural differentiation in vivo. *Development* 141, 3266–3276. <https://doi.org/10.1242/dev.112623>
- Paliouras, G.N., Hamilton, L.K., Aumont, A., Joppé, S.E., Barnabé-Heider, F., Fernandes, K.J.L., 2012. Mammalian target of rapamycin signaling is a key regulator of the transit-amplifying progenitor pool in the adult and aging forebrain. *J Neurosci* 32, 15012–15026. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2248-12.2012>
- Panchision, D.M., Pickel, J.M., Studer, L., Lee, S.-H., Turner, P.A., Hazel, T.G., McKay, R.D.G., 2001. Sequential actions of BMP receptors control neural precursor cell production and fate. *Genes Dev* 15, 2094–2110. <https://doi.org/10.1101/gad.894701>
- Paridaen, J.T., Huttner, W.B., 2014. Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep* 15, 351–364. <https://doi.org/10.1002/embr.201438447>
- Park, H.-C., Appel, B., 2003. Delta-Notch signaling regulates oligodendrocyte specification. *Development* 130, 3747–3755. <https://doi.org/10.1242/dev.00576>
- Park, J.-C., Jeong, W.-J., Kim, M.-Y., Min, D., Choi, K.-Y., 2016. Retinoic-acid-mediated HRas stabilization induces neuronal differentiation of neural stem cells during brain development. *J Cell Sci* 129, 2997–3007. <https://doi.org/10.1242/jcs.184366>
- 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 Dev.* 30, 421–433. <https://doi.org/10.1101/gad.271452.115>
- 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. <https://doi.org/10.1242/dev.068569>
- Pelletier, J., Thomas, G., Volarević, S., 2018. Ribosome biogenesis in cancer: new players and therapeutic avenues. *Nat Rev Cancer* 18, 51–63. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.104>

- Persson, M., Stamatakis, D., Te Welscher, P., Andersson, E., Böse, J., Rüter, U., Ericson, J., Briscoe, J., 2002. Dorsal-ventral patterning of the spinal cord requires Gli3 transcriptional repressor activity. *Genes Dev.* 16, 2865–2878. <https://doi.org/10.1101/gad.243402>
- Pevny, L., Placzek, M., 2005. SOX genes and neural progenitor identity. *Current Opinion in Neurobiology* 15, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.01.016>
- Pevny, L.H., Sockanathan, S., Placzek, M., Lovell-Badge, R., 1998. A role for SOX1 in neural determination. *Development* 125, 1967–1978. <https://doi.org/10.1242/dev.125.10.1967>
- Peyre, E., Morin, X., 2012. An oblique view on the role of spindle orientation in vertebrate neurogenesis. *Development, Growth & Differentiation* 54, 287–305. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2012.01350.x>
- Philippidou, P., Dasen, J.S., 2013. Hox Genes: Choreographers in Neural Development, Architects of Circuit Organization. *Neuron* 80, 12–34. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.020>
- Pilaz, L.-J., Patti, D., Marcy, G., Ollier, E., Pfister, S., Douglas, R.J., 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 21924–21929. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909894106>
- Pommier, Y., Kohn, K.W., 2003. Cycle cellulaire et points de contrôle en oncologie : nouvelles cibles thérapeutiques. *Med Sci (Paris)* 19, 173–186. <https://doi.org/10.1051/medsci/2003192173>
- Prakash, V., Carson, B.B., Feenstra, J.M., Dass, R.A., Sekyrova, P., Hoshino, A., Petersen, J., Guo, Y., Parks, M.M., Kurylo, C.M., Batchelder, J.E., Haller, K., Hashimoto, A., Rundqvist, H., Condeelis, J.S., Allis, C.D., Drygin, D., Nieto, M.A., Andäng, M., Percipalle, P., Bergh, J., Adameyko, I., Farrants, A.-K.Ö., Hartman, J., Lyden, D., Pietras, K., Blanchard, S.C., Vincent, C.T., 2019. Ribosome biogenesis during cell cycle arrest fuels EMT in development and disease. *Nat Commun* 10, 2110. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10100-8>
- Rash, B.G., Lim, H.D., Breunig, J.J., Vaccarino, F.M., 2011. FGF signaling expands embryonic cortical surface area by regulating Notch-dependent neurogenesis. *J Neurosci* 31, 15604–15617. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4439-11.2011>
- Rayon, T., Stamatakis, D., Perez-Carrasco, R., Garcia-Perez, L., Barrington, C., Melchionda, M., Exelby, K., Lazaro, J., Tybulewicz, V.L.J., Fisher, E.M.C., Briscoe, J., 2020. Species-specific developmental timing is associated with differences in protein stability in mouse and human. *Science* 369, eaba7667. <https://doi.org/10.1126/science.aba7667>
