



HAL
open science

Un nouveau rôle de CDKN1C dans le contrôle de la transition des modes de division au cours de la neurogenèse des vertébrés

Baptiste Mida

► **To cite this version:**

Baptiste Mida. Un nouveau rôle de CDKN1C dans le contrôle de la transition des modes de division au cours de la neurogenèse des vertébrés. Biologie du développement. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS371 . tel-04514083

HAL Id: tel-04514083

<https://theses.hal.science/tel-04514083>

Submitted on 21 Mar 2024

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.

SORBONNE UNIVERSITÉ

ÉCOLE DOCTORALE COMPLEXITE DU VIVANT – ED515
Laboratoire de recherche « Division Cellulaire et Neurogenèse »
Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure

T H È S E
Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ SORBONNE UNIVERSITÉ

Discipline : Biologie cellulaire
Préparée à l'Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure

Baptiste MIDA
Soutenue le : 20 Septembre 2023

**Un nouveau rôle de CDKN1C dans le contrôle
de la transition des modes de division au cours
de la neurogenèse des vertébrés**

Sous la direction de :

Mme Evelyne Fischer – Ecole Normale Supérieure

Composition du jury :

Mme Pascale GILARDI-HEBENSTREIT – Directeur de Recherche - Institut Jacques MONOD	Rapporteur
Mr Ludovic TELLEY – Assistant Professeur – Université de Lausanne	Rapporteur
Mme Valérie DASTUGUE-LOBJOIS – Maîtresse de Conférences – Université Toulouse III	Examineur
Mme Marie-Emilie TERRET – Directeur de Recherche – Collège de France	Président / Examineur
Mr Jean LIVET – Directeur de Recherche – Institut de la Vision	Examineur
Mme Evelyne FISCHER – Chargée de Recherche – Ecole Normale Supérieure	Directrice
Mr Xavier MORIN – Directeur de Recherche – Ecole Normale Supérieure	Invité

Remerciements

Dans un premier temps, je souhaite remercier Sorbonne Université, l'Ecole Doctorale Complexité du Vivant et l'Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure, les trois organismes qui m'ont permis de réaliser ce travail de thèse.

Je remercie les membres du Jury, en commençant par les rapporteurs : Docteurs Pascale GILARDI-HEBENSTREIT et Ludovic TELLEY, qui ont accepté de lire et évaluer mon travail de thèse ; ainsi que les Docteurs Valérie DASTUGUE-LOBJOIS, Marie-Emilie TERRET et Jean LIVET, qui ont accepté de l'examiner. Je remercie également les membres de mon comité de thèse, les docteurs Stéphane NEDELEC et Jonathan WEITZMAN, pour le temps et les conseils accordés au cours de ma thèse.

Je remercie également les Docteurs Morgane THOMAS-CHOLLIER et Nathalie LEHMANN, nos partenaires bio-informaticiennes, sans qui ces travaux n'auraient pas pu voir le jour.

Je tiens à adresser mes plus chaleureux et sincères remerciements à Xavier et à Evelyne. Au cours de ces quatre années, j'ai beaucoup appris sous votre encadrement et à vos côtés, et je ne pourrai jamais assez vous remercier pour tout ce que vous m'avez apporté.

Je remercie également et très chaleureusement tous les membres de l'équipe : Samuel, pour tes conseils scientifiques et tes idées géniales ; Rosette pour ton aide si précieuse au cours de nos nombreuses expériences et ta gentillesse, M'sieur Benjamin pour toutes nos rigolades et notre amitié (malgré les vols répétés de pipettes, bouteilles de PBS et autres marqueurs) et enfin ma camarade Bojana, qui approche également de la fin de l'aventure du doctorat. Je remercie également les membres qui ont quitté le laboratoire au cours de ma thèse : Kamal, mon partenaire de culture cellulaire/pause-café/babyfoot pour sa bienveillance, sa bonne humeur permanente et les délicieux gâteaux et pâtisseries concoctés, sans oublier Alciades, avec qui j'ai tissé une véritable amitié à travers nos très nombreux fous-rires.

Je tiens également à remercier tous les membres du 5^e étage de l'Institut, qui ont contribué à égayer ce grand voyage que fût mon doctorat.

Enfin, je conclurai en adressant mes plus chaleureux remerciements à mes amis : Alexandre, Arnaud, Clément, Florent et Raphaël ; ma famille : Maman, Papa et mon frère Sébastien ; et ma chère et tendre Amélie-Rose. Vous avez tous été à mes côtés pendant ces quatre années pour partager mes moments de joies et de peines, et je n'aurai pu accomplir ce long travail sans l'affection et le soutien que vous avez su me témoigner.

Résumé

Le système nerveux central (SNC) des vertébrés est constitué d'un assemblage complexe de nombreux types cellulaires, qui se développent à partir d'un réservoir limité de cellules souches neuroépithéliales (également appelées progéniteurs neuraux). Avant le début de la neurogenèse, les progéniteurs amplifient cette réserve via la réalisation de divisions symétriques prolifératives (SYM - 1 progéniteur produit 2 progéniteurs). Avec le début de la neurogenèse, ces progéniteurs transitionnent progressivement vers l'utilisation d'un mode de division asymétrique neurogénique (ASYM - 1 progéniteur produit 1 neurone et 1 progéniteur). Cette transition progressive d'un mode de division SYM vers ASYM participe notamment à la régulation de l'équilibre entre croissance et différenciation au cours du développement du SNC. Certains travaux pionniers ont montré que les progéniteurs SYM et ASYM diffèrent au niveau transcriptomique, suggérant un contrôle génétique spécifique sur la mise en place de cette transition. Par exemple, l'expression du facteur de transcription Tis21 est initiée dans les progéniteurs ASYM lors de la transition d'un mode de division SYM vers ASYM. En dépit de ces premières découvertes, peu de choses sont aujourd'hui connues sur les programmes transcriptomiques régissant la mise en place de cette transition. Ainsi, mon projet de thèse a eu pour objectifs : **1)** d'identifier de nouveaux acteurs et/ou régulateurs de la transition d'un mode de division symétrique prolifératif vers asymétrique neurogénique, et **2)** de valider fonctionnellement le rôle de ces candidats dans la régulation de cette transition.

A travers l'analyse de données transcriptomiques produites à l'échelle de la cellule unique, provenant de tubes neuraux d'embryons de poulet et souris à plusieurs stades de développement, j'ai identifié en partenariat avec une équipe de bio-informaticiens (Morgane THOMAS-CHOLLIER, Nathalie LEHMANN, IBENS) plusieurs gènes candidats à la régulation de la transition du mode de division, et ce selon 2 critères : 1) une expression différentielle du gène candidat entre progéniteurs Tis21-positifs et négatifs et 2) un profil d'expression pseudo-temporel évoluant de manière similaire à celui de Tis21 au cours de la neurogenèse. Parmi les gènes identifiés, je me suis focalisé sur l'étude de CDKN1C (p57Kip2), dont le rôle le plus caractérisé au cours de la neurogenèse est celui de régulateur négatif du cycle cellulaire. Mes travaux ont montré l'expression progressive de l'ARNm de CDKN1C dans la zone ventriculaire du tube neural embryonnaire de poulet en développement, suggérant fortement une expression de CDKN1C dans la population progénitrice. Puis, j'ai montré que la perte de fonction *in vivo* de CDKN1C (via shRNA) diminue la neurogenèse à l'échelle tissulaire, en favorisant la prolifération des progéniteurs neuraux. L'exploration de ce phénotype a montré que les progéniteurs présentant une expression diminuée de CDKN1C présentent une durée moyenne de cycle cellulaire plus courte que celle de progéniteurs sauvages, notamment due à une réduction de la durée de la phase G1. A travers une analyse clonale de la descendance de progéniteurs individuels, j'ai ensuite montré que la diminution de l'expression de CDKN1C dans ces progéniteurs favorisait le mode de division SYM. Une diminution combinée de l'expression de CDKN1C et Cycline D1, un régulateur du cycle cellulaire dont la diminution d'expression devrait allonger la durée de G1, restaure le phénotype observé après la diminution seule de CDKN1C, aux échelles tissulaires et cellulaires, indiquant que le rôle de CDKN1C dans le contrôle du mode de division semble s'effectuer principalement à travers son rôle de régulateur négatif du cycle cellulaire. Enfin, la diminution d'expression du gène marqueur Tis21

observée dans la population diminuée pour l'expression de CDKN1C (par rapport à la population contrôle) semble indiquer un rôle direct de CDKN1C sur le contrôle du mode de division.

Dans l'ensemble, les résultats de mes travaux suggèrent un nouveau rôle de CDKN1C dans la production neuronale au cours de la neurogenèse des vertébrés, à travers la régulation de la transition du mode de division SYM vers ASYM dans les progéniteurs neuraux.

Table des matières

Préface	11
Chapitre I : Neurogenèse des vertébrés	12
Partie A : Etapes précoces de la formation du tube neural	12
Partie B : Du tube neural vers le SNC mature	15
B.1 : La formation du cortex cérébral	16
B.2 : La formation de la moelle épinière.....	20
Partie C : Mécanismes d’acquisition de l’identité cellulaire au cours de la neurogenèse	22
C.1 : Le patterning antéro-postérieur et dorso-ventral de la moelle épinière	22
C.2 : Les facteurs de transcription	25
C.3 : Progression temporelle des progéniteurs et restriction du potentiel	26
Partie D : Mécanismes de régulation de la prolifération VS différenciation	29
D.1 : Les facteurs proneuraux	29
D.2 : La voie de signalisation Notch	30
D.3 : Le mouvement intercinétique du noyau	31
D.4 : Sortie des progéniteurs du cycle cellulaire et différenciation	31
Partie E : Influence de l’environnement sur la régulation de la prolifération VS différenciation	32
Chapitre II : Modes de division et régulation de la transition entre les Modes de division au cours de la neurogenèse embryonnaire	35
Partie A : les différents modes de division au cours de la neurogenèse	38
A.1 – Identification des différents modes de division au cours de la neurogenèse	38
A.2 – Evolution des modes de division au cours de la neurogenèse à l’échelle tissulaire	41
Partie B : Divisions asymétriques et mécanismes cellulaires	42
B.1 – Division cellulaire asymétrique	43
B.2 – Division cellulaire ASYM intrinsèque : déterminants de l’identité	44
B.2.1 – Les endosomes et la voie de signalisation Notch	44
B.2.2 – Les protéines de polarité cellulaire (et toujours la voie Notch)	45
B.2.3 – L’orientation du fuseau mitotique	47
B.2.4 – L’asymétrie intrinsèque du fuseau mitotique : le centrosome	48
B.2.5 – Le pied basal	49
Partie C : Régulation moléculaire de la transition des modes de division	50
C.1 – Arguments en faveur de l’existence d’une régulation moléculaire	50
C.1.1 – Absence de réversibilité des modes de division	50
C.1.2 – Etudes transcriptomiques comparatives	51
C.2 – Analyses transcriptomiques à l’échelle cellule-unique : une stratégie prometteuse pour identifier la régulation des modes de division	53

Chapitre III : Cycle cellulaire et neurogenèse	56
Partie A : Le cycle cellulaire eucaryote et sa régulation : aspect historique	57
Partie B : Le cycle cellulaire eucaryote et sa régulation	59
B.1: Les principaux acteurs du cycle	59
B.1.1: Les couples cyclines – CDKs	59
B.1.2: Régulation de l'activité des couples cyclines – CDKs : le cœur de la régulation du cycle cellulaire	61
B.2: Progression du cycle cellulaire	64
B.2.1: La phase G1	64
B.2.2: La phase S	66
B.2.3: La phase G2	66
B.2.4: La Mitose	67
Partie C : Acteurs du cycle cellulaire et acquisition d'un phénotype différencié	68
C.1: Les couples cyclines – CDKs, acteurs de destin dans les cellules souches selon des rôles dépendants et indépendants du cycle	68
C.1.1: Rôles cycle-dépendant et indépendant des acteurs du cycle sur le destin	68
C.1.2: Les CKIs, des acteurs de la différenciation	68
C.1.3: Découplage de la sortie du cycle cellulaire et du processus de différenciation	69
C.2: Modulation des durées du cycle cellulaire et de ses phases, destin cellulaire et modes de division au cours de la neurogenèse embryonnaire	69
C.2.1: Allongement progressif de la durée du cycle cellulaire au cours de la neurogenèse embryonnaire	69
C.2.2: Evolution des durées de phases lors de la neurogenèse embryonnaire ...	71
Partie D : Modulation des durées de cycle / phases et les modes de division au cours de la neurogenèse	75

Chapitre IV : p57Kip2 (CDKN1C), un CKI régulateur de la neurogenèse

Partie A : p57Kip2 (CDKN1C) : Généralités - Structure – Fonctions – Régulation	79
A.1 – Structure du gène CDKN1C et de la protéine p57Kip2	79
A.2 – Fonctions de p57Kip2	81
A.2.1 – Fonction canonique de p57Kip2	82
A.2.2 – Fonctions non canoniques de p57Kip2	83
A.3 – Régulation de p57Kip2	86
A.3.1 – Régulation par les voies de signalisation	86
A.3.2 – Facteurs trans et éléments cis de régulation	87
A.3.3 – Modifications de la chromatine	88
A.3.4 – Régulation par les miRNAs et LncRNAs	89
A.3.5 – Régulation post-transcriptionnelle	90
A.4 – p57Kip2 et pathologies	90
Partie B : p57Kip2 et la régulation de la neurogenèse embryonnaire	91
B.1 Patrons d'expression de CDKN1C/p57Kip2 au cours de la neurogenèse embryonnaire	91
B.1.1 – Expression dans la région spinale en développement	91
B.1.2 – Expression dans la région corticale en développement	92

B.2 - Modulation de l'expression de p57Kip2 et impact sur la neurogenèse embryonnaire	93
Chapitre V : Résultats	96
Chapitre VI : Perspectives	98
Partie A – Expression de CDKN1C/p57 dans les progéniteurs	98
Partie B – Analyse clonale du destin des cellules filles en condition de surexpression « contrôlée » de CDKN1C	100
Partie C – CDKN1C et modes de division : Evaluation de l'expression de Tis21	102
Chapitre VII : Discussion	104
Partie A : Analyses transcriptomiques	104
A.1 – Emergence de CDKN1C en tant que gène candidat	104
A.1.1 – Analyses transcriptomiques : la combinaison de plusieurs approches	104
A.1.2 – Expression progressive de CDKN1C	106
A.1.3 – Quels mécanismes pourraient réguler l'expression progressive de CDKN1C ?	108
A.2 – Autres gènes candidats et programme transcriptomique	110
Partie B : CDKN1C et la transition neurogénique	111
B.1 – Le choix de la stratégie shRNA	111
B.2 – Effets observés sur la neurogenèse embryonnaire par diminution de l'expression de CDKN1C via shRNA : en accords avec la littérature ?	111
B.2.1 – Effets sur la balance prolifération / différenciation au niveau tissulaire	111
B.2.2 – Effets de CDKN1C au cours de la neurogenèse : cycle cellulaire dépendant ou indépendant ?	112
B.3 – CDKN1C et la régulation des modes de division	115
B.3.1 – Etude de la transition des modes de division par analyse clonale	115
B.3.2 – Transition des modes de division et expression de Tis21	116
B.3.3 – Mécanismes cellulaires du changement de mode de division et asymétrie intrinsèque de la cellule mère	116
Résumé	119
Bibliographie	121

Table des figures

Chapitre I : Neurogenèse des vertébrés

Figure 1 : Formation du tube neural dans la région antérieure de l'embryon

Figure 2 : Formation du tube neural dans la région postérieure de l'embryon

Figure 3 : Développement précoce du cerveau

Figure 4 : Développement cortical des mammifères et composants cellulaires

Figure 5 : Un segment de la moelle épinière

Figure 6 : Gradients opposés de morphogènes et patterning

Figure 7 : Les gènes Hox structurent la moelle épinière le long de l'axe AP

Figure 8 : Différentes populations neuronales composant la moelle épinière

Figure 9 : Patterning temporel des neuroblastes embryonnaires et larvaires

Chapitre II : Modes de division et régulation de la transition entre les modes de division au cours de la neurogenèse embryonnaire

Figure 10 : Les différents modes de division des cellules progénitrices neurales

Figure 11 : Modèles de division symétrique et asymétrique

Figure 12 : Stratégie MADM et analyse clonale

Figure 13 : Patron d'expression de Tis21 au cours de la neurogenèse embryonnaire

Figure 14 : Fréquences des différents modes de division à l'échelle tissulaire

Figure 15 : Différents concepts d'asymétrie de division

Chapitre III : Cycle cellulaire et neurogenèse

Figure 16 : Condensation de la chromatine et mitose

Figure 17 : Expression des différentes cyclines en fonction des phases du cycle cellulaire

Figure 18 : Contrôle du cycle cellulaire et ses principaux régulateurs

Figure 19 : Régulation de la progression du cycle cellulaire par les protéines ribosomales

Chapitre IV : p57Kip2 (CDKN1C), un CKI régulateur de la neurogenèse

Figure 20 : Les protéines p21, p27, p57

Figure 21 : CDKs et CKIs au cours du développement murin

Figure 22 : Résumé des phénotypes observés chez les souris p57Kip2K.O, p57^{P27KI} et p57^{CK-}

Figure 23 : p57Kip2 dans la régulation de l'apoptose

Figure 24 : Facteurs bHLH impliqués et régulation de la transcription de p57

Figure 25 : Facteurs en-trans et séquences en-cis de régulation de l'expression de p57Kip2

Figure 26 : Marques épigénétiques dans la région promotrice de p57Kip2

Figure 27 : CDKN1C/p57Kip2 au cours de la neurogenèse embryonnaire spinale.

Figure 28 : CDKN1C/p57Kip2 au cours de la neurogenèse embryonnaire corticale

Chapitre VI : Perspectives

Figure 29 : Surexpression contrôlée de CDKN1C et analyse clonale du destin des cellules filles

Chapitre VII : Discussion

Figure 30 : Représentations UMAP des données filtrées de Delile et collaborateurs

Figure 31 : CDKN1C/p57Kip2 au cours de la neurogenèse embryonnaire corticale

Figure 32 : Gènes potentiellement impliqués dans la régulation de l'expression de CDKN1C au cours de la neurogenèse embryonnaire

Table des Abréviations

AP = Antéro-postérieur
APC/C = Anaphase Promoting Complex / Cyclosome
aRGs = Apical Radial Glial cells – cellules apicales de glie radiaire
ATM = Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR = ATM and Rad3-related
bHLH = basic Helix-Loop-Helix
bIPs = basal Intermediate Progenitors
BMPs = Bone Morphogenetic Proteins
BrdU = 5-Bromo-2'-déoxyuridine
bRGs = Basal Radial Glial Cells = cellules basales de glie radiaire
BWS = Syndrome de Beckwith-Wiedemann
CAK = CDK-Activating Kinase
CBD = Cyclin Box Domain
CCND1 = Cycline D1
CDC25B = Cell Division Cycle 25B
CDK = Cyclin-Dependent Kinase
CFP = Cyan Fluorescent Protein
Cip/Kip = CDK Interacting Protein / Kinase Inhibitory Protein
cK.O = Knock-Out conditionnel
CP = Plaque Corticale
CSNEs = Cellules Souches Neuroépithéliales
DV = Dorso-Ventral
EdU = 5-ethynyl-2'-déoxyuridine
ES = Embryonic Stem
FGF = Fibroblast Growth Factor
FT = Facteur de Transcription
FUCCI = Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator
GFAP = Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP = Green Fluorescent Protein
GMC = Ganglion Mother Cell
HH = Hamburger-Hamilton stage
HIS = Hybridation *in situ*
Hox = Homéobox
Hpf = hours post-fertilization
IdU = 2'-deoxy-5-iodouridine
IGF = Insulin-Like Growth Factors
IMAGe = Intrauterine growth, Metaphyseal dysplasia, Adrenal insufficiency, Genital abnormalities
INK4 = Inhibitors of CDK4
INM = Interkinetic Nuclear Migration
IP = Progéniteur Intermédiaire
IZ = Zone Intermédiaire
K.I = Knock-In
K.O = Knock-Out
KD = Knockdown
LCS = Liquide Cérébro-Spinal

MADM = Mosaic Analysis with Double Markers
MDD = Mode de division
Mib1 = Mindbomb 1
MPF = Mitosis Promoting Factor
MTOC = Microtubule Organizing Center
MZ = Zone Marginale
NE = Neuroépithélium
NT3 = Neurotrophine 3
OSVZ = Zone sous Ventriculaire extérieure
PCNA = Proliferating Cell Nuclear Antigen
PLK1 = Polo-Like Kinase 1
PTCH1 = Patched 1
Q-RT-PCR = Quantitative-Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RA = Acide rétinoïque
RAR = Récepteur A du rétinoïde
Rb = Rétinoblastome
RBP = RNA-Binding Protein
RFP = Red Fluorescent Protein
RPCs = Retina Progenitor Cells
RPIC = Ribosomal Protein Inhibiting CDKs
RXR = Récepteur X du rétinoïde
SAC = Spindle Assembly Checkpoint
saPCs = subapical Progenitor Cells
Sara = Smad Anchor for Receptor Activation
scRNA-seq = single cell RNA-sequencing – séquençage de l'ARN à l'échelle cellule-unique
Shh = Sonic HedgeHog
ShRNA = short hairpin RNA
SmFISH = single molecule Fluorescent *in situ* hybridization
SMO = Smoothened
SNC = Système Nerveux Central
SNP = Système Nerveux Périphérique
SSR = Syndrome de Silver-Russell
SVZ = Zone Sous-Ventriculaire
TAPs = Transient Amplifying Progenitors
TGF- β = Transforming Growth Factor β
TRE = Tetracycline Responsive Element
UV = Ultraviolets
VNC = Corde Neurale Ventrale
VZ = Zone Ventriculaire
ZO-1 = Zonula Occludens 1

Préface

Au cours du développement embryonnaire des vertébrés, la construction du système nerveux central (SNC) repose sur un équilibre entre prolifération des cellules souches progénitrices et leur différenciation en neurones et cellules gliales. L'aspect prolifératif permet d'obtenir le nombre « correct » de cellules pour la construction du système, et l'aspect différenciatif permet la production de la diversité impressionnante de types de neurones et cellules gliales, qui conféreront des fonctions spécifiques aux différentes régions du SNC. Au cours de la neurogenèse embryonnaire, une régulation très fine de cette balance entre prolifération et différenciation permet à ces deux aspects de travailler de concert. Ainsi, une rupture de cette balance, en faveur de l'un ou l'autre de ces aspects, entraîne des conséquences néfastes sur la mise en place du SNC. Un excès de prolifération des progéniteurs conduit à l'acquisition de phénotypes macrocéphaliques, alors qu'une différenciation prématurée de ces progéniteurs entraîne le développement de microcéphalie. Ces phénotypes de sous- ou sur-production cellulaire sont généralement accompagnés d'une génération incorrecte des différentes identités progénitrices et neuronales, ce qui souligne à nouveau l'intime proximité existante entre ces deux aspects.