- Rebollo, E., Sampaio, P., Januschke, J., Llamazares, S., Varmark, H., González, C., 2007. Functionally unequal centrosomes drive spindle orientation in asymmetrically dividing *Drosophila* neural stem cells. *Dev Cell* 12, 467–474. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.01.021>
- Rhinn, M., Dollé, P., 2012. Retinoic acid signalling during development. *Development* 139, 843–858. <https://doi.org/10.1242/dev.065938>
- Ribes, V., Stutzmann, F., Bianchetti, L., Guillemot, F., Dollé, P., Le Roux, I., 2008. Combinatorial signalling controls Neurogenin2 expression at the onset of spinal neurogenesis. *Dev Biol* 321, 470–481. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.06.003>
- Roberts, R.B., 1958. Microsomal particles and protein synthesis.
- Ronco, C., Martin, A.R., Demange, L., Benhida, R., 2016. ATM, ATR, CHK1, CHK2 and WEE1 inhibitors in cancer and cancer stem cells †The authors declare no competing interests. *Medchemcomm* 8, 295–319. <https://doi.org/10.1039/c6md00439c>
- Ross, A.P., Zarbali, K.S., 2014. The emerging roles of ribosome biogenesis in craniofacial development. *Front Physiol* 5, 26. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00026>
- Roussat, M., Jungas, T., Audouard, C., Omerani, S., Medevielle, F., Agius, E., Davy, A., Pituello, F., Bel-Vialar, S., 2023. Control of G2 Phase Duration by CDC25B Modulates the Switch from Direct to Indirect Neurogenesis in the Neocortex. *J Neurosci* 43, 1154–1165. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0825-22.2022>
- Ruiz i Altaba, A., Nguyễn, V., Palma, V., 2003. The emergent design of the neural tube: prepattern, SHH morphogen and GLI code. *Curr Opin Genet Dev* 13, 513–521. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2003.08.005>

- Russell, P., Nurse, P., 1986. cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* 45, 145–153. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90546-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90546-5)
- Saadaoui, M., Konno, D., Loulier, K., Goïame, R., Jadhav, V., Mapelli, M., Matsuzaki, F., Morin, X., 2017. Loss of the canonical spindle orientation function in the Pins/LGN homolog AGS3. *EMBO Rep* 18, 1509–1520. <https://doi.org/10.15252/embr.201643048>
- 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. *J Cell Biol* 206, 707–717. <https://doi.org/10.1083/jcb.201405060>
- Saade, M., Gutiérrez-Vallejo, I., Le Dréau, G., Rabadán, M.A., Miguez, D.G., Buceta, J., Martí, E., 2013. Sonic Hedgehog Signaling Switches the Mode of Division in the Developing Nervous System. *Cell Reports* 4, 492–503. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.038>
- Saba, J.A., Liakath-Ali, K., Green, R., Watt, F.M., 2021a. Translational control of stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22, 671–690. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00386-2>
- Saba, J.A., Liakath-Ali, K., Green, R., Watt, F.M., 2021b. Translational control of stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22, 671–690. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00386-2>
- Sagot, I., Laporte, D., 2019. Quiescence, an individual journey. *Curr Genet* 65, 695–699. <https://doi.org/10.1007/s00294-018-00928-w>
- Sahara, S., O’Leary, D.D.M., 2009. Fgf10 regulates transition period of cortical stem cell differentiation to radial glia controlling generation of neurons and basal progenitors. *Neuron* 63, 48–62. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.06.006>
- Salomoni, P., Calegari, F., 2010. Cell cycle control of mammalian neural stem cells: putting a speed limit on G1. *Trends in Cell Biology* 20, 233–243. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.01.006>
- Sanchez, C.G., Teixeira, F.K., Czech, B., Preall, J.B., Zamparini, A.L., Seifert, J.R.K., Malone, C.D., Hannon, G.J., Lehmann, R., 2016. Regulation of ribosome biogenesis and protein synthesis controls germline stem cell differentiation. *Cell Stem Cell* 18, 276–290. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.11.004>
- Sandberg, M., Källström, M., Muhr, J., 2005. Sox21 promotes the progression of vertebrate neurogenesis. *Nat Neurosci* 8, 995–1001. <https://doi.org/10.1038/nn1493>
- Savatier, P., Lapillonne, H., van Grunsven, L.A., Rudkin, B.B., Samarut, J., 1996. Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor up-regulates D-type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells. *Oncogene* 12, 309–322.
- Schafer, K.A., 1998. The Cell Cycle: A Review. *Vet Pathol* 35, 461–478. <https://doi.org/10.1177/030098589803500601>
- Segkalia, A., Seuntjens, E., Elkouris, M., Tsalavos, S., Stappers, E., Mitsiadis, T.A., Huylebroeck, D., Remboutsika, E., Graf, D., 2012. Bmp7 regulates the survival, proliferation, and neurogenic properties of neural progenitor cells during corticogenesis in the mouse. *PLoS One* 7, e34088. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034088>
- Shen, T., Ji, F., Wang, Y., Lei, X., Zhang, D., Jiao, J., 2018. Brain-specific deletion of histone variant H2A.z results in cortical neurogenesis defects and neurodevelopmental disorder. *Nucleic Acids Research* 46, 2290–2307. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1295>
- Sherr, C.J., Beach, D., Shapiro, G.I., 2016. Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy. *Cancer Discovery* 6, 353–367. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0894>
- Sherr, C.J., Roberts, J.M., 1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 9, 1149–1163. <https://doi.org/10.1101/gad.9.10.1149>
- Shi, Z., Fujii, K., Kovary, K.M., Genuth, N.R., Röst, H.L., Teruel, M.N., Barna, M., 2017. Heterogeneous Ribosomes Preferentially Translate Distinct Subpools of mRNAs Genome-wide. *Mol Cell* 67, 71–83.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.021>
- Shikata, Y., Okada, T., Hashimoto, M., Ellis, T., Matsumaru, D., Shiroishi, T., Ogawa, M., Wainwright, B., Motoyama, J., 2011. Ptch1-mediated dosage-dependent action of Shh signaling regulates neural progenitor

- development at late gestational stages. *Dev Biol* 349, 147–159. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.10.014>
- Shimizu, T., Bae, Y.-K., Hibi, M., 2006. Cdx-Hox code controls competence for responding to Fgfs and retinoic acid in zebrafish neural tissue. *Development* 133, 4709–4719. <https://doi.org/10.1242/dev.02660>
- Signer, R.A.J., Magee, J.A., Salic, A., Morrison, S.J., 2014. Haematopoietic stem cells require a highly regulated protein synthesis rate. *Nature* 509, 49–54. <https://doi.org/10.1038/nature13035>
- Signer, R.A.J., Qi, L., Zhao, Z., Thompson, D., Sigova, A.A., Fan, Z.P., DeMartino, G.N., Young, R.A., Sonenberg, N., Morrison, S.J., 2016. The rate of protein synthesis in hematopoietic stem cells is limited partly by 4E-BPs. *Genes Dev* 30, 1698–1703. <https://doi.org/10.1101/gad.282756.116>
- Simsek, D., Tiu, G.C., Flynn, R.A., Byeon, G.W., Leppek, K., Xu, A.F., Chang, H.Y., Barna, M., 2017. The Mammalian Ribo-interactome Reveals Ribosome Functional Diversity and Heterogeneity. *Cell* 169, 1051-1065.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.022>
- Singh, A.M., Dalton, S., 2009. The Cell Cycle and Myc Intersect with Mechanisms that Regulate Pluripotency and Reprogramming. *Cell Stem Cell* 5, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.07.003>
- Solc, P., Saskova, A., Baran, V., Kubelka, M., Schultz, R.M., Motlik, J., 2008. CDC25A phosphatase controls meiosis I progression in mouse oocytes. *Developmental Biology* 317, 260–269. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.02.028>
- Sonenberg, N., Hinnebusch, A.G., 2009. Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell* 136, 731–745. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.042>
- Soppa, U., Schumacher, J., Florencio Ortiz, V., Pasqualon, T., Tejedor, F.J., Becker, W., 2014. The Down syndrome-related protein kinase DYRK1A phosphorylates p27Kip1 and Cyclin D1 and induces cell cycle exit and neuronal differentiation. *Cell Cycle* 13, 2084–2100. <https://doi.org/10.4161/cc.29104>