A travers le premier chapitre de ce manuscrit, je décrirai brièvement les concepts clés de la neurogenèse embryonnaire des vertébrés, et m'attarderai plus longuement sur les mécanismes responsables de l'acquisition des différentes identités progénitrices et neuronales au cours de ce processus. Parmi ces mécanismes, la transition progressive des modes de division des progéniteurs neuraux et la régulation des paramètres du cycle cellulaire sont deux facteurs au cœur de mon travail de thèse, et feront l'objet d'un deuxième et troisième chapitre respectivement. Enfin, le dernier chapitre de cette introduction sera consacré à l'étude de CDKN1C/p57Kip2, pour lequel j'ai identifié, au cours de mes travaux de thèse, un rôle nouveau sur la production neuronale à travers la régulation de la transition des modes de division dans les progéniteurs neuraux.

Chapitre I : Neurogenèse des vertébrés

Le système nerveux central (SNC) des vertébrés est une structure extraordinairement complexe, constituée de nombreux types de neurones et cellules gliales, assurant des fonctions spécifiques de réception, intégration, traitement et émission de messages nerveux. Le SNC se développe à partir d'un réservoir limité de cellules progénitrices (appelées cellules souches neuroépithéliales), qui donneront naissance aux différentes structures (cerveau et moelle épinière) et la diversité des types cellulaires les composant. Au cours du développement, la régulation spatio-temporelle très fine de la balance prolifération/différenciation et l'acquisition d'identités cellulaires particulières au sein des différentes régions sont les événements clés permettant la construction du SNC adulte.

Au sein des différentes régions du SNC, les futurs neurones acquièrent des identités spécifiques à des temps différents entre le cerveau et la moelle épinière, suggérant des dynamiques de production des neurones propres à chaque entité. Ceci nous amène à poser la question suivante : quels sont les mécanismes qui participent à la régulation de la production et de la spécification des différents types cellulaires au cours de la neurogenèse du SNC des vertébrés ?

Cette régulation est complexe et repose sur un grand nombre de mécanismes (cycle cellulaire, programme de différenciation). Un niveau supplémentaire de cette régulation est représenté par le dialogue permanent de ces différents mécanismes cellulaires au cours de la neurogenèse. Ainsi, cette question possède de multiples réponses, car un grand nombre de mécanismes ont été identifiés comme participant à cette régulation. Avant de les décrire, j'aborderai dans un premier temps et de manière succincte les étapes du développement du SNC vers les structures adultes. Afin d'illustrer l'incroyable différence de développement entre différentes régions du SNC, j'aborderai le développement du cortex et celui de la moelle épinière.

Partie A : Etapes précoces de la formation du tube neural

Au cours du développement embryonnaire précoce, l'ensemble des événements se déroulant au cours de l'étape de gastrulation va donner naissance aux 3 feuillets embryonnaires primitifs que sont l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme. Ce dernier est davantage spécifié selon trois parties : la plaque neurale (structure précurseur du tube neural), l'épiderme et les cellules de la crête neurale (précurseurs, entre autres, du système nerveux périphérique). La spécification de ces différentes structures à partir de l'ectoderme est assurée pendant l'étape de gastrulation, principalement par une régulation des niveaux de facteurs BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) provenant du mésoderme, auxquels sont exposées les cellules ectodermiques. En effet,

des niveaux élevés de BMPs spécifient les cellules vers un destin épidermique, alors que de très faibles niveaux d'exposition orientent les cellules vers une identité de plaque neurale. Enfin, une exposition à des niveaux intermédiaires entraîne la formation des cellules de la crête neurale. Le processus par lequel les trois régions ectodermiques sont rendues physiquement et fonctionnellement distinctes les unes des autres est appelé neurulation et se déroule immédiatement après l'étape de gastrulation (Gilbert, 2019).

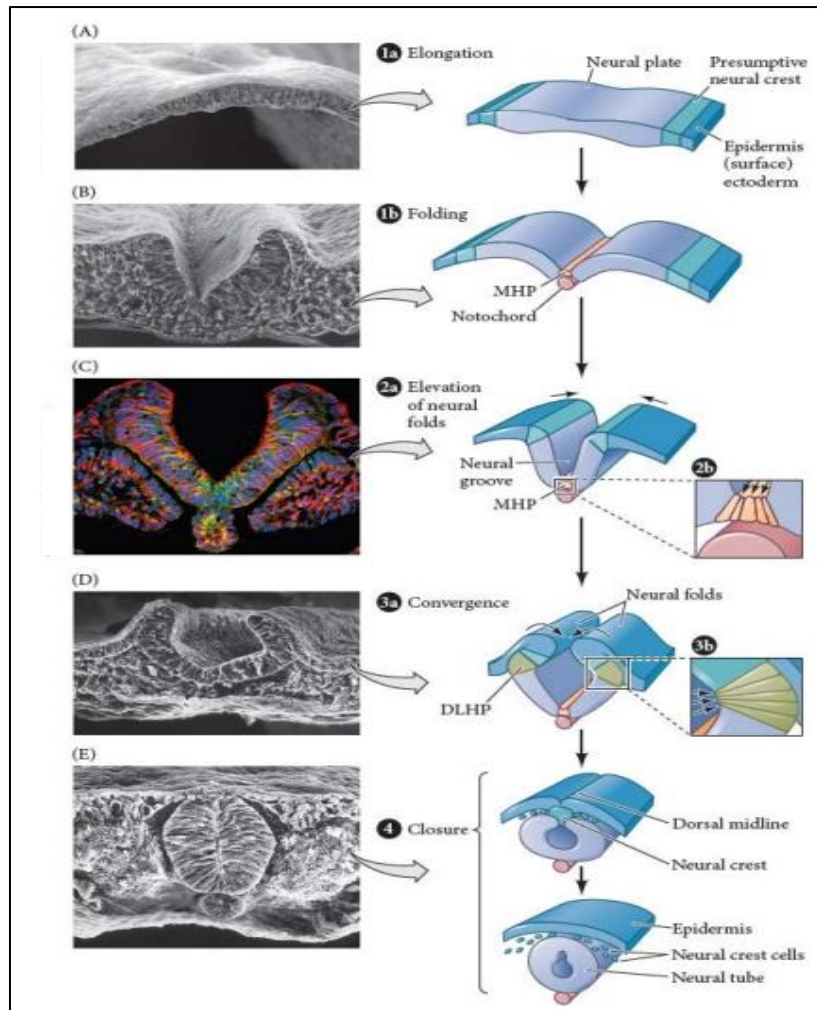


Figure 1 : Formation du tube neural dans la région antérieure de l'embryon de poulet par neurulation primaire. (A, 1a) La plaque neurale est une structure dérivée du feuillet ectodermique, et est à l'origine du tube neural (B, 1b) Les bords de la plaque neurale s'épaississent et le repliement commence (C, 2a) Le repliement progressif des bords de la plaque donne naissance à la gouttière neurale, alors que l'épiderme présomptif continue à se déplacer vers la ligne médiane (B, C, 2b). (D, 3a) Les bords de la plaque neurale continuent de converger vers la ligne médiane (E, 4) Les bords neuraux fusionnent et donnent naissance au tube neural, qui se sépare physiquement de l'épiderme sus-jacent, les cellules de la crête neurale se dispersant. - d'Après Gilbert, 2019

Les cellules constituant la plaque neurale peuvent donner naissance à tous les types cellulaires du SNC (Wilson and Edlund, 2001), à l'exception des cellules de la microglie dont l'origine est mésodermique (Zuchero and Barres, 2015), des cellules épithéliales/endothéliales et des péricytes. Cette plaque se forme d'abord dans la région antérieure de l'embryon, puis s'allonge progressivement vers la région postérieure. Au cours du processus de neurulation, la plaque neurale se déplace à l'intérieur de l'embryon et donne naissance au tube neural, qui se détachera de l'épiderme sus-jacent via l'expression différentielle de molécules d'adhésion entre l'épiderme et le tube neural (Araya and Carrasco, 2021; Harrington et al., 2009).

Lors de la neurulation, une série de mouvements morphogénétiques vont aboutir, à partir de la plaque neurale, à la formation du tube neural, selon des mécanismes distincts et asynchrones le long de l'axe antéro-postérieur (AP). Dans la région antérieure de l'embryon, la neurulation est dite « primaire ». Dans un premier temps, les bords de la plaque s'épaississent et se soulèvent (Moury and Schoenwolf, 1995), entraînant l'apparition d'une structure en forme de « U » - la gouttière neurale (Catala et al., 1996), puis fusionnent au niveau de la ligne médiane de l'embryon pour donner naissance à une structure en forme de tube (Lawson et al., 2001; Smith, 1997 - **Figure 1**). Au regard de la partie postérieure, le processus de neurulation est dit « secondaire ». Ici, des cellules mésenchymateuses produites par l'ectoderme et le mésoderme se regroupent et forment une corde solide appelée « corde médullaire ». Ensuite, des processus de cavitation engendrent progressivement l'apparition de lumières au sein de la corde, dont la fusion donne naissance à une seule grande lumière : la lumière du tube neural (**Figure 2**). A la jonction entre zones de neurulation primaire et secondaire existe une zone dite « mixte », au sein de laquelle la formation du tube neural s'opère via des processus appartenant aux deux modes de neurulation (Gilbert, 2019). Ainsi naît le tube neural.

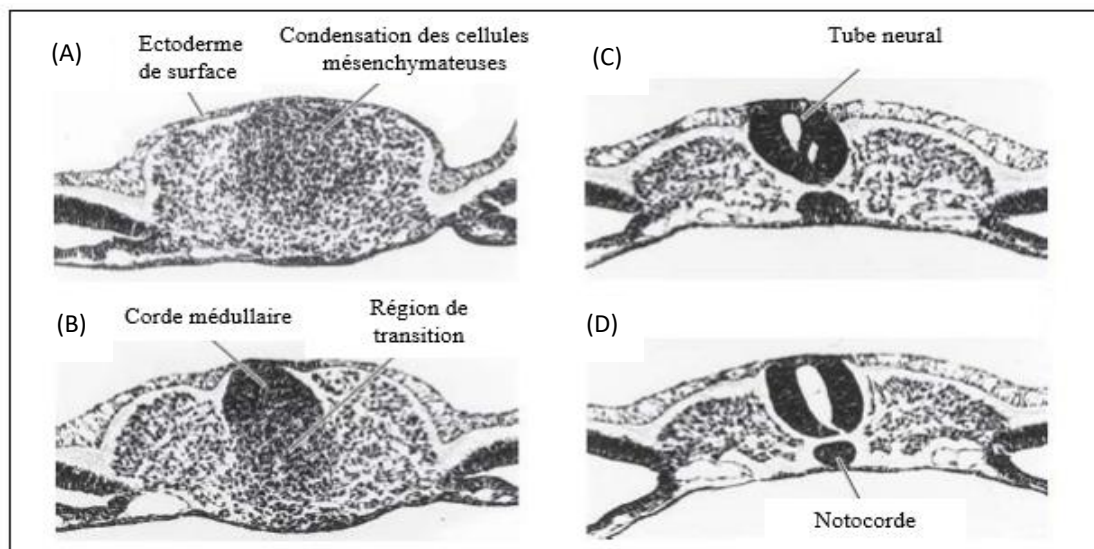


Figure 2 : Formation du tube neural dans la région postérieure de l'embryon de poulet par neurulation secondaire. Embryon de poulet au stade 25 somites. (A) Les cellules mésenchymateuses se condensent pour former la moelle épinière à l'extrémité la plus caudale de l'embryon. (B) Formation de la corde médullaire par condensation des cellules mésenchymateuses. (C) Le processus de cavitation entraîne la formation de lumières et la naissance du tube neural. La notocorde est en cours de formation. (D) Les lumières fusionnent pour former le canal central du tube neural. - d'Après Gilbert, 2019

Partie B : Du tube neural vers le SNC mature

Avant même la fin de la formation du tube neural dans la région la plus postérieure de l'embryon, la région antérieure va subir des changements morphologiques drastiques et donner naissance aux trois vésicules primaires que sont le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale (**Figure 3**). A l'heure où la région postérieure du tube neural se referme, certaines vésicules primaires se sont subdivisées et ont donné naissance à des structures secondaires. Ainsi, le prosencéphale s'est subdivisé en télencéphale (à l'origine des hémisphères cérébraux) et diencéphale (qui formera la vésicule optique et initiera le développement des yeux). Le rhombencéphale s'est quant à lui divisé en métencéphale (à l'origine du développement du cervelet et du tronc cérébral) et en myélencéphale (qui donnera naissance au bulbe rachidien) (**Figure 3**). Enfin, la région plus postérieure du tube neural donnera naissance à la moelle épinière. Cette succession d'évènements morphogénétiques indique que la dynamique de formation des différentes régions est asynchrone le long de l'axe AP, les structures antérieures se différenciant plus rapidement que celles de la partie postérieure.

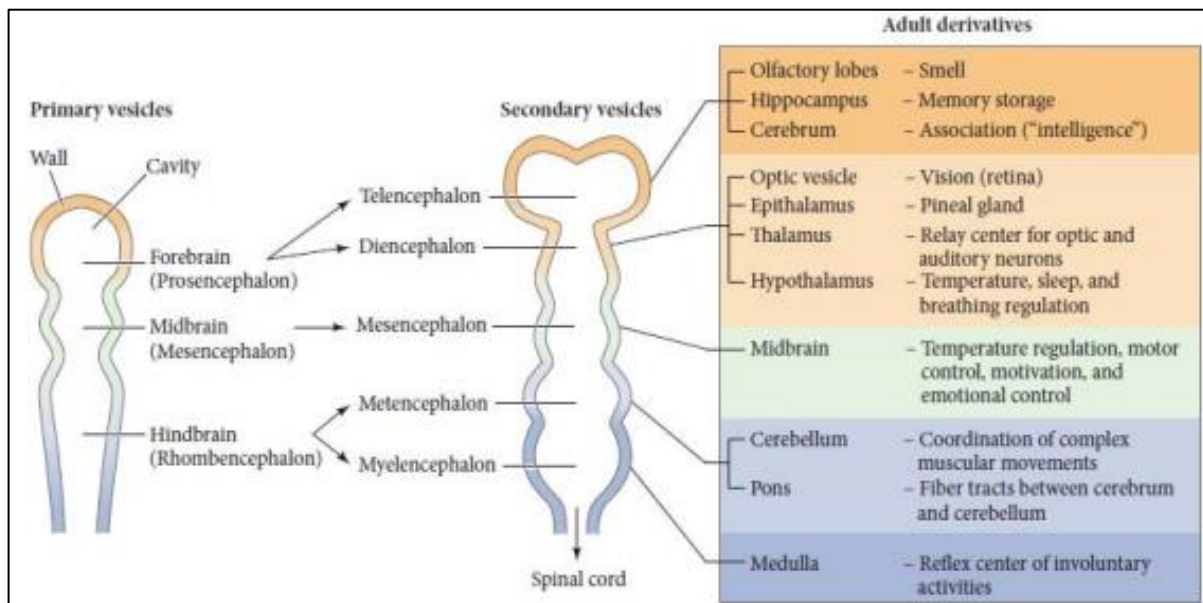


Figure 3 : Développement précoce du cerveau, formation des premières cavités cérébrales et évolution vers les structures adultes. Représentation schématisée des trois vésicules primaires (gauche), leur évolution vers les structures secondaires (milieu) puis vers les structures adultes (droite). Les structures adultes sont accompagnées d'une liste des fonctions principales exercées par les différentes régions. - d'Après Gilbert, 2019

En plus de cette différence de temporalité, le cortex cérébral et la moelle épinière sont deux exemples bien étudiés de structures dont l'évolution morphogénétique au cours du développement est extrêmement différente. Alors que le cortex évolue d'une structure relativement simple en forme de tube vers une structure d'une complexité aussi stupéfiante que prodigieuse, la moelle épinière embryonnaire subit « simplement » une augmentation de volume sans changement de forme spectaculaire. Par conséquent, l'on peut supposer également que les dynamiques de production des différents types de neurones générés devraient aussi être différentes entre les deux régions.

B.1 - La formation du cortex cérébral

Le cortex cérébral, siège de nos capacités cognitives supérieures, est constitué de 130 à 200 milliards de cellules dont environ 80 milliards sont des neurones, 60 milliards des cellules gliales et 20 milliards des cellules endothéliales (Azevedo et al., 2009; von Bartheld, 2018; von Bartheld et al., 2016). Les neurones s'organisent selon des circuits fonctionnels extrêmement complexes et précis, mais également remarquablement plastiques. Le cortex cérébral est donc certainement et de loin la structure biologique la plus complexe et organisée de notre organisme.

La neurogenèse au sein du cortex cérébral se déroule sur une période temporelle assez longue, qui peut représenter jusqu'à 30 - 50% du temps de gestation selon les espèces (Rakic, 1974; Takahashi et al., 1999). Ce processus commence avec la spécification du tube neural et l'apparition des vésicules télencéphaliques (Bishop et al., 2000; Sur and Rubenstein, 2005 - **Figure 3**). A ce stade, l'épithélium du tube neural est constitué d'une simple couche pseudostratifiée de cellules progénitrices, appelées cellules souches neuroépithéliales (CSNEs). Ces cellules sont caractérisées par deux prolongements cytoplasmiques en direction de la surface apicale du tube neural pour l'un, et pour l'autre de la lame basale (Sidman and Rakic, 1973). Les CSNEs sont reliées entre elles au niveau de la surface apicale, par des jonctions serrées et d'adhérence entre les prolongements apicaux (Taverna et al., 2014). Par ailleurs, les CSNEs présentent une polarité apico-basale, à laquelle est associée leur caractéristique la plus étonnante : le mouvement intercinétique du noyau (INM – Interkinetic Nuclear Migration - **Figure 4**). En parallèle de leur progression dans le cycle cellulaire, le noyau des CSNEs se déplace le long de l'axe apico-basal. Au cours de la phase G1, le noyau migre vers la zone basale, où il restera localisé lors de la phase S. Il revient vers la surface apicale lors de la phase G2, et les cellules finissent par se diviser au niveau de la surface apicale du tube neural (Sidman and Rakic, 1973; Takahashi et al., 1995a, 1995b, 1993). L'asynchronisme (au regard de la progression dans le cycle cellulaire) des nombreuses CSNEs réalisant l'INM confère ainsi un aspect pseudostratifié à l'épithélium (**Figure 4**). Cet INM est conservé du point de vue de l'évolution chez les vertébrés, avec cependant des différences au niveau de la densité cellulaire et de l'épaisseur de l'épithélium entre les espèces (Miyata et al., 2014).