- Spear, P.C., Erickson, C.A., 2012. Interkinetic Nuclear Migration: A Mysterious Process in Search of a Function. *Dev Growth Differ* 54, 306–316. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2012.01342.x>
- Spencer, S.L., Cappell, S.D., Tsai, F.-C., Overton, K.W., Wang, C.L., Meyer, T., 2013. The Proliferation-Quiescence Decision Is Controlled by a Bifurcation in CDK2 Activity at Mitotic Exit. *Cell* 155, 369–383. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.062>
- Spevak, C.C., Elias, H.K., Kannan, L., Ali, M.A.E., Martin, G.H., Selvaraj, S., Eng, W.S., Ernlund, A., Rajasekhar, V.K., Woolthuis, C.M., Zhao, G., Ha, C.J., Schneider, R.J., Park, C.Y., 2020. Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Exhibit Stage-Specific Translational Programs via mTOR- and CDK1-Dependent Mechanisms. *Cell Stem Cell* 26, 755-765.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.12.006>
- Sun, P., Quan, Z., Zhang, B., Wu, T., Xi, R., 2010. TSC1/2 tumour suppressor complex maintains Drosophila germline stem cells by preventing differentiation. *Development* 137, 2461–2469. <https://doi.org/10.1242/dev.051466>
- Sur, S., 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. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2693-2>
- Takahashi, M., 1966. Theoretical basis for cell cycle analysis I. Labelled mitosis wave method. *Journal of Theoretical Biology* 13, 202–211. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(66\)90017-8](https://doi.org/10.1016/0022-5193(66)90017-8)
- Takahashi, T., Goto, T., Miyama, S., Nowakowski, R.S., Caviness, V.S., 1999. Sequence of neuron origin and neocortical laminar fate: relation to cell cycle of origin in the developing murine cerebral wall. *J Neurosci* 19, 10357–10371. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-23-10357.1999>
- Taverna, E., Götz, M., 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. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155801>
- Telley, L., Agirman, G., Prados, J., Amberg, N., Fièvre, S., Oberst, P., Bartolini, G., Vitali, I., Cadilhac, C., Hippenmeyer, S., Nguyen, L., Dayer, A., Jabaudon, D., 2019. Temporal patterning of apical progenitors and their daughter neurons in the developing neocortex. *Science* 364, eaav2522. <https://doi.org/10.1126/science.aav2522>

- Theis-Febvre, N., Filhol, O., Froment, C., Cazales, M., Cochet, C., Monsarrat, B., Ducommun, B., Baldin, V., 2003. Protein kinase CK2 regulates CDC25B phosphatase activity. *Oncogene* 22, 220–232. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206107>
- Thomas, D.M., Carty, S.A., Piscopo, D.M., Lee, J.-S., Wang, W.-F., Forrester, W.C., Hinds, P.W., 2001. The Retinoblastoma Protein Acts as a Transcriptional Coactivator Required for Osteogenic Differentiation. *Molecular Cell* 8, 303–316. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00327-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00327-6)
- Tiku, V., Antebi, A., 2018. Nucleolar Function in Lifespan Regulation. *Trends in Cell Biology* 28, 662–672. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.03.007>
- Timmer, J.R., Wang, C., Niswander, L., 2002. BMP signaling patterns the dorsal and intermediate neural tube via regulation of homeobox and helix-loop-helix transcription factors. *Development* 129, 2459–2472. <https://doi.org/10.1242/dev.129.10.2459>
- Tozer, S., Baek, C., Fischer, E., Gojame, R., Morin, X., 2017. Differential Routing of Mindbomb1 via Centriolar Satellites Regulates Asymmetric Divisions of Neural Progenitors. *Neuron* 93, 542–551.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.042>
- Turrero García, M., Chang, Y., Arai, Y., 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. <https://doi.org/10.1002/cne.23801>
- Ulloa, F., Martí, E., 2010. Wnt won the war: Antagonistic role of Wnt over Shh controls dorso-ventral patterning of the vertebrate neural tube. *Developmental Dynamics* 239, 69–76. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22058>
- Vasistha, N.A., García-Moreno, F., Arora, S., Cheung, A.F.P., Arnold, S.J., Robertson, E.J., Molnár, Z., 2015. Cortical and Clonal Contribution of Tbr2 Expressing Progenitors in the Developing Mouse Brain. *Cereb Cortex* 25, 3290–3302. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhu125>
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N., 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36, 131–149. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x>
- Vernon, A.E., Devine, C., Philpott, A., 2003. The cdk inhibitor p27Xic1 is required for differentiation of primary neurones in *Xenopus*. *Development* 130, 85–92. <https://doi.org/10.1242/dev.00193>
- Voit, R., Grummt, I., 2001. Phosphorylation of UBF at serine 388 is required for interaction with RNA polymerase I and activation of rDNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13631–13636. <https://doi.org/10.1073/pnas.231071698>
- Voit, R., Hoffmann, M., Grummt, I., 1999. Phosphorylation by G1-specific cdk-cyclin complexes activates the nucleolar transcription factor UBF. *EMBO J* 18, 1891–1899. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.7.1891>
- Wang, L., Hou, S., Han, Y.-G., 2016. Hedgehog signaling promotes basal progenitor expansion and the growth and folding of the neocortex. *Nat Neurosci* 19, 888–896. <https://doi.org/10.1038/nn.4307>
- Wang, R., Amoyel, M., 2022. mRNA Translation Is Dynamically Regulated to Instruct Stem Cell Fate. *Frontiers in Molecular Biosciences* 9.
- Wang, S., Xia, P., Ye, B., Huang, G., Liu, J., Fan, Z., 2013. Transient activation of autophagy via Sox2-mediated suppression of mTOR is an important early step in reprogramming to pluripotency. *Cell Stem Cell* 13, 617–625. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.10.005>
- Wang, X., Li, W., Williams, M., Terada, N., Alessi, D.R., Proud, C.G., 2001. Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *EMBO J* 20, 4370–4379. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.16.4370>
- Wang, X.Q., Lo, C.M., Chen, L., Ngan, E.S.-W., Xu, A., Poon, R.Y., 2017. CDK1-PDK1-PI3K/Akt signaling pathway regulates embryonic and induced pluripotency. *Cell Death Differ* 24, 38–48. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.84>
- Watkins, N.J., Bohnsack, M.T., 2012. The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3, 397–414. <https://doi.org/10.1002/wrna.117>

- White, J., Stead, E., Faast, R., Conn, S., Cartwright, P., Dalton, S., 2005. Developmental activation of the Rb-E2F pathway and establishment of cell cycle-regulated cyclin-dependent kinase activity during embryonic stem cell differentiation. *Mol Biol Cell* 16, 2018–2027. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-12-1056>
- Wickramasinghe, D., Becker, S., Ernst, M.K., Resnick, J.L., Centanni, J.M., Tessarollo, L., Grabel, L.B., Donovan, P.J., 1995. Two CDC25 homologues are differentially expressed during mouse development. *Development* 121, 2047–2056. <https://doi.org/10.1242/dev.121.7.2047>
- Wilson, D.N., Doudna Cate, J.H., 2012. The Structure and Function of the Eukaryotic Ribosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a011536. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011536>
- Wilson, L., Gale, E., Chambers, D., Maden, M., 2004. Retinoic acid and the control of dorsoventral patterning in the avian spinal cord. *Dev Biol* 269, 433–446. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.01.034>