Au sein de l'épithélium en développement et après quelques séries consécutives de divisions symétriques prolifératives (une CSNE se divise et donne naissance à deux CSNEs), les CSNEs vont subir une série de changements (perte des jonctions serrées et expression de marqueurs moléculaires spécifiques tels que les facteurs de transcription (FTs) Pax6 et GFAP- Götz and Huttner, 2005) et devenir des cellules apicales de glie radiaire (aRGs - apical Radial Glial cells). Tout comme les CSNEs, les aRGs présentent une polarité apico-basale, émettent deux prolongements cytoplasmiques (Sidman and Rakic, 1973), réalisent l'INM (avec une amplitude de migration restreinte à la région apicale proche de la surface ventriculaire - Haubensak et al., 2004; Noctor et al., 2004) et se divisent à la surface apicale. Il y a 20 ans, grâce aux travaux pionniers de Noctor et collaborateurs, ces cellules progénitrices aRGs ont été identifiées comme des cellules souches multipotentes, capables de générer progressivement l'ensemble des types de neurones excitateurs du cortex (Noctor et al., 2001). Au cours des dernières années, de nouveaux travaux ont apportés quelques nuances à cette vision initiale d'un progéniteur multipotent donnant naissance à l'ensemble des neurones excitateurs en introduisant la notion (parfois controversée) de progéniteurs donnant naissance à une sous population spécifiques de neurones (revue dans Fischer and Morin, 2021, qui n'abordent pas la question des cellules épendymaires et des cellules souches adultes). Des travaux récents, utilisant un modèle

mathématique incorporant des règles pour des choix stochastiques au cours de la neurogenèse, ne pouvait pas expliquer toutes les possibles combinaisons générées à partir d'une seule population progénitrice. A l'inverse, un autre modèle basé sur deux populations de progéniteurs, l'une multipotente et l'autre plus restreinte (donnant naissance à des neurones appartenant seulement à certaines couches spécifiques), récapitule plus fidèlement la production des six couches de neurones (Llorca et al., 2019).

La transition CSNEs → aRGs marque le véritable début de la neurogenèse corticale. Initialement, les progéniteurs aRGs réalisent des divisions symétriques prolifératives, dans le but d'amplifier la réserve de cellules progénitrices. Progressivement, une petite partie des aRGs vont commencer à s'engager dans la production neurogénique à travers la réalisation de divisions asymétriques neurogéniques (Attardo et al., 2008; Noctor et al., 2004, 2001). Dans le cortex en développement, les divisions asymétriques neurogéniques peuvent conduire à la production d'un aRG et d'un neurone (neurogenèse directe) ou d'un aRG et d'un progéniteur intermédiaire (neurogenèse indirecte) (Attardo et al., 2008; Noctor et al., 2004, 2001). Ces progéniteurs intermédiaires (au potentiel prolifératif moindre que les aRGs) donneront naissance à leur tour à des neurones directement ou après un autre cycle prolifératif. Avec la progression dans la neurogenèse, les aRGs adoptent massivement l'utilisation du mode asymétrique neurogénique. Vers la fin du processus de neurogenèse, la plupart des progéniteurs aRGs changent à nouveau de mode de division (MDD) et réalisent des divisions symétriques terminales donnant exclusivement naissance à des neurones ou progéniteurs intermédiaires, ce qui a pour conséquence un épuisement partiel de la réserve de progéniteurs (les progéniteurs restant entreront dans le processus de gliogenèse et généreront les différents types de cellules gliales).

Les neurones générés séquentiellement au cours de cette période vont migrer à travers l'épithélium le long du pied basal des aRGs, où ils s'établiront selon des couches successives dans la zone marginale. Les premiers neurones générés sont destinés à former la couche la plus superficielle du cortex (couche n°1). Les neurones générés par la suite participeront à la formation de la couche la plus profonde (couche n°6), puis la couche supérieure (couche n°5) et ainsi de suite jusqu'à la formation de la couche la plus superficielle (couche n°2). Cette séquence temporelle de formation du cortex par empilement successif des couches est appelée formation « inside-out » du cortex (Hansen et al., 2017).

Au cours de l'évolution, des différences majeures de volume et de morphologie du cortex sont observées entre différentes espèces. De façon schématique, les espèces lissencéphaliques (telles que la souris ou le rat) ont un néocortex petit et lisse, alors que les espèces gyrencéphaliques (telles que l'Homme et le macaque) présentent un cortex qui s'est fortement étendu selon l'axe tangentiel, ce qui a conduit à son repliement (gyrification) permettant une forte augmentation de la surface corticale sans gain de volume. Ainsi, la gyrification semble être une solution évolutive à la croissance exceptionnelle du cortex et à la nécessité d'accueillir des neurones supplémentaires. Outre l'augmentation de la surface, l'expansion corticale concerne également une augmentation de l'épaisseur du tissu. Cette augmentation de l'épaisseur est considérée comme le facteur clé de l'expansion évolutive du cortex, et est sous-tendue par plusieurs facteurs : une capacité de production neurogénique accrue des cellules progénitrices neurales, principalement liée à un large panel de progéniteurs intermédiaires ; et un allongement de la période neurogénique (Gilardi and Kalebic, 2021).

Les progéniteurs intermédiaires sont produits dans la zone ventriculaire (VZ) à partir des aRGs, et s'établissent dans la zone sous-ventriculaire (SVZ - SubVentricular Zone – **Figure 4**) localisée sous la VZ (Miyata et al., 2004; Takahashi et al., 1996, 1995b). La SVZ étant plus basale que la VZ, les premiers progéniteurs intermédiaires identifiés et caractérisés ont été appelés progéniteurs basaux (Miyata et al., 2004; Noctor et al., 2008, 2004). Les progéniteurs basaux partagent des points communs avec les progéniteurs aRGs, tels que l'expression du FT Pax6 et l'extension d'un prolongement cytoplasmique contactant la membrane basale (Reillo et al., 2011; Wang et al., 2011). Cependant, les progéniteurs basaux ne possèdent pas d'extension cytoplasmique contactant la surface apicale, se divisent au sein de la SVZ, et ne réalisent pas le mouvement intercinétique du noyau. Chez les espèces lissencéphaliques, la présence de progéniteurs basaux est assez rare, et les progéniteurs présents ont un potentiel neurogénique élevé et un potentiel d'auto-renouvellement extrêmement limité (Shitamukai et al., 2011; Wang et al., 2011). A l'inverse, chez les espèces ayant un volume du cortex plus important et une morphologie plus repliée, les progéniteurs basaux sont beaucoup plus abondants et possèdent un fort potentiel d'auto-amplification (Betizeau et al., 2013; Martínez-Martínez et al., 2016).

Etant donné la prédominance du mode indirect de production neurogénique chez les espèces gyrencéphaliques, l'épaisseur de la SVZ sera beaucoup plus importante dans celles-ci comparée à celle des espèces lissencéphaliques. Une autre différence majeure entre espèces gyrencéphaliques et lissencéphaliques se trouve être la diversité des progéniteurs intermédiaires dans la SVZ. Le répertoire de progéniteurs intermédiaires identifiés s'est largement enrichi ces dernières années et l'identification de nouveaux sous-types se poursuit en particulier dans les espèces gyrencéphales les plus évoluées, comme le macaque et l'homme (**Figure 4**).

Ont été notamment caractérisées les cellules progénitrices subapicales (saPCs = subapical Progenitor Cells - **Figure 4**) possédant un prolongement cellulaire apical similaire à celui des aRGs, mais réalisant leur mitose au milieu de la VZ. Elles sont assez peu retrouvées dans le cortex d'espèces lissencéphaliques, mais sont plus abondantes dans les cortex en développement d'espèces gyrencéphaliques, indiquant un rôle potentiel dans l'expansion et le repliement du cortex (Borrell and Götz, 2014; Pilz et al., 2013). D'autres types de progéniteurs basaux caractérisés sont, par exemple, les bRGs (basal Radial Glial cells – **Figure 4**) ou bien encore les transit-amplifying progenitors (TAPs) (Taverna et al., 2014)

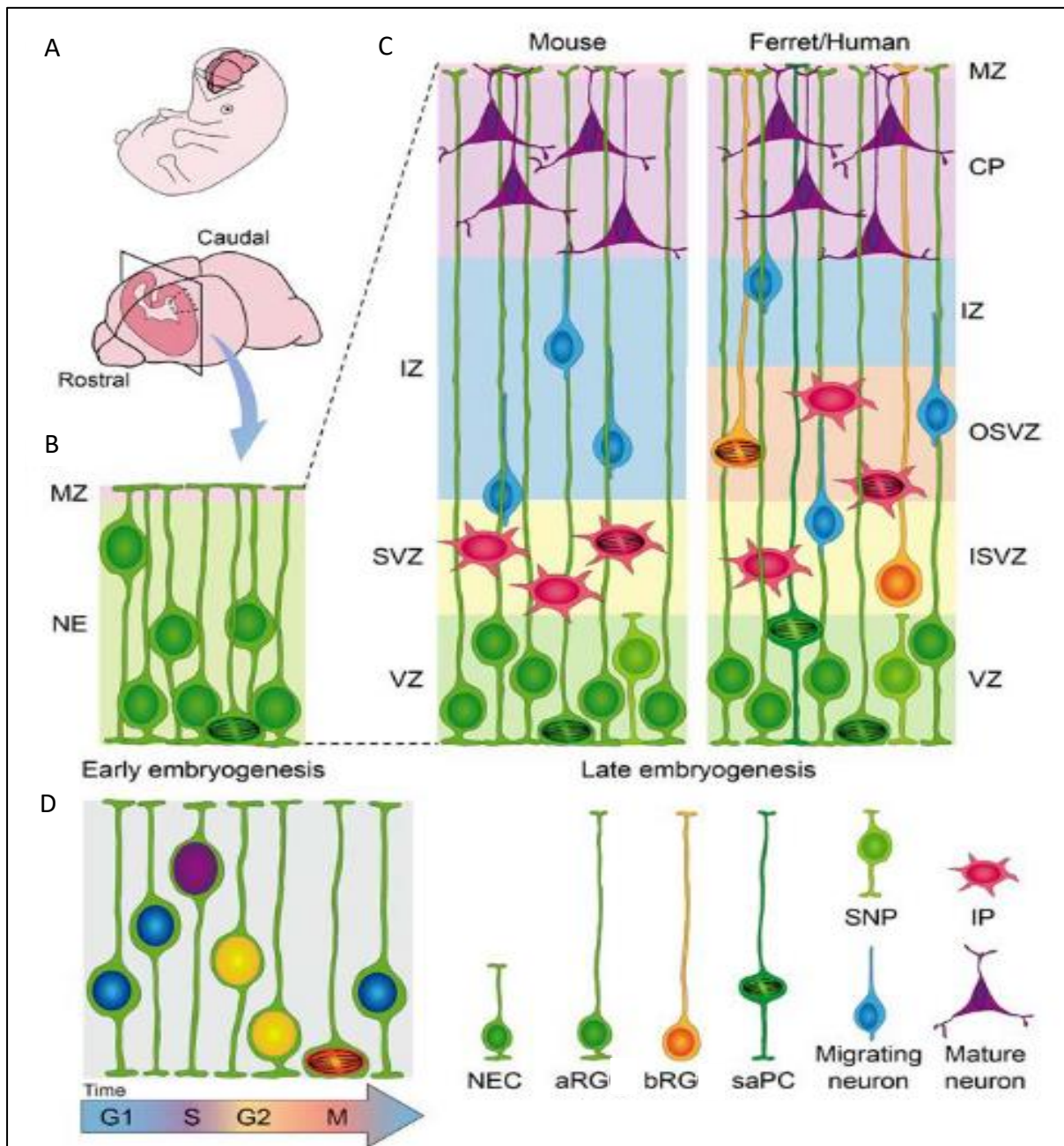


Figure 4 : Développement cortical des mammifères et composants cellulaires. (A) Représentation schématique d'un embryon de mammifère et d'une coupe coronale à travers le télencéphale (rose foncé). (B, C) Structure et types de cellules du primordium cortical aux stades précoce (B) et tardif (C) du développement. Le neuroépithélium pseudostratifié (NE) est formé de cellules souches neuroépithéliales (NEC). Aux stades tardifs, on peut distinguer plusieurs couches germinales (VZ, SVZ) et post-mitotiques (IZ, CP, MZ), qui sont plus spécialisées dans le repliement du cortex chez des espèces tels que le furet et l'Homme que dans le cortex lisse de la souris. Alors que les principaux composants cellulaires sont très similaires, l'abondance des progéniteurs basaux est plus importante chez le furet et l'Homme. (D) Schéma de la migration nucléaire intercinétique se produisant parallèlement aux phases du cycle cellulaire. aRG, cellule de glie radiale apicale ; bRG, cellule de glie radiale basale ; saPC, cellule progénitrice subapicale ; SNP, précurseur neuronal court ; IP, progéniteur intermédiaire ; VZ, zone ventriculaire ; SVZ (externe et interne), zone sous-ventriculaire ; IZ, zone intermédiaire ; CP, plaque corticale ; MZ, zone marginale. – Adapté de Villalba et al, 2021.

B.2 - La formation de la moelle épinière

La moelle épinière adulte des vertébrés remplit plusieurs fonctions. La plus évidente est la transmission des messages nerveux entre la périphérie de l'organisme et le cerveau. Les informations sensorielles sont reçues par les racines nerveuses dorsales et transmises au cerveau, tandis que les instructions motrices sont transmises du cerveau vers les motoneurones, qui sont connectés aux muscles (**Figure 5**). La moelle épinière peut également gérer des activités réflexes telles que les réactions de fuite et retrait, et abritent des réseaux locomoteurs spinaux qui gèrent des activités motrices rythmiques (exemple : la respiration - Ashwell, 2009).

La moelle épinière se développe à partir de la région postérieure du tube neural. Avec le début de la neurogenèse, les progéniteurs aRGs remplacent les CSNEs et entrent dans une phase de production neurogénique, qui est essentiellement directe dans la moelle. Les futurs neurones migrent et sortent de la VZ pour former une seconde couche autour du tube neural d'origine. Cette couche va s'épaissir au fur et à mesure que de nouvelles cellules y migrent et s'y établissent, et devient la zone intermédiaire (IZ - Intermediate Zone – **Figure 4**) ou zone du manteau. Les cellules de l'IZ vont initialement se différencier en neurones lors de la neurogenèse, puis en cellules gliales à des stades plus tardifs lors du processus de gliogenèse. Les neurones vont projeter leurs axones en dehors de l'IZ, créant ainsi une troisième zone appelée zone marginale (MZ - Marginal Zone – **Figure 4**), pauvre en corps cellulaires. Ce patron en 3 zones (VZ, IZ, MZ) est à l'origine du développement de la moelle épinière, mais également de toutes les autres régions du SNC en développement (notamment du cortex) et évolue différemment selon les régions

Concernant la moelle épinière, ce patron en 3 zones sera maintenu tout au long de son développement. En coupe transversale, la zone du manteau adopte progressivement une structure en forme d'aile de papillon, et est entourée de la zone marginale (ou substance blanche) constituée des axones de projection des neurones dont les corps cellulaires résident dans la zone du manteau. Ces deux régions deviennent enveloppées de tissu conjonctif. Au fur et à mesure de la maturation du tube neural, un sillon longitudinal appelé sulcus limitans, divise le tube en deux moitiés, l'une ventrale et l'autre dorsale (**Figure 4**). La partie dorsale reçoit des informations des neurones sensoriels, alors que la partie ventrale est impliquée dans l'exécution de diverses fonctions motrices (Gilbert, 2019 – **Figure 5**).

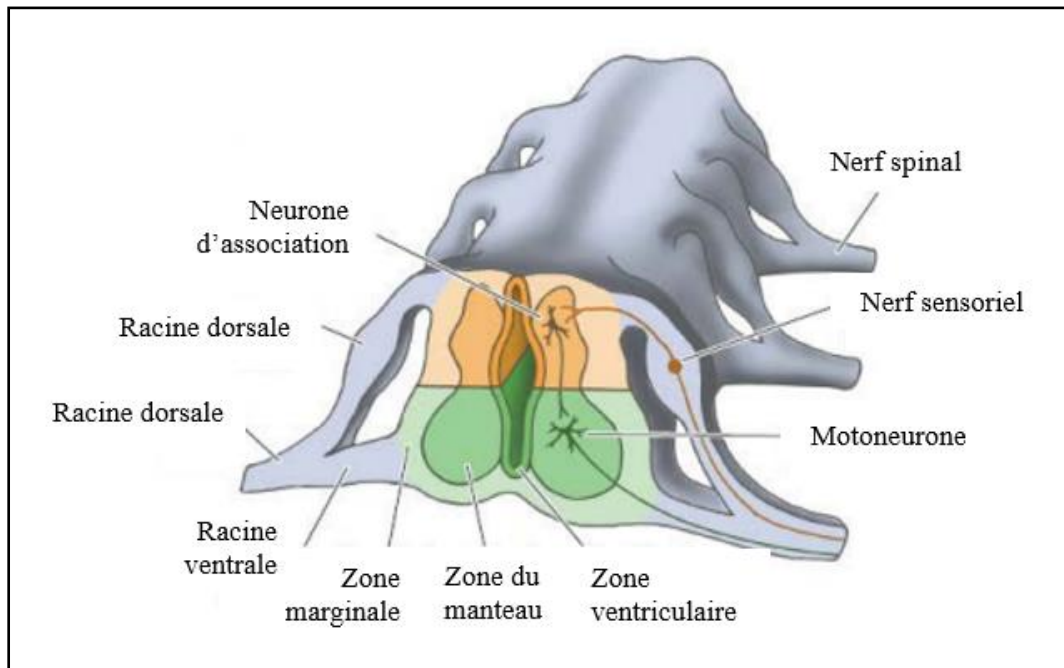


Figure 5 : Un segment de la moelle épinière avec ses racines sensorielles (dorsales) et motrices (ventrales). Le tube neural est fonctionnellement divisé en régions dorsale et ventrale, séparées par le sulcus limitans. Au fur et à mesure que les cellules des somites adjacents forment les vertèbres, le tube neural se différencie en zones ventriculaire, du manteau et marginale. Le sulcus limitans sépare la partie dorsale (alaire ; jaune) de la moelle épinière qui reçoit les informations sensorielles et la partie ventrale (basale ; verte), qui projette les informations vers les neurones moteurs. - d'Après Gilbert, 2019

Partie C : Mécanismes d'acquisition de l'identité cellulaire au cours de la neurogenèse

Au cours du développement embryonnaire, l'acquisition de la structure complexe du SNC repose sur la production séquentielle puis l'organisation en réseaux d'une grande diversité de populations neuronales et gliales, produites à partir d'un nombre restreint de progéniteurs neuronaux. Malgré d'impressionnants progrès réalisés ces dernières années, la compréhension des mécanismes régulant la production de cette diversité de progéniteurs (et leur différenciation en neurones) dans des schémas spatiaux hautement organisés reste toujours limitée. Les multiples types de neurones composant la moelle épinière étant produits par un mode direct de neurogenèse (sans progéniteurs intermédiaires) selon des mécanismes similaires à ceux dans le cortex, j'utiliserai majoritairement ce modèle simplifié dans la suite de ce paragraphe pour aborder la question des mécanismes contrôlant l'acquisition de l'identité cellulaire.

C.1 - Mécanismes extrinsèques d'acquisition de la diversité des progéniteurs et des neurones : le patterning antéro-postérieur et dorso-ventral de la moelle épinière

La caractérisation de la moelle épinière adulte via des critères morphologiques, moléculaires, de connectivité neuronale et de projection des axones a révélé une organisation « en modules », avec une position stéréotypée de types de progéniteurs et neurones spécifiques (Sagner and Briscoe, 2019). Au cours de la formation de la moelle épinière, des signaux morphogènes à longue portée émanant de différentes régions de l'embryon modèlent le tissu le long des axes DV et AP, en régulant le destin cellulaire par l'expression de facteurs de transcription.

Le long de l'axe DV, ce sont les morphogènes Sonic Hedgehog (Shh) – produit par la plaque du plancher et la notochorde – et les Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) et Wnts – produits par la plaque du toit – qui modèlent le tissu. La voie Shh s'appuie sur la liaison d'un ligand activateur (Shh) à des récepteurs protéiques appelés Patched 1 (PTCH1) et Smoothed (SMO). En l'absence du ligand Shh, le récepteur membranaire PTCH1 joue un rôle de répresseur en inhibant l'activité de SMO. En présence de Shh, le récepteur PTCH1 est internalisé et déstabilisé. En absence d'activité inhibitrice, SMO peut activer l'expression des facteurs de transcription GLI, régulateur de l'activité de nombreux gènes (dont les FTs GLI et le récepteur PTCH1, mais également des régulateurs du cycle cellulaire tel que cycline D1 - Watson et al., 2010). La voie BMP nécessite quant à elle la liaison d'un ligand BMP à l'un de ses récepteurs membranaires, ce qui entraîne la phosphorylation des effecteurs SMAD1/5, qui s'associent par la suite à SMAD4 pour activer la transcription de gènes cibles (notamment les gènes de la famille ID - Cardozo et al., 2017)

A travers les gradients de ces morphogènes s'établit un code de facteurs de transcription, définissant 11 domaines de progéniteurs neuronaux moléculairement distincts (six domaines dorsaux et cinq domaines ventraux), chacun d'entre eux donnant naissance à un ou plusieurs types de neurones spécifiques (Alaynick et al., 2011; Lu et al., 2015 - **Figure 6**). Au cours de la progression temporelle dans la neurogenèse, les progéniteurs localisés dans les différents domaines se spécifient progressivement, et donnent naissance aux types correspondant de neurones (Sagner and Briscoe, 2019).

Etant donné que l'expression combinatoire de ces différents facteurs de transcription définit l'identité neuronale et/ou progénitrice, leur expression est régulée de manière fine. Ainsi, les différents facteurs forment des réseaux de régulation génique et se contrôlent mutuellement pour délimiter précisément les différents domaines (Oosterveen et al., 2013; Peterson et al., 2012). Au cours de la croissance du tissu, ces réseaux de régulation génique permettent d'assurer le maintien des différents domaines progéniteurs, et les tailles relatives des différents domaines sont déterminés par les taux de prolifération et différenciation neuronale propres à chaque région (Kicheva et al., 2014).

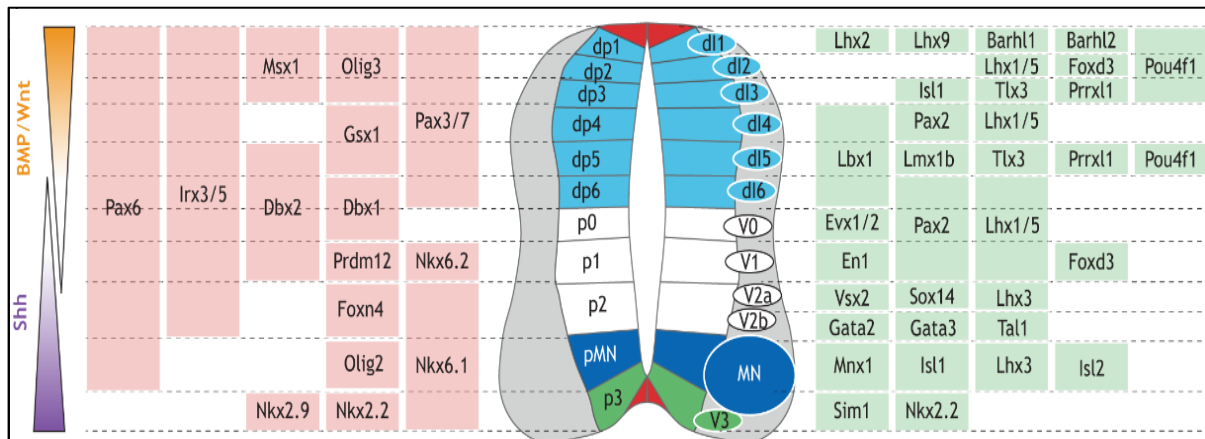


Figure 6 : Des gradients opposés de morphogènes structurent la moelle épinière le long de l'axe dorso-ventral. Coupe transversale schématisique d'une moelle épinière embryonnaire. Des gradients opposés de morphogènes délimitent des domaines d'expression de facteurs de transcription (FTs) spécifiques (boîtes roses) le long de l'axe DV. La co-expression des FTs définit 11 domaines distincts de progéniteurs neuronaux (p3, pMN, p0-p2, dp1-dp6) le long de l'axe DV. Chacun de ces domaines progéniteurs donne naissance à des sous-types neuronaux distincts (V3, MN, V0-1, V2a et b, dI1-dI6) caractérisés par l'expression de FTs spécifiques (boîtes vertes). – d'Après Sagner et Briscoe, 2019

Le long de l'axe antéro-postérieur, l'acquisition de l'identité est régulée par l'expression de gènes appartenant à la famille Hox, qui subdivisent la moelle épinière en trois grands domaines : les gènes Hox4 -7 définissent les identités cellulaires (progéniteurs et neurones) cervicales, les gènes Hox9 les identités thoraciques ; et les gènes Hox10-11 les identités lombaires (Sagner and Briscoe, 2019 - **Figure 7**). L'établissement du patron et le maintien de l'expression des différents gènes Hox le long de l'axe AP est un processus extrêmement complexe, régulé par plusieurs signaux d'origine extrinsèque.

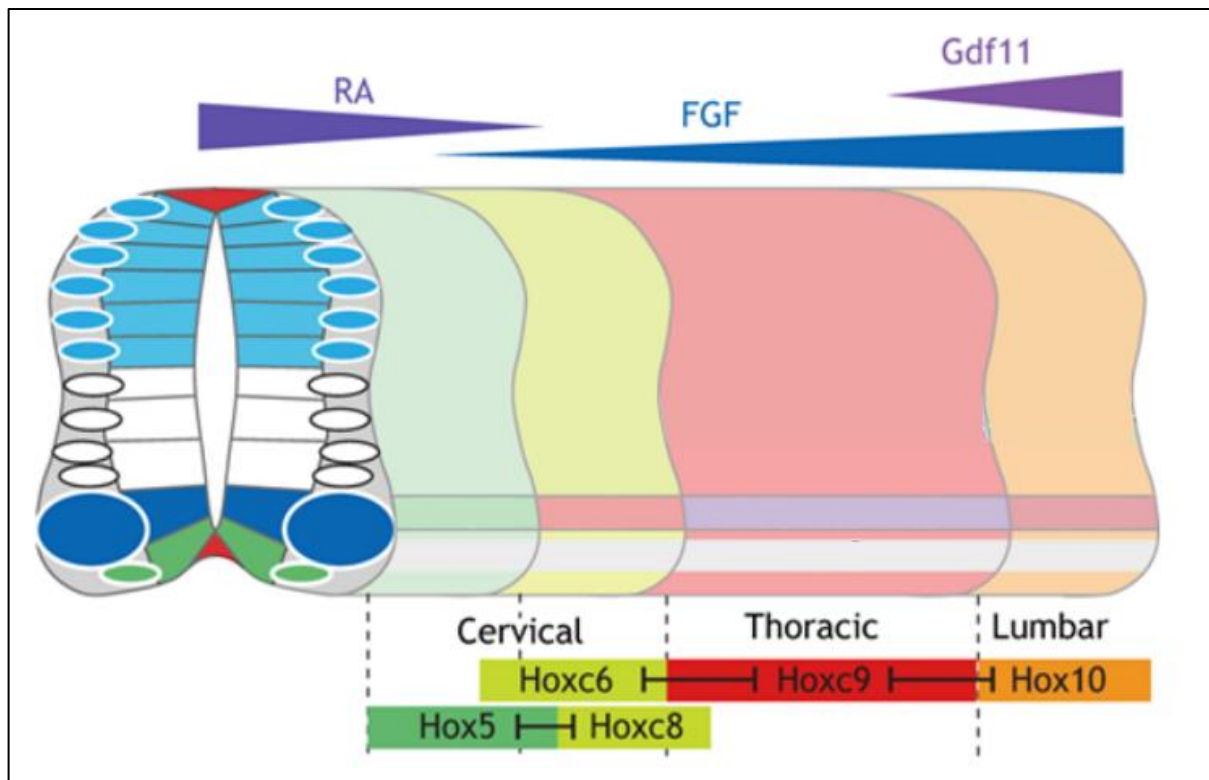


Figure 7 : Les gènes Hox structurent la moelle épinière le long de l'axe AP. Des gradients opposés de morphogènes induisent l'expression des gènes Hox selon des patrons différents le long de l'axe AP de la moelle épinière. Des jeux de régulations croisées entre les gènes Hox délimitent des domaines distincts, au sein desquels sont produits des types de progéniteurs et neurones spécifiques. – Adapté de Sagner et Briscoe., 2019

Parmi ces signaux, les protéines de la famille Wnts, impliquées entre-autre dans la spécification de la partie postérieure de l'embryon chez les organismes bilatériens, participent à l'activation précoce des gènes de la famille Hox. Les principales molécules contrôlant l'expression des gènes Hox sont l'acide rétinoïque (RA, pour Retinoic Acid) et les protéines de la famille FGF (Fibroblast Growth Factor). L'acide rétinoïque est sécrété depuis les somites nouvellement formés, donc plutôt dans la région antérieure de l'embryon et agit dans le noyau des cellules par association avec ses récepteurs RAR (Retinoic Acid Receptor) et RXR (Retinoid X Receptor) pour initier la transcription des gènes Hox (Cardozo et al., 2017). Les FGFs sont eux produits dans la région postérieure et sont capables de déclencher l'activation de multiples autres voies de signalisation (FRS2-Ras, MAPK, PLC γ -NFAT et PI3K-AKT) par liaison avec leurs récepteurs (FGFR - Cardozo et al., 2017). Initialement, les cellules évoluent dans un environnement riche en FGFs et Wnts/faible en RA, qui permet le maintien des cellules dans un état progéniteur. Avec le début de la somitogenèse et de l'allongement de l'embryon selon l'axe AP, les cellules évoluent vers un environnement riche en RA/faible en FGF et Wnts, qui promeut la compétence des progéniteurs neuraux à répondre aux signaux BMPs et Shh dorso-ventraux (**Figure 7**).

C.2 - Mécanismes intrinsèques d'acquisition d'identités progénitrices et neuronales spécifiques : les facteurs de transcription

Les facteurs de transcription sont les principaux acteurs de l'établissement de la diversité neuronale. Leur rôle dans l'acquisition d'identités neuronales spécifiques a été particulièrement bien étudié dans la région postérieure du tube neural en développement. En effet, de nombreuses études ont montré que les différents domaines composant le tube neural caudal en développement sont définis par des combinaisons d'expression spécifiques de FTs (appartenant principalement aux familles Homeobox et basic Helix-Loop-Helix (bHLH) - Lai et al., 2016) et donnent naissance à des populations spécifiques de neurones (**Figure 7**). Ces FTs ne sont pas de simples « marqueurs » d'identité progénitrice ou neuronale, mais sont activement requis pour l'acquisition de l'identité du lignage au sein duquel ils sont exprimés. Par exemple, les facteurs bHLH tels qu'Atoh1, NeuroG1/G2, Ascl1 et Ptf1a sont tous nécessaires et suffisants pour spécifier l'acquisition de populations particulières d'interneurones dorsaux (Lai et al., 2016).

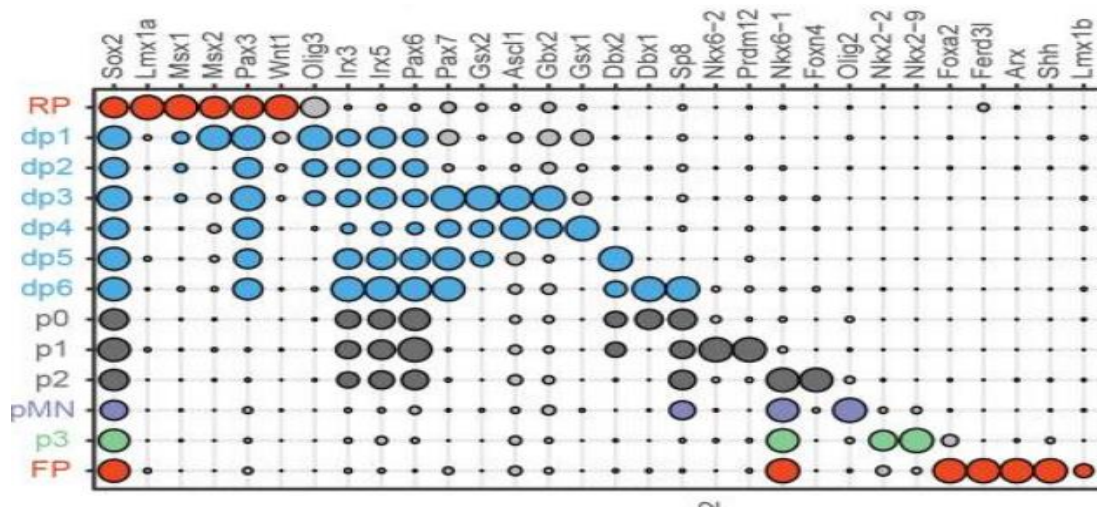


Figure 8 : Identification des différentes populations progénitrices composant les différents domaines de la moelle épinière de souris en développement par scRNA-seq. Représentation sous forme de graphique à bulles illustrant les différentes populations progénitrices de la moelle épinière murine en développement, identifiées par l'expression de combinaisons spécifiques de FTs. La taille des cercles indique les niveaux d'expression génique normalisés. Les FTs sélectionnés pour la catégorisation des cellules sont colorés ; les cercles gris correspondent aux marqueurs non utilisés pour la sélection d'une population spécifique. – Adapté de Delile et al., 2019

Plus récemment, l'avènement des techniques de séquençage de l'ARN à l'échelle cellulaire (scRNA-seq) a permis d'atteindre un nouveau niveau de résolution dans le déchiffrement de la diversité neuronale, par la description des profils transcriptomiques de nombreux types cellulaires et dans de nombreuses espèces. Une confirmation importante de ces études est que, dans la grande majorité des cas, des transcriptomes bien définis correspondent à des identités neuronales spécifiques. En d'autres termes, il n'existe pas un continuum de profils d'expression transcriptomiques variant « légèrement » entre les types de neurones, mais plutôt des états transcriptionnels distincts (Cao et al., 2017; Taylor et al., 2021; Zeisel et al., 2018). Dans un contexte de neurogenèse embryonnaire, c'est ce qu'observe Delile et collaborateurs, qui ont généré un atlas d'expression génique des régions cervicales et thoraciques du tube neural murin en développement à différents stades (E9.5 / E10.5 / E11.5 / E12.5 / E13.5 - Delile et al., 2019).

L'analyse des profils transcriptomiques révèle des profils très dissemblables entre les différentes populations, qu'elles soient progénitrices ou neuronales (**Figure 8**).

C.3 - Progression temporelle des progéniteurs et restriction du potentiel

Au cours du développement, la compétence des progéniteurs neuraux pour la génération des différents types de neurones puis cellules gliales évolue, et permet la génération séquentielle des différentes identités cellulaires dans un ordre précis. Ce processus développemental est appelé **patterning temporel** (Pearson and Doe, 2004).

Chez la drosophile, ce **patterning temporel** des progéniteurs neuraux (appelés neuroblastes) a été étudié dans différentes régions du système nerveux en développement, dans lequel deux mécanismes principaux gouvernent sa régulation. La première composante de régulation temporelle est opérée par des cascades de facteurs de transcription. Différents FTs sont exprimés de façon séquentielle dans les neuroblastes au cours d'une période donnée, pendant laquelle ils participent à l'acquisition d'identités neuronales spécifiques (Doe, 2017 - **Figure 9**). L'évolution temporelle des cascades est principalement contrôlée par des activités de régulation entre les différents facteurs de transcription. Dans certaines régions et/ou certains types de neuroblastes, ces processus de régulations croisées entre les différents FTs sont plus complexes et permettent d'augmenter le nombre de fenêtres temporelles présentant des profils combinatoires spécifiques de FTs, ce qui contribue davantage à la diversification des types de neurones.

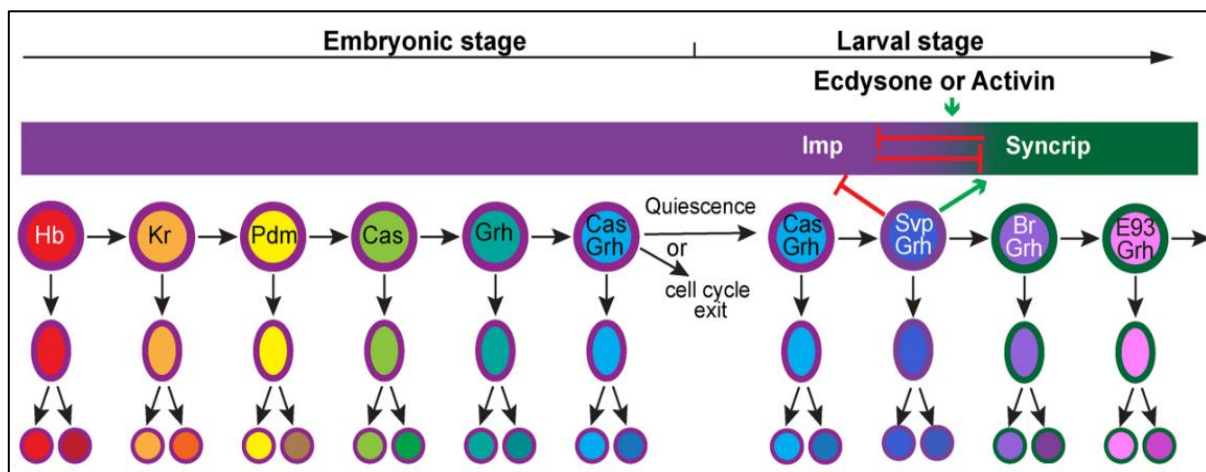


Figure 9 : Patterning temporel des neuroblastes embryonnaires et larvaires de type I du cerveau et de la corde neurale ventrale (VNC) de la drosophile. Les neuroblastes embryonnaires expriment séquentiellement les FTs Hb → Kr → Pdm → Cas → Grh, qui contrôlent la spécification du destin de la progéniture en fonction de l'ordre de naissance. Ce modèle est simplifié et généralisé, car il existe de légères variations du schéma temporel dans les différentes lignées de neuroblastes. - Adapté de Ray et al., 2017

La seconde composante consiste en la mise en place de gradients opposés de protéines se liant à l'ARN (RBPs - RNA-Binding Proteins) dans les neuroblastes au cours de leur développement. Dans les neuroblastes de type I et II, les protéines Imp (IGF-II mRNA binding protein) et Syncrip (Synaptotagmin Binding Cytoplasmic RNA Interacting Protein) sont exprimées selon un gradient temporel : Imp est exprimée fortement dans les jeunes neuroblastes, et son expression diminue au fur et à mesure du temps ; Syncrip est quant à elle exprimée de manière croissante et atteint un niveau maximum dans les neuroblastes tardifs (**Figure 9**). Ces deux protéines régulent la production d'identités neuronales spécifiques par contrôle de l'expression génique (Liu et al., 2015). Ces deux composantes peuvent agir ensemble ou séparément dans le but de contrôler la génération séquentielle des différents types de neurones (Maurange, 2020).

Au cours de la neurogenèse des vertébrés, de nombreuses études ont montré que ce patterning temporel existe également dans les progéniteurs neuronaux aRGs, les progéniteurs de la rétine et de la moelle épinière au cours de leur développement.

Dans la rétine, les différents types neuronaux apparaissent selon un ordre stéréotypé. Des études d'analyse de lignage *in vivo* ont montré que les cellules progénitrices de la rétine (RPCs, pour Retina Progenitor Cells) sont capables de générer les différents types cellulaires composant la rétine, mais que la taille des clones et leur composition est hautement variable. Dans ce contexte, il a été montré que le facteur de transcription Ikzf1 (Ikaros – homologue du facteur Hunchback de la drosophile) est exprimé dans toutes les RPCs précoces et disparaît dans les progéniteurs tardifs. De plus, l'expression d'Ikzf1 est suffisante pour déclencher la production des premiers types de neurones de la rétine (tels que les neurones horizontaux et amacrines), et la perte de son expression entraîne une diminution de la production de ces types cellulaires précoces. D'autres études ont permis d'identifier d'autres facteurs homologues de la drosophile, tels que Casz1 (homologue de Castor) et Pou2f1/Pou2f2 (homologue de Pdm). Cependant, au contraire du processus observé chez la drosophile, les différents facteurs de transcription sont exprimés dans la rétine sur des intervalles chevauchants. Ceci a notamment été montré par des analyses RNA-seq à l'échelle cellule-unique des progéniteurs murins et humains de la rétine au cours du développement, qui ont seulement permis de faire apparaître une ségrégation claire entre progéniteurs neurogéniques précoces et tardifs. Une autre différence avec la drosophile est que la perte d'un régulateur dans les RPCs n'entraîne pas de changements majeurs dans la génération des différents types cellulaires précoces et tardifs ; ceci semble indiquer que des facteurs et/ou mécanismes supplémentaires participent au contrôle de ce patterning temporel.

Dans le néocortex de souris, l'existence d'un patterning temporel au niveau des progéniteurs contrôlant l'acquisition d'identités neuronales successives a également été établi, grâce notamment à des études transcriptomiques à l'échelle cellule-unique. En combinant un marquage fluorescent *in vivo*, permettant le suivi de cohortes isochroniques de cellules filles issues de la division d'aRGs dans la VZ, à des analyses transcriptomiques à l'échelle cellule-unique, Telley et collaborateurs ont identifié et fonctionnellement caractérisés des programmes transcriptionnels « neurones-spécifiques » et observé leur mise en place progressive (Telley et al., 2016). Les résultats de cette étude révèlent l'existence de « vagues transcriptionnelles » contrôlant la séquence et le rythme de la différenciation neuronale. Dans des travaux plus récents par les mêmes auteurs, l'étude de plusieurs cohortes de progéniteurs marquées à des temps développementaux différents à l'aide de la même stratégie a permis l'identification d'un ensemble de gènes exprimés de manière séquentielle dans les progéniteurs au cours du développement (Telley et al., 2019). Au sein des progéniteurs précoces, des gènes impliqués

dans la régulation du cycle cellulaire, de l'état de la chromatine et de processus nucléaires sont exprimés de manière prépondérante, alors que les progéniteurs plus tardifs sont caractérisés par l'expression de gènes impliqués dans la réponse aux signaux extérieurs. Ceci indique que les progéniteurs évoluent d'un état intéroceptif vers un état extéroceptif. Au cours de leur progression dans la neurogenèse, ces différents profils transcriptomiques des aRGs sont transmis à leur descendance et constituent une signature transcriptionnelle de la « date de naissance », sur laquelle des programmes de différenciation générique et des signaux environnementaux vont venir se greffer pour sculpter les différentes identités neuronales.