- Wilson, L., Maden, M., 2005. The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev Biol* 282, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.02.027>
- Woodhead, G.J., Mutch, C.A., Olson, E.C., Chenn, A., 2006. Cell-Autonomous β -Catenin Signaling Regulates Cortical Precursor Proliferation. *J Neurosci* 26, 12620–12630. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3180-06.2006>
- Woolnough, J.L., Atwood, B.L., Liu, Z., Zhao, R., Giles, K.E., 2016. The Regulation of rRNA Gene Transcription during Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *PLOS ONE* 11, e0157276. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157276>
- Wrobel, C.N., Mutch, C.A., Swaminathan, S., Taketo, M.M., Chenn, A., 2007. Persistent expression of stabilized beta-catenin delays maturation of radial glial cells into intermediate progenitors. *Dev Biol* 309, 285–297. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.07.013>
- Wu, S., Wolgemuth, D.J., 1995. 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. <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.1207>
- Yabut, O.R., Fernandez, G., Huynh, T., Yoon, K., Pleasure, S.J., 2015. Suppressor of Fused Is Critical for Maintenance of Neuronal Progenitor Identity during Corticogenesis. *Cell Rep* 12, 2021–2034. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.031>
- Yoon, I.-S., Chung, J.H., Hahm, S.-H., Park, M.J., Lee, Y.R., Ko, S.I., Kang, L.-W., Kim, T.-S., Kim, J., Han, Y.S., 2011. Ribosomal protein S3 is phosphorylated by Cdk1/cdc2 during G2/M phase. *BMB Rep* 44, 529–534. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2011.44.8.529>
- Yoshikawa, H., Larance, M., Harney, D.J., Sundaramoorthy, R., Ly, T., Owen-Hughes, T., Lamond, A.I., 2018. Efficient analysis of mammalian polysomes in cells and tissues using Ribo Mega-SEC. *eLife* 7, e36530. <https://doi.org/10.7554/eLife.36530>
- Yu, F., Kuo, C.T., Jan, Y.N., 2006. Drosophila neuroblast asymmetric cell division: recent advances and implications for stem cell biology. *Neuron* 51, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.06.016>
- Yu, F.-X., Zhao, B., Guan, K.-L., 2015. Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell* 163, 811–828. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.044>
- Zhai, W., Comai, L., 2000. Repression of RNA polymerase I transcription by the tumor suppressor p53. *Mol Cell Biol* 20, 5930–5938. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.16.5930-5938.2000>
- Zhang, Q., Shalaby, N.A., Buszczak, M., 2014. Changes in rRNA Transcription Influence Proliferation and Cell Fate Within a Stem Cell Lineage. *Science* 343, 298–301. <https://doi.org/10.1126/science.1246384>
- Zhang, W.W., Zhang, X.J., Liu, H.X., Chen, J., Ren, Y.H., Huang, D.G., Zou, X.H., Xiao, W., 2011. Cdk1 is required for the self-renewal of mouse embryonic stem cells. *J Cell Biochem* 112, 942–948. <https://doi.org/10.1002/jcb.23010>
- Zhang, X., Neganova, I., Przyborski, S., Yang, C., Cooke, M., Atkinson, S.P., Anyfantis, G., Fenyk, S., Keith, W.N., Hoare, S.F., Hughes, O., Strachan, T., Stojkovic, M., Hinds, P.W., Armstrong, L., Lako, M., 2009. A role for NANOG in G1 to S transition in human embryonic stem cells through direct binding of CDK6 and CDC25A. *Journal of Cell Biology* 184, 67–82. <https://doi.org/10.1083/jcb.200801009>

Zhou, Q., Wang, S., Anderson, D.J., 2000. Identification of a Novel Family of Oligodendrocyte Lineage-Specific Basic Helix–Loop–Helix Transcription Factors. *Neuron* 25, 331–343. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80898-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80898-3)