Dans la moelle épinière en développement, l'étude transcriptomique en cellule unique des progéniteurs montre également l'existence d'un processus de patterning temporel des progéniteurs au cours de la neurogenèse (Delile et al., 2019a; Sagner et al., 2021). Au sein des différents domaines de la moelle épinière, certains facteurs de transcription et RBPs présentent des profils d'expression similaires dans les progéniteurs neuronaux à un temps donné, suggérant que différentes populations neuronales générées au même stade de développement expriment des facteurs de transcription communs (Sagner et al., 2021). Ainsi, les neurones précoces expriment les facteurs de la famille *Onecut*, les neurones générés un peu plus tard partagent l'expression de *Pou2f2* et *Zfhx2-4*, et les neurones tardifs l'expression de *Nfia/b/x* et *Neurod2* et *6* (Delile et al., 2019a; Sagner et al., 2021). Parmi ces facteurs, il a notamment été montré que l'expression des FTs de la famille *Nfi* est nécessaire pour la transition de la neurogenèse vers la gliogenèse (Matuzelski et al., 2017).

Les premières études transcriptomiques mettent en lumière l'existence d'un phénomène de patterning temporel dans la moelle épinière. Ces travaux ont également mis en lumière de nombreux nouveaux gènes candidats participant potentiellement à ce processus. Leurs validations fonctionnelles permettront de déterminer un impact (ou non) sur l'acquisition d'identités neuronales spécifiques.

Partie D : Mécanismes de régulation de la prolifération VS différenciation

Les mécanismes étudiés au cours de la partie précédente permettent la génération de la diversité neuronale. Cependant, en amont des décisions d'engagement vers un type neuronal précis, la cellule doit faire un autre choix : continuer de proliférer ou se différencier. De façon très schématique, cette décision est contrôlée par une balance entre deux entités : les facteurs proneuraux et la voie de signalisation Notch. D'autres facteurs, notamment environnementaux influent également sur cette décision, et seront abordés dans la partie suivante. Bien souvent, la décision de rentrer dans un programme de différenciation est associée avec la sortie du cycle cellulaire, mais cela n'est pas toujours le cas. A travers quelques exemples, nous verrons que programmes de différenciation et de sortie de cycle ne sont pas toujours couplés.

D.1 - Les facteurs proneuraux

La spécification et la différenciation de la plupart des types de neurones s'appuient sur une classe de facteurs de transcription bHLH (basic Helix-Loop-Helix) appelés gènes proneuraux, caractérisés par des profils d'expression spécifiques dans les différents tissus (Bertrand et al., 2002).

Les gènes proneuraux se divisent selon deux sous-familles, sur la base de leur homologie avec les gènes proneuraux de la drosophile (organisme modèle dans lequel ils ont été découverts) : les gènes appartenant au complexe Achaete-scute (AS-C – *achaete*, *scute*, *lethal of scute*, *asense*) et les gènes en dehors du complexe (*atonal*, *cato*, *amos*) (Bertrand et al., 2002; García-Bellido and de Celis, 2009). Chez la drosophile, les gènes du complexe AS-C sont les facteurs clés du développement du SNC et du SNP (Cubas et al., 1991; García-Bellido and de Celis, 2009). L'expression de ces gènes définit des régions ectodermiques dont les cellules qui les composent auront un destin « par défaut » de précurseurs neuronaux, à moins d'une orientation vers une identité différente (via l'action de la voie de signalisation Notch par exemple) (Knust and Campos-Ortega, 1989; Simpson, 1990). *achaete*, *scute* et *lethal of scute* sont des gènes véritablement proneuraux, conférant une compétence pro-neuronale aux progéniteurs qui les expriment et conduira (ou non) à leur différenciation en neurones. *asense* est quant à lui un gène précurseur de neurones, exprimé après la prise de décision de l'engagement vers un destin neuronal. Chez les vertébrés, il n'existe qu'un seul homologue du complexe AS-C exprimé dans le système nerveux en développement : *Ascl1* (achaete-scute like 1). A l'inverse, le nombre de gènes bHLH apparentés au groupe *atonal/cato/amos* s'est fortement élargi chez les vertébrés (par rapport à la drosophile), et comprend les gènes proneuraux des familles Neurogénine (Ngn1/2/3), « Neurogenic Differentiation » (NeuroD1/2/4/6) et Olig (Olig1/2/3) (Bertrand et al., 2002; Ross et al., 2003).

Les gènes proneuraux sont définis comme étant à la fois nécessaires et suffisants pour assurer l'activation de programmes génériques de différenciation neuronale (et parfois gliale), tout en spécifiant des identités neuronales spécifiques (Bertrand et al., 2002). La définition de gène proneural peut également être élargie pour inclure la capacité d'initier la signalisation Notch dans les cellules voisines, par l'activation de l'expression de ligands de la voie Notch tels que *Dll1* et *3*, qui déclencheront la signalisation Notch dans les cellules voisines par interaction « en-trans » (Castro et al., 2006; Henke et al., 2009).

En plus d'induire l'expression de facteurs de transcription permettant l'acquisition d'identités neuronales, de nombreux facteurs proneuraux contrôlent l'engagement vers un destin neuronal par la modulation du cycle cellulaire des progéniteurs. Par exemple, *Ngn2* est requis pour la différenciation des neurones primaires (les premiers neurones générés à partir des progéniteurs de la plaque neurale) du Xénope, à travers l'induction de l'expression du CKI *p27Xic1* (homologue de *p27Kip1* chez le Xénope) (Vernon et al., 2003). Dans le cervelet en développement de souris, *Ngn2* est exprimé au cours de la phase G1 des progéniteurs qui s'approprient à quitter le cycle pour devenir des cellules de Purkinje, les principaux neurones des circuits cérébelleux (Florio et al., 2012). Dans la région spinale du tube neural d'embryon de poulet, l'expression forcée de *Ngn2* dans les progéniteurs entraîne la diminution de l'expression de plusieurs régulateurs du cycle cellulaire tels que les Cyclines D1 / E1-E2 / A2, prévenant l'entrée en phase S et conduisant à la différenciation (Lacomme et al., 2012). Dans certaines lignées cellulaires de carcinome embryonnaire de souris, la surexpression des proneuraux

NeuroD2, Ascl1 et Ngn1 entraîne une augmentation de l'expression de p27Kip1 et une différenciation des cellules en neurones (Hardwick et al., 2015). Bien que de nombreux rôles dans la sortie du cycle cellulaire ont été décrits pour différents facteurs proneuraux, des fonctions pro-prolifératives ont également été mises en lumière. Ainsi, dans le télencéphale ventral de souris en développement, Ascl1 est impliqué à la fois dans la différenciation neuronale à travers l'induction de l'expression de gènes impliqués dans la sortie du cycle cellulaire, mais également dans la prolifération cellulaire à travers l'activation de l'expression de gènes tels que E2f1 et FoxM1 (Castro and Guillemot, 2011). Ceci suggère l'existence d'un système plus complexe qu'un simple « envoi vers la différenciation ».

D.2 - La voie de signalisation Notch

Si les gènes proneuraux sont impliqués dans la différenciation des progéniteurs vers des identités spécifiques de neurones, la voie de signalisation Notch est quant à elle impliquée dans le maintien de l'état prolifératif des progéniteurs (Engler et al., 2018).

La voie de signalisation Notch est activée par une interaction entre les récepteurs transmembranaires Notch (Notch1, 2, 3 et 4 chez les mammifères) présents à la surface d'une cellule, avec les ligands transmembranaires de ces récepteurs (au nombre de 5 : Jagged1 et 2 et les Delta-like (Dll) 1, 3 et 4) présents à la surface d'une cellule voisine (Zhang et al., 2018). La liaison d'un ligand sur son récepteur déclenche la libération du domaine intracellulaire du récepteur Notch (NICD, pour Notch Intra Cellular Domain) dans le cytoplasme (Mumm and Kopan, 2000). Ce domaine NICD transloque ensuite vers le noyau de la cellule, dans lequel il initiera (à travers une association avec d'autres protéines) la transcription des effecteurs de la voie Notch : les facteurs de transcription bHLH Hairy-enhancer of split (Hes) (Shimojo et al., 2008). Au cours de la neurogenèse, les facteurs Hes sont notamment connus pour réprimer de façon très forte l'expression des gènes proneuraux, ce qui permet le maintien des cellules progénitrices dans un état indifférencié (Bertrand et al., 2002; Ross et al., 2003). Au sein des progéniteurs neuraux, l'expression de Hes1 est exprimé de manière oscillatoire à travers une boucle d'auto-inhibition, et régule négativement l'expression de gènes proneuraux (ex : Ngn2) et des ligands de Notch (ex : Dll1) via des mécanismes directs et indirects (Shimojo et al., 2008). Lorsque les progéniteurs neuraux s'engagent vers la différenciation, l'expression de Hes1 s'éteint, entraînant une stabilisation de l'expression des gènes proneuraux (Kageyama et al., 2015).

D.3 - Le mouvement intercinétique du noyau

Un autre facteur impliqué dans le contrôle de la balance entre prolifération et différenciation est l'INM. Etant donné que les environnements apicaux et basaux sont sous l'influence de signaux moléculaires différents, l'hypothèse d'une influence sur le destin des progéniteurs suite à une exposition plus ou moins prolongée des cellules (en fonction de la durée de leur cycle cellulaire, voir même de la durée des différentes phases qui le compose) à ces différents signaux a été émise (Murciano et al., 2002; Taverna and Huttner, 2010). Cette hypothèse a été nommée hypothèse de la résidence nucléaire. Parmi les facteurs participant à cette régulation différentielle du destin le long de l'axe apico-basal est retrouvé la voie de signalisation pro-proliférative Notch, activée de façon prédominante dans la région apicale de l'épithélium. Dans

la rétine de poisson-zèbre en développement, la perturbation du mouvement intercinétique du noyau par délétion de l'expression de la dynactine1 entraîne une migration plus rapide des noyaux des progéniteurs dans le sens apical vers basal, et une migration plus lente dans le sens inverse. Dans ce contexte, la durée d'exposition des progéniteurs à la signalisation Notch est diminuée et conduit à leur sortie prématurée du cycle cellulaire (Del Bene et al., 2008). Par ailleurs, toujours dans la rétine de poisson-zèbre, il a été montré que la migration dans la région basale de l'épithélium des noyaux des progéniteurs neurogéniques est plus prononcée lors du dernier cycle cellulaire précédent une mitose terminale (Baye and Link, 2008, 2007). L'ensemble de ces données suggère que le mouvement intercinétique du noyau influence le destin des progéniteurs en contrôlant l'exposition des noyaux des progéniteurs à des signaux prolifératifs ou neurogéniques.

D.4 - Sortie des progéniteurs du cycle cellulaire et différenciation

Pendant le développement du SNC, les cellules progénitrices neurales sont en permanence confrontées à deux options : rester dans le cycle cellulaire et continuer de proliférer ; ou bien en sortir pour se diriger vers un processus de différenciation. Selon ces principes, forcer artificiellement le maintien et la poursuite des progéniteurs dans le cycle cellulaire devrait perturber la différenciation et, à l'inverse, diriger les cellules vers la différenciation devrait limiter l'aspect prolifératif.

Bien que sortie de cycle et différenciation soient deux processus fortement liés, ils peuvent dans certains cas être découplés. Par exemple, l'expression forcée de la cycline D1, un régulateur positif de la progression à travers la phase G1, dans les progéniteurs du domaine pMN de la moelle épinière de poulet en développement n'est pas suffisant pour empêcher la différenciation de progéniteurs pourtant toujours dans le cycle cellulaire (Lobjois et al., 2008). Les progéniteurs quittent la zone ventriculaire pour la zone du manteau, répriment l'expression de FTs marqueurs d'un statut de progéniteurs (Olig2, Sox2) et enclenchent l'expression de facteurs impliqués dans la différenciation en motoneurones. Les auteurs observent des cellules mitotiques en dehors de la VZ présentant des caractéristiques de motoneurones en cours de différenciation. Ces résultats semblent indiquer, dans ce cas précis, un découplage entre sortie de cycle et différenciation. A l'inverse, la répression artificielle par shRNA de l'expression de cette même cycline D1 dans le tube neural de poulet en développement s'accompagne d'une augmentation de la durée du cycle, sans pour autant en promouvoir sa sortie, et la différenciation (Lacomme et al., 2012). Dans un contexte physiologique, les auteurs montrent un rôle de NeuroG2 dans la coordination de ces deux processus.

Partie E : Influence de l'environnement sur la régulation de la prolifération VS différenciation

De nombreux signaux extracellulaires, émis par différentes sources, participent à la régulation de la balance entre prolifération et différenciation. L'une des sources majeures de ces signaux se trouve être le liquide cérébro-spinal (LCS), sécrété par les cellules des plexus choroïdes et circulant à l'intérieur de la lumière du tube neural (au cours du développement) puis du système ventriculaire (chez l'adulte). La composition du LCS est extrêmement régulée, aussi bien lors du développement que chez l'adulte (Lehtinen et al., 2013). Il contient notamment des ions, protéines, lipides, hormones, molécules de signalisation... et participe donc à la régulation du comportement des progéniteurs. Le LCS contient notamment des facteurs IGFs (Insulin-like Growth Factors) qui favorisent l'aspect prolifératif des progéniteurs (Lehtinen and Walsh, 2011). Ces différentes molécules de signalisation se lient sur leurs récepteurs localisés principalement au niveau de la surface apicale et sur le cil primaire des progéniteurs neuraux, ce qui souligne l'importance de la région apicale dans la réponse aux différents signaux en provenance du LCS.

Le système vasculaire en développement est également impliqué dans l'apport de molécules de signalisation et de nutriments aux progéniteurs neuraux, en particulier dans les progéniteurs intermédiaires basaux ayant perdu les prolongements cytoplasmiques contactant la surface apicale et la membrane basale. En effet, des études ont montré que la distribution spatiotemporelle de ces progéniteurs intermédiaires suit le développement du système vasculaire, qui constituerait une niche pour ces progéniteurs (Javaherian and Kriegstein, 2009; Stubbs et al., 2009).

Les différents types de cellules localisées dans un environnement plus ou moins proche des progéniteurs peuvent également influencer le comportement de ces derniers. Concernant l'influence des neurones sur les progéniteurs, l'exemple le plus connu est certainement celui des neurones de Cajal-Retzius. Ces neurones sont les tous premiers produits au cours du processus de neurogenèse, migrent puis s'établissent dans la région corticale la plus basale (Soriano and Del Río, 2005), au sein de laquelle ils sécrètent de nombreuses molécules diffusibles impliquées dans la migration neuronale dont la plus connue est appelée Reelin (Bar et al., 2000). Il a également été montré que la Reelin induit une augmentation de l'activation de la voie de signalisation Notch dans les aRGs, contribuant ainsi à une régulation de la production des bRGs et neurones (Lakomá et al., 2011).

Les cellules de la microglie sont également capables d'influencer le comportement des progéniteurs neuraux. La présence de cellules microgliales proches des cellules progénitrices semblent affecter leur capacité proliférative. En effet, il a été montré *in vitro* que les progéniteurs neuraux cultivés en absence de cellules microgliales présentent des taux de prolifération réduits (Antony et al., 2011; Walton et al., 2006). De plus, une certaine fraction des cellules de la microglie sont capables de réguler la transition de la neurogenèse vers la gliogenèse à travers la production d'oxyde nitrique (Béchade et al., 2011; Peunova and Enikolopov, 1995; Thion and Garel, 2020).

Enfin, les progéniteurs sont également capables de communiquer entre eux pour influencer leur destin. Au fur et à mesure des divisions successives des progéniteurs neuraux, la zone ventriculaire devient de plus en plus dense, et les progéniteurs de plus en plus proches les uns des autres. Ils peuvent alors générer et percevoir deux types de signaux : chimiques et physiques. Au regard des signaux chimiques, les progéniteurs voisins peuvent notamment établir des communications à travers des jonctions GAP (ou communicantes - Elias and Kriegstein, 2008). Ces communications permettent l'organisation de la migration des différents noyaux au cours du mouvement intercinétique à l'échelle tissulaire, mais également la diffusion de purines (ATP - sécrétées par les progéniteurs) dans les cellules voisines, ce qui affecte leurs capacités prolifératives (Liu et al., 2010). Concernant les signaux physiques (ou mécaniques), il a été montré que l'augmentation de la densité dans la VZ est associée à un déplacement des noyaux des progéniteurs de la surface apicale vers la zone basale, au sein de laquelle ils s'établissent pour se diviser (Okamoto et al., 2013). Ceci suggère que les progéniteurs auraient la capacité de monitorer les forces mécaniques s'exerçant à leur rencontre et d'y répondre par le changement de la localisation de leurs noyaux dans l'épithélium (Kosodo et al., 2011). Ce déplacement dans le tissu est accompagné d'un changement d'exposition de ces progéniteurs à différents signaux influençant leur destin (voir sections D.2 et D.3).

Chapitre II : Modes de division et régulation de la Transition entre les modes de division au cours de La neurogenèse embryonnaire

Dans le chapitre précédent, j'ai décrit de nombreux facteurs et mécanismes participant à l'acquisition d'une diversité d'identités neuronales, ainsi qu'au contrôle de la balance entre prolifération et différenciation au cours de la neurogenèse embryonnaire du SNC.

Un autre facteur contrôlant ces deux aspects de la neurogenèse se trouve être la régulation des modes de division (MDD) utilisés par les cellules progénitrices neurales. Pour rappel, les progéniteurs neurales réalisent initialement des divisions symétriques prolifératives, permettant l'amplification de la réserve initiale de cellules progénitrices. Avec le début et la progression dans le processus de neurogenèse, les progéniteurs transitionnent progressivement vers des modes de division neurogéniques, dans un premier temps asymétrique puis symétrique terminal (**Figure 10**).

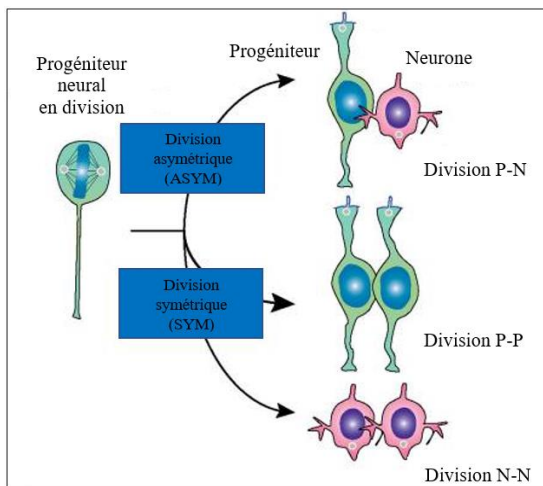


Figure 10 : Les différents modes de division des cellules progénitrices neurales. Les progéniteurs (P) neurales peuvent réaliser des divisions symétriques prolifératives (SYM – $1P \rightarrow 2P$), des divisions asymétriques neurogéniques (ASYM – $1P \rightarrow 1P + 1 \text{ Neurone (N)}$) et des divisions symétriques terminales ($1P \rightarrow 2N$). - d'après Gimeno et Paridaen 2022

Bien que classiquement admis, une question provocatrice serait : l'existence de différents MDD est-elle vraiment nécessaire pour la mise en place d'un système aussi complexe que le SNC ? En effet, la construction du SNC (ou d'autres organes) pourrait tout à fait être réalisée de manière « simple » à travers une population de progéniteurs qui amplifie le nombre de cellules disponibles, et par la suite (ou en parallèle) s'opérerait une production séquentielle des différents types de neurones par simple différenciation des progéniteurs produits. Cependant, force est de constater que ce n'est pas la méthode sélectionnée au cours de l'évolution, qui préfère s'appuyer sur différents modes de division.

Ainsi, comment ces différents MDD, et en particulier le mode de division asymétrique, ont-ils été mis en évidence ? Ce dernier, donnant naissance à des cellules filles d'identités différentes, est sans aucun doute le MDD le plus intrigant. Pourquoi produire « en même temps » des neurones (ou progéniteur intermédiaire, plus restreint au niveau de ses capacités prolifératives) et des progéniteurs prolifératifs, alors que le système pourrait « simplement » produire **des cellules puis les orienter vers les identités nécessaires, ou alors produire directement des neurones** ? Sur quelles bases se sont appuyées les premiers chercheurs ayant décrit ce concept ?

Au regard de l'existence de MDD asymétrique, des premières preuves **indirectes** ont été apportées par des analyses clonales, qui ont montré que des neurones issus d'un même clone étaient répartis dans les différentes couches corticales, pourtant produites de manière successive (Luskin et al., 1988; Price and Thurlow, 1988; Walsh and Cepko, 1988). Ces premières observations ont alors suggéré qu'un progéniteur pouvait produire en même temps un neurone, destiné à peupler une certaine couche, ainsi qu'un progéniteur qui continuerait à cycler et pourrait produire des neurones de couches ultérieures au cours de ses prochains cycles.

Ces observations ont alors soulevé une question d'une importance capitale : le comportement d'un progéniteur peut-il être prédictif des types cellulaires (progéniteurs, neurones, ou bien les deux) qu'il générera lors de sa prochaine division ? Au cours de travaux pionniers, Chenn et McConnell observent, sur des tranches de cortex de furet *Mustela furo*, deux processus très intéressants (Chenn and McConnell, 1995). Le premier est observé par imagerie en-live, via le suivi de progéniteurs individuels marqués à l'aide d'un traceur fluorescent. Ils observent qu'un plan de clivage horizontal (parallèle à l'épithélium – « **asymmetric** » **Figure 11**) lors de la mitose des progéniteurs est associé à la production de deux cellules filles aux comportements différents, en particulier en termes de mouvement et de localisation dans le tissu, ce qu'ils attribuent à des identités différentes. Le deuxième est une localisation asymétrique du côté basal de la protéine Notch1 (par immunomarquage) dans des progéniteurs en division. Ainsi, les auteurs émettent l'hypothèse qu'au cours d'une division progénitrice à plan de clivage horizontal, l'une des deux cellules filles hérite de manière inégale du « pool » basal de Notch1, ce qui influencera son destin et permettra l'émergence d'une identité neuronale, au contraire de sa cellule sœur qui conservera le statut de progéniteur. Cette hypothèse était très séduisante, dans la mesure où la voie de signalisation Notch était déjà bien connue pour réguler des choix d'identité binaires, en particulier entre cellules sœurs. De plus, il venait d'être montré chez la *Drosophile* qu'une distribution asymétrique de Numb, un régulateur de la voie Notch, était au cœur du mécanisme de division cellulaire asymétrique des Sensory Organ Precursors, une population de cellules progénitrices du système nerveux périphérique (Rhyu et al, 1994). Néanmoins, comme le rappelaient d'ailleurs Chenn et McConnell, l'héritage préférentiel du récepteur par la cellule fille qu'ils décrivent dans leur modèle comme un futur neurone semblait contraire aux observations antérieures (et ultérieures) qui montrent que l'activité élevée de la voie Notch est plutôt un marqueur d'une identité de progéniteur prolifératif.

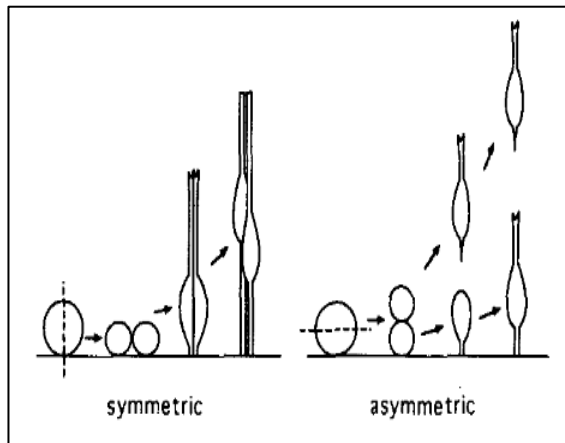


Figure 11 : Modèles de division symétrique et asymétrique des progéniteurs neuraux en fonction du plan de clivage mitotique.

Dans ce modèle, une division selon un plan de clivage vertical (gauche) donne naissance à deux cellules filles de même identité, alors qu'une division selon un plan de clivage horizontal (droite) donne naissance à deux cellules filles d'identités différentes - d'après Chenn et McConnell., 1995

C'est en partie sur les observations de cette étude pionnière que s'est popularisée la notion de l'existence de divisions intrinsèquement asymétriques des progéniteurs neuraux chez les vertébrés : au cours du cycle cellulaire et/ou de la division d'une cellule mère, une asymétrie de composants appelés « déterminants de l'identité » se met en place dans la cellule, et l'héritage inégal de ces déterminants dans les cellules filles va influencer sur l'acquisition de leur identité (nous verrons plus tard que la voie Notch est un acteur récurrent dans le cadre de ces asymétries).

Cependant, une mise en garde s'impose. En effet, une telle identification du mode de division, par la mise en lumière d'une asymétrie de déterminants pendant la mitose de la cellule mère, est une preuve certes directe de l'existence d'un mode de division asymétrique, mais est **EXTRÊMEMENT** compliquée à obtenir d'un point de vue expérimental. Ainsi, de nombreuses études (dont la nôtre) utilisent des approches indirectes pour évaluer les modes de division, par exemple via l'analyse de l'identité des cellules filles quelques heures après la division, de laquelle nous déduisons le MDD utilisé par la cellule mère. Ces méthodes ont l'avantage d'une plus grande simplicité de mise en place au niveau expérimental, mais apportent des preuves **indirectes** sur les modes de division, particulièrement en raison de l'absence de marqueurs précoces d'identité des cellules filles dès la sortie de la mitose. En effet, l'on pourrait imaginer que deux cellules filles « identiques » soient produites lors de la division et que l'identité différentielle observée après quelques heures soit dictée par des paramètres post-mitotiques pendant cette fenêtre de temps. Cependant, c'est principalement à travers ce type d'étude, réalisées au sein de différentes espèces, qu'a été mis en lumière l'existence de différents modes de division et leur évolution au cours de la neurogenèse embryonnaire. Ainsi, je les décrirai dans un premier temps.

Par la suite, je me concentrerai plus particulièrement sur les mécanismes cellulaires des divisions asymétriques, qui ont fait l'objet d'intenses recherches depuis plusieurs décennies, et sont toujours extensivement étudiés à l'heure actuelle. Ce mécanisme de division asymétrique est retrouvé au cours du développement de nombreuses espèces, vertébrés comme invertébrés, au sein desquelles son principal rôle est la génération de la diversité cellulaire. Dans le cadre de la neurogenèse embryonnaire, de nombreux travaux ont permis l'identification de quelques déterminants du destin cellulaire dans le contexte de la neurogenèse. Je les aborderai au cours d'une seconde partie. Enfin, les mécanismes transcriptomiques régulant la transition des modes de division, en particulier d'un mode symétrique neurogénique vers asymétrique neurogénique restent encore peu connus. Cette régulation étant le cœur de mon travail de thèse, je lui consacrerai une troisième partie.

Partie A : les différents modes de division au cours de la neurogenèse

A.1 – Identification des différents modes de division au cours de la neurogenèse

L'existence de différents MDD pendant le développement du SNC a été suggérée par des études s'appuyant sur un marquage mosaïque de progéniteurs individuels combiné à des techniques d'imagerie en live *in vivo*. Cette stratégie, en suivant les cellules filles sur de longues durées après la division de la cellule mère permet ainsi de déterminer l'identité des cellules filles par une entrée en mitose (progéniteur) ou non (neurone) de ces cellules filles et de déduire rétrospectivement le MDD.

Ainsi, en combinant marquage rétroviral sporadique de progéniteurs et imagerie time-lapse sur des tranches organotypiques de cortex embryonnaire de rat (stades embryonnaires E16-E19), les travaux pionniers de Noctor et collaborateurs ont permis l'identification des différents modes de division symétrique prolifératif, asymétrique neurogénique et symétrique terminal (Noctor et al., 2004). Concernant le mode asymétrique, les auteurs identifient deux résultats différents pour les divisions asymétriques réalisées par les progéniteurs aRGs : les divisions produisant un progéniteur aRG et un neurone (neurogenèse directe), et des divisions produisant deux progéniteurs aux caractéristiques fonctionnelles différentes, distingués selon la localisation de leur mitose (VZ = aRG VS SVZ = progéniteur intermédiaire, au potentiel prolifératif plus restreint).

D'autres études utilisant des stratégies similaires dans la région spinale du tube neural en développement (Molina et al., 2022 ; Wilcock et al., 2007), ou bien dans la rétine (He et al., 2012a) et le cerveau en développement de poisson-zèbre (Dong et al., 2012; Hevia et al., 2022) ont également révélé l'existence de différents MDD. Ces résultats suggèrent que la régulation des MDD est un mécanisme utilisé dans les diverses régions du SNC en développement pour leur construction.

L'existence des différents MDD au cours de la neurogenèse du SNC est également mise en lumière à travers des études d'analyses clonales sur tissu fixé. Par exemple, grâce à l'utilisation de la technique MADM (Mosaic Analysis with Double Markers) sous le contrôle d'un transgène *Emx1-CreER^{T2}*, Gao et collaborateurs réalisent dans le néocortex de souris en développement des analyses clonales quantitatives de la descendance des progéniteurs de neurones excitateurs néocorticaux (Gao et al., 2014). La technique MADM a pour avantage de marquer de façon permanente et distincte (dans le cas des événements de recombinaison G2-X – **Figure 12A**) les deux lignages issus de la division d'un progéniteur. Ceci permet une visualisation indirecte du mode de division utilisé par la cellule mère, à travers l'évaluation de la taille des héli-clones. Entre les stades embryonnaires E10 et E13, les auteurs observent une transition entre des clones majoritairement constitués de deux larges héli-clones vers des clones comportant majoritairement deux héli-clones de tailles différentes, suggérant l'existence de deux MDD différents entre ces stades (**Figure 12B**). De plus, les auteurs mettent en lumière deux résultats différents de divisions asymétriques (neurogenèse directe VS indirecte - **Figure 12B**).

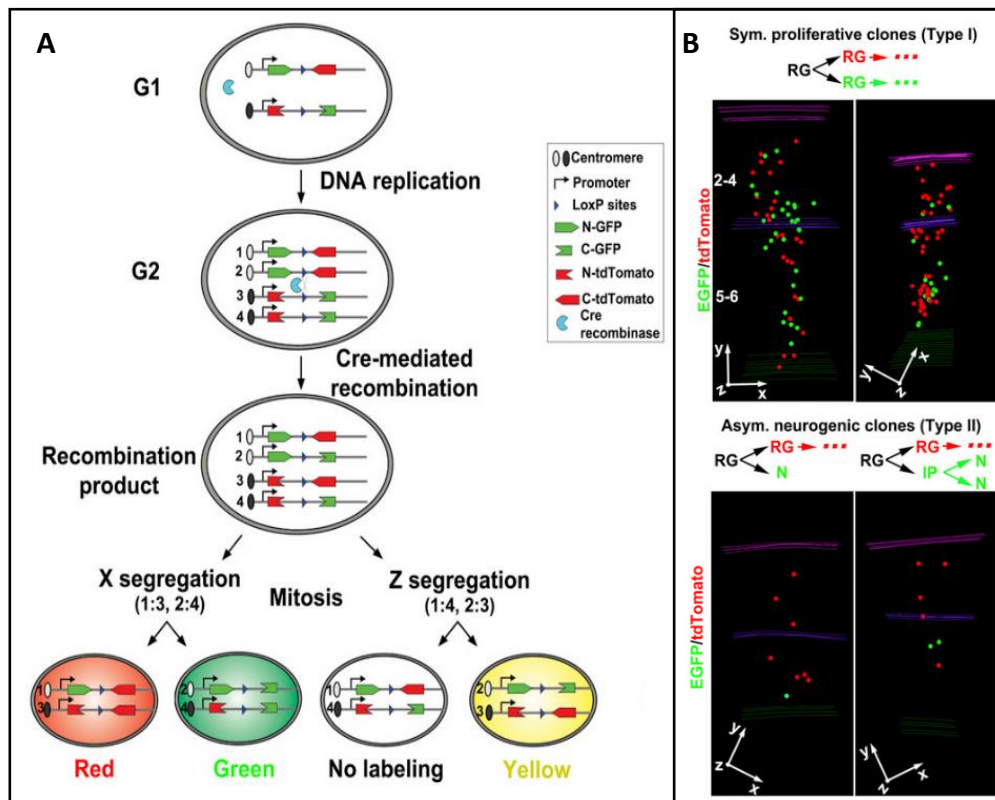


Figure 12 : Stratégie MADM et analyse clonale de la descendance d'évènements MADM G2-X. (A) Représentation schématique de la stratégie MADM. Les évènements de ségrégation G2-X permettent de reconstituer l'expression d'un marqueur fluorescent différent dans les deux lignées de cellules filles (GFP vs RFP) et ainsi suivre la descendance de ces lignées. (B) Images représentatives de clones issus de divisions symétriques prolifératives (haut) et asymétriques neurogéniques (bas). Des représentations schématiques décrivant ces clones sont retrouvées au-dessus de chaque image. RG = cellule de glie radiaire ; N = Neurone ; IP = Progéniteur Intermédiaire. - Adapté de Gao et al., 2014

D'autres études ont identifié les différents MDD en utilisant des marqueurs spécifiques de ces différents modes. Par des travaux combinant les techniques d'hybridation *in situ* (HIS) et d'immunomarquage, l'équipe du professeur Wieland Huttner identifie dans le SNC murin en développement que l'expression de l'ARNm du gène Tis21 (également connu sous les noms BTG2 et PC3) : 1) commence avec le début de la neurogenèse, 2) est confinée à une sous-population de cellules progénitrices qui augmente au fur et à mesure de l'avancée dans la neurogenèse et 3) n'est pas détectée dans les neurones nouveau-nés. Ainsi, l'expression de l'ARNm de Tis21 est le premier marqueur identifié comme différentiellement exprimé entre progéniteurs prolifératifs (Tis21 ARNm-négatif) et neurogéniques (Tis21 ARN-positif), permettant ainsi leur discrimination (Iacopetti et al., 1999). Des travaux ultérieurs du groupe, basés sur l'utilisation d'une souris mutante pour laquelle une protéine GFP nucléaire est insérée dans une portion codante du gène Tis21 (Knock-In de la GFP induisant un Knock-out mono-allélique de Tis21), ont montré une apparition de l'expression de Tis21 dans le SNC en développement des souris entre E9.5 et E14.5, coïncidant avec le début de la neurogenèse. De plus, l'expression de la GFP est similaire au patron d'expression précédemment décrit de la

protéine Tis21, et corrèle précisément avec les gradients spatio-temporels de la neurogenèse (Haubensak et al., 2004) - **Figure 13A**).

Par ailleurs, une analyse par imagerie time-lapse du devenir des cellules filles issues de divisions de progéniteurs positifs pour la GFP dans la VZ, réalisée sur des tranches organotypiques a montré que ces progéniteurs réalisaient des divisions asymétriques neurogéniques dans le télencéphale murin au stade E12.5. Ces résultats permettent de conforter l'utilisation de l'expression de l'ARNm de Tis21 comme un marqueur discriminant les progéniteurs prolifératifs des progéniteurs neurogéniques. Au cours de la neurogenèse spinale de l'embryon de poulet, l'expression de Tis21 commence également lorsque la neurogenèse débute (**Figure 13B**). Ceci suggère une potentielle conservation de Tis21 en tant que marqueur de progéniteurs neurogéniques chez les vertébrés.

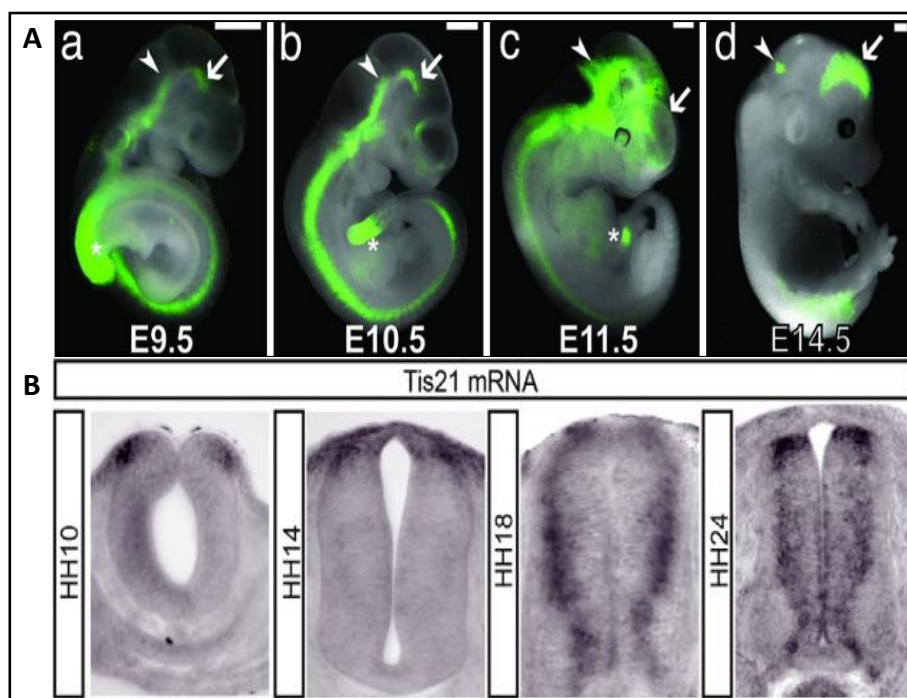


Figure 13 : Patrons d'expression de Tis21 au cours de la neurogenèse embryonnaire murine et aviaire. (A) Des embryons de souris Knock-In hétérozygotes Tis21-GFP expriment une GFP sous le contrôle du promoteur endogène de Tis21. Dans le SNC en développement, cette expression de Tis21-GFP est en parfaite corrélation avec la progression spatio-temporelle de la neurogenèse. Adapté de Haubensak et al, 2004. (B) Evolution du patron d'expression de l'ARNm de Tis21 par HIS dans la région spinale de l'embryon de poulet en développement. L'ARNm de Tis21 ne semble pas être exprimé avant le début de la neurogenèse (stades HH10-14) puis apparaît progressivement tout le long de l'axe dorso-ventral du tube neural. Adapté de Saade et al., 2013

A.2 – Evolution des modes de division au cours de la neurogenèse à l'échelle tissulaire

Au cours de la neurogenèse, le rythme de production neuronale est en partie orchestré par les différents MDD utilisés par les progéniteurs, et évolue en fonction des changements de MDD qui s'opèrent dans les populations progénitrices. Ainsi, pour caractériser l'évolution des MDD au cours de la neurogenèse embryonnaire, le groupe d'Elisa Marti a développé une stratégie permettant de discriminer les progéniteurs symétriques prolifératifs, asymétriques neurogéniques et symétrique terminal. Celle-ci consiste en l'électroporation, dans le tube neural de l'embryon de poulet, de deux constructions : l'une contenant la séquence codante d'une protéine GFP sous le contrôle d'un enhancer spinal du gène progéniteur-spécifique Sox2 ; et l'autre contenant la séquence codante d'une protéine RFP sous le contrôle d'une partie du promoteur Tis21, dont l'ARNm n'est exprimé que dans les progéniteurs neurogéniques (**Figure 14A**). Ainsi, selon ce système les progéniteurs symétriques prolifératifs sont uniquement positifs pour la GFP, les progéniteurs asymétriques neurogéniques sont GFP et RFP-positifs, et les progéniteurs symétriques terminaux sont uniquement positifs pour la RFP (les auteurs ayant décrit que l'enhancer de Sox2 utilisé dans ces expériences semble inactif dans cette dernière population) (**Figure 14A**). Grâce à cette approche, les auteurs peuvent notamment quantifier la coexistence des différents modes de division à l'échelle tissulaire à un temps donné.

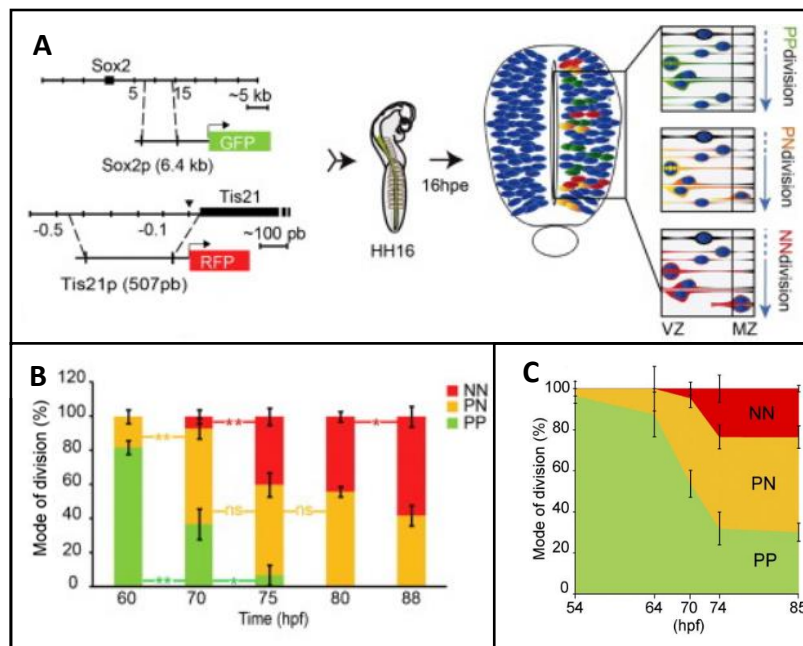


Figure 14 : Evaluation de l'évolution des fréquences des différents modes de division utilisés par les progéniteurs neuraxiaux à l'échelle tissulaire. (A) Représentation schématique de la stratégie utilisée par Saade et collaborateurs pour identifier les différents modes de division des progéniteurs. Cette stratégie s'appuie sur la combinaison de 2 rapporteurs : Sox2p-GFP et Tis21p-RFP pour identifier les progéniteurs symétriques prolifératifs (PP – GFP+/RFP-), asymétriques neurogéniques (PN – GFP+/RFP+) et symétriques terminaux (GFP-/RFP+). (B) Evolution des modes de division dans le domaine pMN de la région spinale de l'embryon de poulet en développement entre 60 et 88 hpf (heures-post fertilization). (A) et (B) adaptés de Saade et al., 2013. (C) Evolution des modes de division dans la région spinale de l'embryon de poulet en développement, le long de l'axe dorso-ventral, entre 54 et 85 hpf. Adapté de Le Dréau et al., 2014.

Dans une première étude, le groupe s'intéresse à l'évolution de la dynamique symétrique prolifératif → asymétrique neurogénique → symétrique terminal uniquement dans le domaine ventral où résident les progéniteurs de motoneurones (pMN) (Saade et al., 2013). Initialement, les divisions symétriques prolifératives sont majoritaires. Avec le début de la neurogenèse est observée une forte diminution de ces divisions au profit des divisions neurogéniques et plus particulièrement des divisions asymétriques. Progressivement, la proportion des divisions terminales augmente, jusqu'à devenir le mode de division majoritaire (**Figure 14B**). Des travaux ultérieurs de la même équipe ont caractérisé l'évolution des MDD le long de l'axe dorso-ventral du tube neural d'embryon de poulet et montre une dynamique évolutive similaire (prédominance initiale des divisions symétriques prolifératives – diminution au profit des divisions asymétriques – apparition et augmentation des divisions terminales – **Figure 14C**), mais avec des proportions différentes à des temps donnés entre les domaines dorsaux et le domaine pMN (Le Dréau et al., 2014). Ces différences s'expliquent par des vitesses différentes de progression de la neurogenèse au sein des différents domaines du tube neural. En particulier, le domaine pMN est caractérisé par une neurogenèse précoce expliquant des proportions plus élevées de divisions neurogéniques par rapport au reste des domaines du tube neural à un même stade. Également, il est intéressant de noter que l'évolution des modes de division semble suivre, du moins à l'échelle populationnelle/tissulaire, une trajectoire définie de transitions successives des MDD (symétrique prolifératif → asymétrique neurogénique → symétrique terminal), puisque le mode symétrique prolifératif initialement très largement majoritaire laisse progressivement place au mode asymétrique neurogénique dans un premier temps, puis au mode symétrique terminal (**Figure 14B**).

Parmi ces différents types de division, les divisions asymétriques neurogéniques ont fait l'objet d'une intense recherche. Au cours de la prochaine partie j'aborderai donc les mécanismes connus dans le cadre de la neurogenèse permettant la mise en place de ces types de division.

Partie B : Divisions asymétriques et mécanismes cellulaires

Il y a plus de 100 ans, Edwin Conklin, embryologiste considéré comme l'un des pères du domaine de la biologie du développement, étudiait le développement de l'embryon d'ascidie (un petit organisme invertébré marin) (Conklin, 1905). Au cours des premières divisions de l'organisme, il observe une ségrégation asymétrique d'une zone jaune du cytoplasme dans certaines cellules. Par la destruction précise de ces cellules, il observe ensuite une absence de cellules musculaires aux stades ultérieurs. Ainsi, il en déduit que cet héritage asymétrique spécifie les cellules vers un destin de cellule musculaire, et des premières preuves de l'existence de divisions asymétriques furent donc mises en lumière.

Depuis leur découverte, de nombreux travaux se sont intéressés, dans le SNC en développement des vertébrés mais également dans de nombreux autres contextes et organismes modèles, à caractériser les divisions asymétriques et comprendre les mécanismes permettant leur exécution.

Le résultat d'une division asymétrique est l'acquisition d'identités différentes dans les cellules filles issues de cette division. Sous cette définition se cachent deux concepts : divisions extrinsèquement asymétriques, pour lesquelles l'identité des cellules filles est déterminée après la division de la cellule mère ; et les divisions intrinsèquement asymétriques, au cours desquelles le destin des cellules filles est déterminé par des événements se produisant au cours du cycle cellulaire et/ou lors de la division de la cellule mère.

B.1 – Division cellulaire asymétrique

Dans le cadre des divisions cellulaires asymétriques extrinsèques, la cellule mère se divise et donne naissance à des cellules filles à priori identiques entre elles, dont les destins divergeront quelques temps après la division.

La division cellulaire elle-même est ici considérée symétrique dans le sens où, morphologiquement, le clivage de la cellule mère est tel que deux cellules filles de tailles, formes et contenus égaux émergent. Cependant, à la suite de la division et en raison d'une exposition inégale à certains signaux extrinsèques, les cellules filles acquièrent des destins cellulaires différents. Un exemple bien étudié de division extrinsèquement asymétrique se trouve être les divisions des cellules souches adultes (Chen et al., 2016). Dans ce contexte, la position spatiale des cellules dans l'épithélium joue un rôle déterminant dans l'acquisition d'identités distinctes. (**Figure 15**).

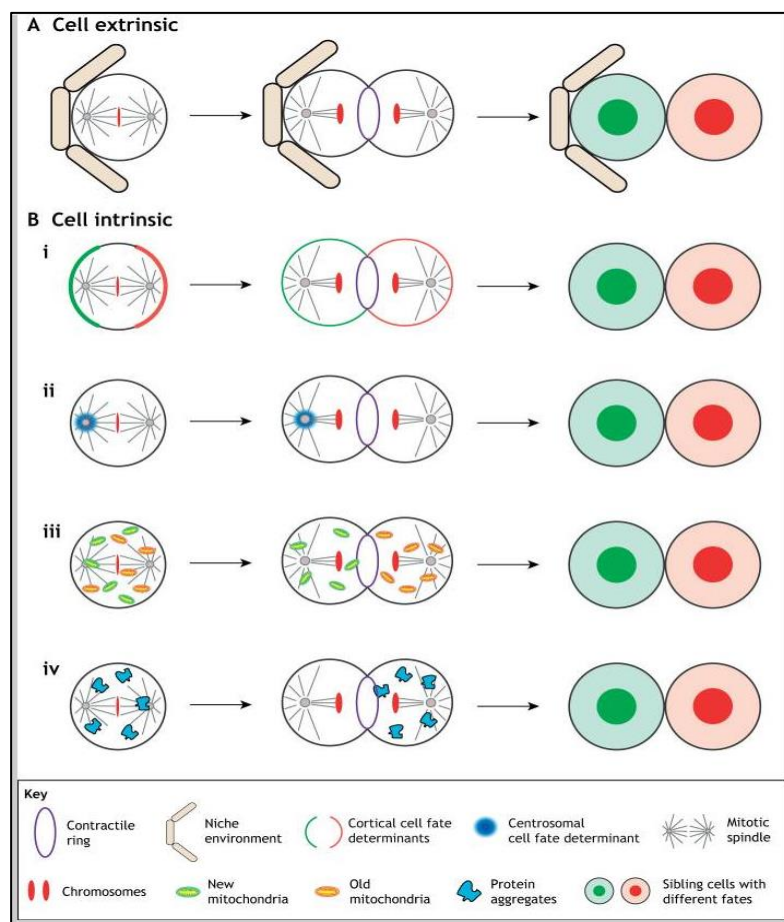


Figure 15 : Différents concepts d'asymétrie de division et de ségrégation asymétrique de déterminants du destin. (A) Division asymétrique extrinsèque. Dans ce contexte, la mise en place et l'exécution de l'asymétrie est induite par des facteurs extrinsèques produit par l'environnement, ici une niche. (B) Différents types de divisions asymétriques intrinsèques. Ces représentations graphiques illustrent des phénomènes impliqués dans l'acquisition de destins différentiels dans les cellules filles. (i) distribution polarisée de déterminants de l'identité, (ii) localisation asymétrique de centrosomes d'âges différents accompagnés ou non de déterminants de l'identité, (iii) distribution asymétrique non-aléatoire d'organites spécifiques, (iv) héritage asymétrique de déterminants protéiques de l'identité. – Adapté de Sunchu et Cabernard., 2020

La définition rigoureuse d'une division intrinsèquement asymétrique repose sur trois piliers :

- 1 Avant la division de la cellule mère, des mécanismes entraînent une répartition inégale de déterminants du destin (molécules et/ou organites influençant l'acquisition d'un destin particulier dans les cellules filles) au sein de la cellule mère.
- 2 Au cours de la division cellulaire, les déterminants du destin ségrégent de manière inégale dans les deux cellules filles.
- 3 Au sein des cellules filles, les déterminants hérités de façon inégale vont mettre en place des programmes différents entre les deux cellules sœurs, conduisant à l'acquisition de différentes identités,

Dans le SNC en développement, les travaux menés depuis les premières observations d'Edwin Conklin ont permis l'identification de certains déterminants du destin. Dans les prochains paragraphes, je m'appuierai sur la définition de la division asymétrique intrinsèque exposée ci-dessus pour décrire les déterminants du destin identifiés et leur influence sur l'acquisition d'une identité particulière, mais également les mécanismes à travers lesquels ces déterminants sont hérités de manière inégale. Il est à noter que les mécanismes et/ou déterminants abordés ci-après ont généralement été identifiés dans des contextes et/ou organismes particuliers, et qu'il n'est pas rare d'observer des discordances et controverses entre les différents modèles utilisés. De plus, de nombreuses études établissent des corrélations entre ségrégation asymétrique de déterminants et acquisition d'identité, mais bien plus rarement sont présentés des arguments impliquant une causalité. Enfin, comme mentionné dans l'introduction de ce chapitre, la voie de signalisation Notch est fortement impliquée dans l'acquisition de destins différents via les divisions intrinsèquement asymétriques.

On notera enfin ici que la frontière entre la régulation des identités cellulaires par des asymétries intrinsèques et des signaux extrinsèques est parfois floue : ainsi, plusieurs régulateurs de la voie de signalisation Notch ont été décrits comme des déterminants d'identité hérités de façon intrinsèquement asymétrique (Numb, Delta, Mindbomb1 ou Neuralized), mais la voie Notch elle-même met en jeu une interaction ligand-récepteur extracellulaire ; à l'inverse, si le choix d'identité des cellules filles issues de la division de cellules souches germinales chez la drosophile se fait sous l'influence de signaux externes reçus différenciellement par les cellules filles après la division, la position des cellules filles au sein d'une niche de signalisation (Figure 15A) est déterminée par l'orientation du fuseau mitotique de la cellule mère, sous contrôle d'un mécanisme intrinsèque.

B.2 – Division cellulaire ASYM intrinsèque : déterminants de l'identité

B.2.1 – Les endosomes et la voie de signalisation Notch

Certains endosomes spécifiques appelés endosomes Sara, caractérisés par la présence à leur surface de la protéine endosomale Sara (Smad Anchor for Receptor Activation), peuvent être hérités de manière asymétrique lors de la division des progéniteurs neuraux au cours de la neurogenèse des vertébrés et participer à l'acquisition d'identités différentes dans les cellules filles. Dans la moelle épinière de poisson-zèbre en développement, une analyse clonale en

imagerie live combinant l'utilisation d'une protéine de fusion Sara-CFP (permettant la visualisation des endosomes Sara) à une protéine photo-convertible (permettant de discriminer avec fidélité les deux cellules sœurs après la mitose) a montré que dans 85% des divisions asymétriques P-N présentant une forte asymétrie de ségrégation des endosomes, la cellule fille contenant le plus d'endosomes conservait le statut progéniteur (la cellule se divise de nouveau) et sa sœur devenait un neurone (la cellule ne se divise plus) (Kressmann et al., 2015). Cependant, les auteurs ont observé des divisions symétriques prolifératives accompagnées d'une asymétrie de ségrégation des endosomes (avec des degrés variables d'asymétrie) ainsi que des divisions asymétriques neurogéniques associées à de faibles niveaux de ségrégation asymétrique des endosomes (Kressmann et al., 2015). L'asymétrie de ségrégation des endosomes Sara ne représente donc pas un marqueur prédictif extrêmement fiable d'un MDD symétrique ou asymétrique. Un phénomène plutôt similaire est observé dans la rétine et le cerveau antérieur de poisson-zèbre en développement, dans laquelle une autre analyse clonale basée sur de l'imagerie en-live a également permis de mettre en évidence un héritage asymétrique des endosomes Sara au cours de division asymétrique de progéniteurs (Nerli et al., 2020 ; Zhao et al., 2021).

Les endosomes Sara contiennent une réserve de récepteurs et ligands de Notch leur permettant d'activer la voie de signalisation Notch de manière autonome. Dans les trois études mentionnées précédemment, sont observées dans les cellules filles héritant de la plus forte quantité d'endosomes une activité de la voie Notch supérieure à celle observée dans les cellules sœurs. Ainsi, ces études indiquent que l'asymétrie de destin observée lors de ségrégation asymétrique d'endosomes Sara est associée à la mise en place d'une signalisation Notch différentielle dans les cellules filles.

Pour complètement correspondre à la définition de la division asymétrique intrinsèque, un point reste cependant à éclaircir : quel est le mécanisme permettant cette ségrégation inégale des endosomes ?

Un élément de réponse est apporté par une étude réalisée dans le cerveau antérieur du poisson-zèbre (Zhao et al., 2021). Dans ce contexte, la ségrégation asymétrique des endosomes s'appuie sur la protéine de polarité cellulaire Pard3ab (gène homologue de Par3 chez le poisson-zèbre), présente uniquement à la surface basale du cortex cellulaire des progéniteurs neuronaux. L'utilisation d'un oligonucléotide morpholino antisens dirigé contre Pard3ab perturbe la répartition asymétrique des endosomes, qui est restaurée lors d'une injection d'un ARNm résistant codant pour Pard3ab. Ainsi, ces résultats mettent en lumière le rôle d'une protéine de polarité cellulaire dans la distribution inégale des endosomes lors de certaines divisions asymétriques des progéniteurs aRGs.

B.2.2 – Les protéines de polarité cellulaire (et toujours la voie Notch)

De nombreuses études réalisées chez des organismes invertébrés, notamment la drosophile et le nématode, ont permis de mettre en évidence le rôle de protéines de la polarité cellulaire dans la répartition inégale (pré-mitotique) et la ségrégation asymétrique de déterminants du destin, et ce à travers un mécanisme en deux étapes. Dans un premier temps, ces protéines induisent la formation d'un axe de polarité par leur répartition inégale selon l'axe apico-basal de la cellule, et recrutent certains déterminants du destin uniquement dans la partie apicale ou basale de la cellule. Ensuite, au moment de la division, ces protéines coordonnent l'orientation du fuseau

mitotique selon l'axe de polarité qu'elles ont établi, ce qui permet une ségrégation asymétrique des déterminants, qui influenceront le destin des cellules filles.

Par exemple, dans les neuroblastes de la drosophile, l'établissement de la polarité est assuré par le complexe protéique Par (constitué de Par3 (Partitioning defect 3) / Par6 / aPKC (atypical Protein Kinase C)) localisé exclusivement au niveau du cortex apical des neuroblastes. Ce complexe Par est connecté via la protéine Inscuteable à un second complexe protéique permettant le recrutement spécifique de certaines protéines (par exemple Mud (Mushroom defective)) au niveau du cortex apical. De plus, les protéines du complexe Par empêchent la localisation apicale de nombreux déterminants du destin tels que la protéine Numb, un régulateur négatif de la voie Notch, contraignant ce déterminant à occuper la région basale du neuroblaste. Enfin, les protéines apicales orientent le fuseau mitotique selon l'axe de polarité apico-basal établi, afin d'assurer la correcte ségrégation asymétrique des divers déterminants du destin apicaux et basaux (Deng and Wang, 2022). Par la suite, une activité différentielle de la voie Notch se met en place dans les cellules filles, entraînant l'acquisition de destins différents.

Chez les vertébrés il a été montré, dans le cortex de souris au stade E14.5, que la protéine mPar3 (mammalian Par3) est localisée au niveau de la membrane latérale des progéniteurs aRGs (co-localisation avec ZO-1) au cours de l'interphase, puis adopte une localisation beaucoup plus diffuse lors de l'entrée des progéniteurs en mitose, avec un enrichissement au niveau du sillon de division (Bultje et al., 2009). Une analyse de la distribution de mPar3 dans plus de 50 progéniteurs aRGs au moment de la division a révélé une distribution asymétrique (par rapport au plan de clivage) dans 50% des cas, conduisant à un héritage inégal de cette protéine dans les cellules filles. En utilisant des shRNAs dirigés contre mPar3, les auteurs observent une diminution de la fréquence des divisions asymétriques neurogéniques au profit de divisions symétriques terminales. A l'inverse, la surexpression de mPar3 favorise les divisions symétriques prolifératives, toujours au détriment des divisions asymétriques. Ainsi, ces résultats suggèrent que mPar3 semble impliquée dans la réalisation des divisions asymétriques dans une partie des progéniteurs aRGs, et que la quantité de mPar3 héritée dans les cellules filles influence l'acquisition de leur identité. Les auteurs investiguent en parallèle l'activité de la voie de signalisation Notch dans les cellules filles, qu'ils montrent de façon indirecte être plus importante dans les cellules ayant hérité de la plus grande quantité de mPar3.

Enfin, dans les progéniteurs corticaux de souris en développement, la perte d'expression de Par3 (K.O conditionnel – cK.O) entraîne des malformations sévères du cortex, notamment une augmentation du volume cortical et d'importants changements dans les proportions des différents types de neurones (Liu et al., 2018). Dans un premier temps, les auteurs observent un effet pro-prolifératif pendant un temps restreint, associé à un changement du MDD d'asymétrique neurogénique vers symétrique prolifératif des progéniteurs aRGs au cours de la phase neurogénique précoce. Puis, ils observent un effet pro-neurogénique beaucoup plus massif, via une transition prématurée vers le mode de division symétrique terminal, ce qui mène à une surproduction des neurones des couches superficielles. Les auteurs montrent par la suite que ces effets sont médiés, en condition Par3 cK.O, par une modulation de l'activité de la voie de signalisation HIPPO liée à l'absence de Par3. Celle-ci est initialement fortement inhibée (favorise la prolifération), puis plus fortement activée (favorise la différenciation). Enfin, les auteurs montrent que cette régulation différentielle de l'activité de la voie HIPPO est (au moins en partie) sous le contrôle de la voie de signalisation Notch (Liu et al., 2018).

L'ensemble de ces résultats semble donc indiquer que les protéines de polarité pourraient influencer l'héritage asymétrique de déterminants du destin, dont l'effet sur l'acquisition de l'identité des cellules filles passe par une activation différentielle de voies de signalisation, en particulier de la voie Notch.

B.2.3 – L'orientation du fuseau mitotique

Parmi les mécanismes connus permettant la ségrégation asymétrique de déterminants du destin, l'orientation du fuseau mitotique est certainement l'un des plus étudiés.

Dans le SNC en développement de la drosophile, la ségrégation asymétrique des déterminants de l'identité lors de la division cellulaire des neuroblastes nécessite une coordination entre distribution polarisée des déterminants et orientation du fuseau mitotique (Morin and Bellaïche, 2011). Dans ce contexte, l'orientation du plan de clivage représente un mécanisme essentiel permettant d'assurer le bon déroulement d'un mode de division asymétrique (Kraut et al., 1996).

Ce phénomène a été observé dans d'autres types de divisions cellulaires asymétriques, chez les invertébrés (Par exemple : les cellules souches germinales mâles de la drosophile - Pereira and Yamashita, 2011) et les vertébrés (Par exemple : les progéniteurs de la peau de souris - Morin and Bellaïche, 2011). Dans ces contextes non neurogéniques, des défauts de l'orientation et/ou du positionnement du fuseau mitotique corrélerent avec des défauts de détermination du destin. Ces arguments ont conduit à l'appréciation générale que l'orientation du fuseau mitotique joue un rôle causal dans le succès des divisions cellulaires asymétriques.

Dans le SNC des vertébrés en développement, la très grande majorité des cellules progénitrices réalisent leur division au niveau de la surface apicale avec un plan de clivage vertical, c'est-à-dire perpendiculaire à la surface apicale. Au cours de l'avancée dans la neurogenèse apparaissent de façon croissante (mais toujours minoritaire) des cellules adoptant un plan de clivage oblique (Chenn and McConnell, 1995; Shitamukai et al., 2011). Chez les vertébrés, malgré une large conservation des acteurs moléculaires participant à l'orientation du fuseau mitotique, cette orientation n'est pas le mécanisme principal de la détermination du mode de division adopté par les progéniteurs neuraux. Dans le cortex de souris et la moelle épinière de poulet en développement, l'augmentation de la fréquence des divisions comportant un plan de clivage oblique via la randomisation de l'orientation du fuseau par perte de fonction d'acteurs tels que Pins ou NuMA n'entraîne pas de perturbation de la neurogenèse, mais provoque la dispersion des progéniteurs dans la SVZ (Konno et al., 2008; Morin et al., 2007).

On notera ici que dans les cortex gyrencéphaliques, tels que le furet, où l'on trouve une forte quantité de bRGs, on observe également une plus grande fréquence de divisions obliques, ce qui suggère que le plan de clivage oblique dans ces espèces est un mécanisme permettant de séparer spatialement les cellules sœurs de type bRG et aRG (deux types cellulaires distincts sur le plan morphologique, mais très proches moléculairement et en termes de potentiel prolifératif) issues de la division d'une aRG. Il y a alors bien dans ce cas une asymétrie de destin entre ces cellules sœurs associée à l'orientation du fuseau mitotique. Incidemment, on notera aussi que le modèle d'asymétrie d'héritage du récepteur Notch après des divisions horizontales proposé dans l'article de Chenn et McConnell évoqué au début de ce chapitre se basait sur des expériences réalisées chez le furet, et il est tentant aujourd'hui de penser que les divisions

décrites dans ce papier étaient des divisions asymétriques produisant une aRG et un bRG, plutôt que des divisions produisant un progéniteur prolifératif et un neurone post-mitotique comme le pensaient alors les auteurs.

Au-delà de l'orientation, certains déterminants du destin vont se servir des structures permettant la mise en place du fuseau pour ségréger de manière inégale lors de la division cellulaire. Le centrosome en particulier, est un des acteurs bien identifiés dans ce contexte

B.2.4 – L'asymétrie intrinsèque du fuseau mitotique : le centrosome

La mise en place du fuseau mitotique au cours de la mitose est assurée chez de nombreux eucaryotes par le centrosome. Ce dernier est un organite non-membranaire associé au noyau, et dont le rôle principal est l'organisation des microtubules (MTOC = MicroTubule Organizing Center). Le centrosome est composé de deux centrioles d'âges différents (1 centriole père, 1 centriole fils) qui accumulent différemment les constituants péricentriolaires (PCM = PeriCentriolar Material), ce qui en fait une structure intrinsèquement asymétrique. Au cours de la phase S, le centrosome se réplique de manière semi-conservative : chaque centriole composant le centrosome donnera naissance à un nouveau centriole. Ceci implique que le fuseau mitotique mis en place lors de la division présente un pôle contenant un centrosome « jeune » (centriole fils initial + nouveau centriole produit) et un pôle arborant un centrosome « vieux » (centriole père initial + nouveau centriole produit) (Holland et al., 2010).

Dans les neuroblastes de la drosophile, certains travaux ont montré une asymétrie fonctionnelle des deux centrosomes au cours de l'interphase. En effet, le centrosome jeune maintient une capacité de nucléation des microtubules, qui est au contraire perdue par le centrosome vieux. Cette différence de capacité de nucléation facilite l'orientation du fuseau mitotique selon l'axe de polarité apico-basal intrinsèque du neuroblaste, car le centrosome jeune (actif dans la nucléation) reste ancré au niveau du cortex apical. Après la mitose, le centrosome jeune se retrouve dans la cellule fille la plus apicale, qui conservera le statut de neuroblaste. A l'inverse, la cellule fille ayant hérité du centrosome vieux se différenciera en cellule GMC (Ganglion Mother Cell) (Sunchu and Cabernard, 2020). Bien qu'aucun déterminant d'identité associé à l'âge du centrosome n'ait été identifié dans les neuroblastes de drosophile, cet héritage asymétrique des centrosomes, également observé dans les cellules souches germinales mâles et femelles chez la drosophile, a suggéré que ce phénomène pourrait être conservé dans d'autres modèles de division asymétrique, y compris dans le CNS des vertébrés.

Au cours de la neurogenèse corticale murine il a ainsi été montré dans les progéniteurs aRGs réalisant des divisions asymétriques, grâce à un marquage différentiel des centrosomes « jeune » et « vieux » par l'utilisation d'une protéine Centrin1 (constituant des centrosomes) fusionnée à une protéine photo-convertible, que le centrosome contenant le centriole père initial est préférentiellement hérité par le futur progéniteur, tandis que le centrosome moins mature est hérité par la cellule au destin neurogénique (Wang et al., 2009). De plus, à travers la suppression de l'expression de Ninein (une protéine impliquée dans la maturation des centrioles) par shRNA, les mêmes auteurs perturbent la maturation des centrioles afin d'obtenir des centrosomes d'âges « plus équivalents » (deux centrosomes jeunes en l'occurrence). Dans ces conditions, ils observent que cette perturbation de la distribution asymétrique de centrosomes d'âges différents entraîne une déplétion prématurée de la VZ, associée à une augmentation de l'expression de marqueurs neuronaux (Tuj1) dans ces cellules. Ainsi est mis en évidence une

corrélation entre l'âge des centrosomes/centrioles hérités dans les cellules filles et l'acquisition d'une identité particulière. Contrairement à ce qui est observé dans les neuroblastes de drosophiles (centrosome jeune hérité par la cellule qui reste progénitrice), c'est ici l'héritage du centrosome vieux qui est corrélé à l'acquisition d'un statut prolifératif. Ainsi, le mécanisme de ségrégation asymétrique de centrosomes d'âges différents semble conservé entre invertébrés et vertébrés, mais les destins acquis à l'issue de l'héritage du centrosome jeune ou vieux semblent être différents selon les contextes.

Dans ce contexte neurogénique d'héritage asymétrique de centrosomes d'âges différents, des travaux d'imagerie en live sur des tranches organotypiques de télencéphale dorsal de souris ont révélé que la membrane entourant le cil primaire (nucléée par le « vieux » centrosome) peut, dans certains cas peu fréquents, rester accrochée au « vieux » centrosome lors de la mitose et permettre une émission plus rapide du cil primaire dans la cellule recevant le « vieux » centrosome. Ceci permettrait une activation de la voie de signalisation Shh (médiée par le cil) plus précocement que dans la cellule sœur (Paridaen et al., 2013). Le centrosome « jeune », hérité par la seconde cellule fille, ne s'ancre pas à la membrane et participe aux processus de délamination, différenciation et migration hors de la zone ventriculaire.

Des travaux réalisés dans le laboratoire ont montré que la protéine Mib1 (Mindbmb1 – fusionnée à une protéine GFP pour suivre sa localisation), une ubiquitine ligase impliquée dans la régulation de la voie de signalisation Notch et exprimée dans les progéniteurs neuraux, s'associe préférentiellement avec le centrosome « jeune » et impose (de manière causale) un destin neurogénique à la cellule fille qui en héritera lors de divisions asymétriques (Tozer et al., 2017). Dans ce contexte, Mib1 possède un rôle de déterminant du destin cellulaire, et utilise l'asymétrie intrinsèque du fuseau mitotique comme un moyen de ségréger différenciellement entre les deux cellules filles. Lors de la réalisation de divisions symétriques, une réserve de Mib1 est libérée depuis l'appareil de Golgi et vient s'agréger autour du « vieux » centrosome qui en est initialement dépourvu, restaurant ainsi une symétrie entre les deux centrosomes (Tozer et al., 2017). Un mécanisme de compensation similaire par stockage dans les organites pourrait exister pour d'autres protéines du centrosome localisées de manière asymétrique, et permettre le passage entre divisions prolifératives symétriques et divisions neurogéniques asymétriques.

B.2.5 – Le pied basal

Le pied basal est un prolongement cytoplasmique émis par les progéniteurs neuraux et qui les relie à la membrane basale. Au cours du développement du SNC, le pied basal sert notamment de structure de support pour la migration des neurones. Au cours de la division cellulaire, l'attachement basal persiste, et lors de la cytokinèse, il peut être équitablement distribué entre les deux cellules filles (répartition symétrique) ou bien n'être hérité que par l'une des deux cellules (répartition asymétrique).

Bien que le pied basal soit principalement décrit pour son rôle dans la migration des neurones, certains travaux ont mis en lumière une autre fonction dans la régulation du destin cellulaire. En effet, une étude a relevé une corrélation entre héritage asymétrique du pied basal et acquisition d'identités différentes dans les cellules filles. Tsunekawa et collaborateurs ont montré dans le cortex de souris en développement que l'ARNm de CyclinD2 est activement

transporté vers le pied basal, traduit localement, et que la protéine est héritée de manière inégale entre les deux cellules filles lorsque le pied basal est ségrégué asymétriquement lors de la division. Cet héritage inégal est associée à un maintien dans le cycle cellulaire de la cellule en héritant (Tsunekawa et al., 2012).

Ainsi, ces différents mécanismes participent au cours de la neurogenèse embryonnaire à la régulation cellulaire des modes de division. Initialement focalisé sur l'identification de molécules uniques comme déterminant d'identité cellulaire, le champ de recherche (toujours extrêmement actif) s'est progressivement intéressé à la ségrégation asymétrique de structures plus complexes tels que les organites. Par exemple, il a été observé dans les cellules épithéliales de glandes mammaires humaines réalisant des divisions asymétriques, une ségrégation spécifique des mitochondries les plus âgées dans la cellule fille qui se différenciera (Katajisto et al., 2015 - **Figure 15**). D'autres déterminants ségrégués asymétriquement dans des contextes divers, tels que le corps central (midbody), les chromatides sœurs (Ranjan et al., 2019) ou encore des protéines histones spécifiques (Wooten et al., 2020), seront certainement étudiés dans le contexte de la neurogenèse à l'avenir.

L'existence de mécanismes cellulaires régissant la mise en place et l'exécution de la division asymétrique au cours de la neurogenèse nous amène à poser la question suivante : existe-il un autre niveau de régulation, situé plus en amont des mécanismes cellulaires, de la mise en place des divisions asymétriques ? Ou en d'autres termes, existe-t-il une régulation moléculaire permettant la transition d'un mode de division prolifératif vers neurogénique ?

Partie C : Régulation moléculaire de la transition des modes de division

La question de la régulation moléculaire de la transition d'un mode de division symétrique prolifératif vers asymétrique neurogénique constitue le cœur de mon projet de thèse. Ainsi, au cours de la prochaine partie, nous verrons que l'existence d'une telle régulation est supportée par deux arguments : une apparente quasi irréversibilité entre les différents modes de division symétrique prolifératif – asymétrique neurogénique – symétrique terminal, ainsi que l'existence de programmes transcriptomiques différents entre progéniteurs prolifératifs et neurogéniques. Enfin, je discuterai des avancées technologiques permettant d'identifier les différences plus subtiles existantes entre les différents types de progéniteurs

C.1 – Arguments en faveur de l'existence d'une régulation moléculaire

C.1.1 – Absence de réversibilité des modes de division

Dans un paragraphe précédent (A.2) j'ai décrit l'évolution des modes de division au cours de la neurogenèse à l'échelle tissulaire. Intéressons-nous maintenant à la séquence de ces modes de division à l'échelle cellulaire.

Dans le cerveau de rat en développement, les études pionnières réalisées par Noctor et collaborateurs, combinant marquage sporadique *in utero* de progéniteurs aRGs de la VZ par injection d'un rétrovirus codant pour une protéine GFP et analyse de la taille et de la composition des clones (basée sur des critères morphologiques et moléculaires) par imagerie live et/ou sur des tranches sériées de cerveau, n'observent pas de retour à un MDD symétrique prolifératif après la transition vers un mode asymétrique neurogénique (Noctor et al., 2004,

2001). Cependant, l'étude de la réversibilité n'était pas le sujet de ces travaux, et le nombre de clones analysés permettant de tester cette hypothèse reste plutôt faible.

Également, les analyses clonales conduites par deux études dans le néocortex de souris en développement indiquent une production unitaire d'un nombre moyen de 8-9 neurones par progéniteur aRG lors de leur entrée en phase neurogénique (Gao et al., 2014; Llorca et al., 2019). Ce nombre relativement homogène de cellules filles produites par progéniteur suggère une absence de retour vers un mode prolifératif après un passage vers un MDD asymétrique neurogénique. En cas de réversibilité des modes de division, une plus grande diversité dans la taille des clones aurait été observée. Ces résultats confortent donc l'idée d'une progression selon une transition définitive, sans réversibilité.

Il existe tout de même quelques contextes dans lesquelles de rares observations de réversibilité ont été décrits. Ainsi, dans la rétine de poisson-zèbre en développement, une étude basée sur le marquage de progéniteurs individuels et le suivi de leur descendance par imagerie en-live *in vivo* a identifié quelques cas de divisions symétriques prolifératives à la suite de divisions asymétriques neurogéniques (He et al., 2012b). Également, plusieurs études conduites sur des progéniteurs corticaux de souris cultivés *in vitro* ont rapporté l'existence de quelques cas de retour vers un mode de division symétrique prolifératif à la suite d'une division asymétrique neurogénique (revue dans Fischer and Morin, 2021). Dans leur ensemble, ces résultats d'analyses clonales montrent une quasi irréversibilité des modes de divisions au cours du développement du SNC. Ceci semble indiquer qu'au cours de la neurogenèse embryonnaire, les deux types de progéniteurs (prolifératifs VS neurogéniques) correspondent à deux étapes distinctes et successives du programme de développement neural.

C.1.2 – Gènes différenciellement exprimés entre progéniteurs symétriques prolifératifs et asymétriques neurogéniques : études transcriptomiques comparatives

Au cours de la neurogenèse embryonnaire des vertébrés, les progéniteurs réalisant les différents MDD symétrique prolifératif, asymétrique neurogénique et symétrique terminal coexistent spatialement et temporellement. Dans la partie A.1 (Identification des différents modes de division au cours de la neurogenèse), nous avons vu que l'équipe du professeur Huttner a identifié l'expression de l'ARNm du gène Tis21 comme un marqueur discriminant progéniteur prolifératif (Tis21-négatif) et neurogénique (Tis21-positif). Bien qu'il ne semble pas posséder de fonction majeure dans le cadre de l'exécution de la transition entre les modes de division, plusieurs études ont tiré avantage de l'expression de Tis21 pour discriminer les populations progénitrices VS neurogéniques et étudier leurs transcriptomes.

Dans une première étude transcriptomique *in vivo* publiée en 2011, Arai et collaborateurs ont purifié des progéniteurs corticaux murins Tis21-GFP négatifs VS positifs (provenant du modèle murin Tis21-GFP décrit précédemment) au stade embryonnaire E14.5 et ont réalisé une analyse transcriptomique par puces à ADN sur ces différents types de progéniteurs (Arai et al., 2011). Ils identifient de nombreux gènes différenciellement régulés entre les deux populations progénitrices, notamment des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, le remodelage de la chromatine et la progression dans la neurogenèse. Ainsi et pour la première fois, il est mis clairement en évidence l'existence de programmes transcriptionnels différents entre progéniteurs prolifératifs et neurogéniques.

Lors d'une autre étude, Aprea et collaborateurs ont généré une lignée murine transgénique Tis21^{RFP}/Tubb3^{GFP} pour discriminer des populations de progéniteurs se divisant selon les MDD symétrique prolifératif (Tis21^{RFP} négatifs /Tubb3^{GFP} négatifs), asymétrique neurogénique (Tis21^{RFP} positifs /Tubb3^{GFP} négatifs) et symétrique terminal (Tis21^{RFP} positifs /Tubb3^{GFP} positifs) (Aprea et al., 2013). Ils ont utilisé cette lignée pour étudier le transcriptome de ces différentes populations au stade embryonnaire E14.5. Entre les progéniteurs symétriques prolifératifs et asymétriques neurogéniques, les auteurs observent que l'expression d'environ 10% des gènes détectés varie de manière significative. De façon très intéressante, ils observent que les gènes dont l'expression varie (à la hausse ou à la baisse) lors de la transition symétrique prolifératif → asymétrique neurogénique continuent d'évoluer dans la même direction lors de la transition asymétrique neurogénique → symétrique terminal, ce qui renforce l'idée de l'existence d'un programme séquentiel suivi par les progéniteurs. L'analyse « Gene Ontology » (GO) des gènes différentiellement régulés entre la population asymétrique neurogénique et les populations symétriques prolifératives et symétriques terminales a révélé une prépondérance de termes liés à la différenciation neuronale, à l'axo-dendrogenèse, la transmission synaptique, le transport d'ions et, non sans rappeler les travaux d'Arai et collaborateurs, le cycle cellulaire. Parmi les gènes différentiellement régulés à la hausse dans la population asymétrique neurogénique (par rapport aux deux autres populations) sont retrouvés sans surprise des gènes impliqués dans la neurogenèse tels que Tbr2, Neurog2, Emx1, et bien évidemment Tis21. Plus surprenant, les auteurs observent un enrichissement de l'expression de certains longs ARNs non-codants (LncRNAs). Ils identifient en particulier quatre LncRNAs (connus sous les noms de 9630028B13Rik, Schip1, Gm17566 et Miat) qui, lorsque surexprimés dans le cortex murin en développement à E13.5, entraînent une diminution de la production de neurones (quoique plus faible dans le cas de Miat) 48h plus tard. Cet effet contre-intuitif est discuté par les auteurs, qui n'investiguent pas en profondeur les mécanismes sous-tendant ce phénomène.

Enfin, dans une autre étude, Pinto et collaborateurs discriminent deux sous-types de progéniteurs aRGs dans le cortex de souris en développement au stade E14 selon leur niveau d'expression d'un transgène GFAP-GFP (GFAP = Glial Acidic Fibrillary Protein, gène spécifiquement exprimé dans les aRGs - Pinto et al., 2008). Ce travail part du postulat que le sous-type d'aRG exprimant fortement le transgène (GFP^{High}) correspond à une population quasi-strictement symétrique proliférative, alors que le second sous-type (GFP^{Low}) correspond aux aRGs neurogéniques asymétriques. Les auteurs déterminent les transcriptomes de ces deux populations par analyses sur puces à ADN, et, comme dans l'étude précédente, observent environ 10% des gènes détectés présentant des variations significatives de leur expression entre les deux populations prolifératives et neurogéniques. Les auteurs décident par la suite de se concentrer uniquement sur les gènes dont les variations d'expression sont les plus fortes et de procéder à une analyse de fonction *in silico* de ces gènes (GO). Les fonctions identifiées sont semblables à celles décrites lors des études précédentes : différenciation neuronale, neuro/gliogenèse, transmission synaptique, cycle cellulaire ...

Des travaux du même groupe ont par la suite caractérisé l'un des gènes différentiellement exprimé dans leur précédente étude, le gène *Trnp1*, comme un régulateur de l'expansion du cortex cérébral à travers la modulation des modes de division (Stahl et al., 2013). Ce gène a été identifié comme up-régulé dans la population des progéniteurs prolifératifs lors de leur étude. Ainsi, dans le cortex murin en développement, la surexpression de *Trnp1* entraîne une augmentation des divisions prolifératives et une expansion corticale tangentielle. A l'inverse, la suppression de son expression favorise la génération de progéniteurs intermédiaires et bRGs, associée à une expansion radiale.

Ainsi, ces différentes études de transcriptomiques comparatives, sur populations triées ou non, ont posé les premières bases d'une régulation moléculaire de la transition symétrique

prolifératif vers asymétrie neurogénique, en identifiant des gènes différentiellement exprimés entre ces deux populations. Bien que de nombreux candidats potentiels à cette régulation aient été identifiés, très peu ont paradoxalement été validés de manière fonctionnelle, que ce soit *in vivo* ou dans des modèles *in vitro*.

Cependant, ces approches en bulk permettent de mettre en lumière les différences « fortes » existantes entre les différentes populations mais des différences plus subtiles (par exemple au niveau de la transition du MDD) pourraient possiblement être « écrasées » par des données d'expression géniques moyennées et donc difficile à observer. L'avènement des techniques de séquençage à l'échelle de la cellule unique (single-cell RNA-seq) devrait permettre d'adresser cette question de la transition avec un niveau de résolution bien supérieur.

C.2 – Analyses transcriptomiques à l'échelle cellule-unique : une stratégie prometteuse pour identifier la régulation des modes de division

Récemment, l'avènement de la technologie scRNA-seq, permettant l'étude du transcriptome à l'échelle de la cellule individuelle, a révolutionné bon nombre de domaines biologiques. Cette technique possède bien des avantages sur les méthodes « en-bulk » employées précédemment.

En particulier, deux avantages sont particulièrement intéressants dans le cadre de la question qui nous intéresse :

Le premier est la possibilité d'étudier l'hétérogénéité dans une population qui pourrait être a priori considérée comme homogène. Dans le cadre des méthodes en-bulk, cette hétérogénéité intra-populationnelle est totalement écrasée par les différences les plus fortes observées entre les populations. Or nous avons vu précédemment que les progéniteurs symétriques prolifératifs et asymétriques neurogéniques présentaient une proximité transcriptionnelle assez forte. Ainsi, les différences plus subtiles devraient donc être plus facilement identifiables à l'aide de la technologie scRNA-seq.

Le deuxième avantage est la possibilité d'étudier des séquences d'évènements au cours d'un processus biologique et de les reconstruire selon des axes « pseudo-temporels » de manière non-supervisée. Ce type d'approche permet non seulement de mettre en évidence des différences entre populations, mais également de suivre l'aspect temporel pour déchiffrer des trajectoires de développement, et en particulier la trajectoire des modes de division, de symétrique prolifératif → asymétrique neurogénique → symétrique terminal.

Ces deux avantages méthodologiques ont été mis à profit par de nombreuses équipes, dans des études ayant pour objectifs de déchiffrer les mécanismes régulant la neurogenèse embryonnaire et le développement du SNC, à des niveaux de résolution sans précédent. Par exemple, les travaux pionniers de Delile et collaborateurs ont permis de générer un atlas d'expression génétique de très haute résolution de la diversité des progéniteurs et neurones au cours du développement des régions cervicales et thoraciques du tube neural murin en développement (aux stades embryonnaires E9.5/10.5/11.5/ 12.5 /13.5 - (Delile et al., 2019a)). Plus récemment, le même laboratoire a réalisé des analyses du même type sur les régions cervicales et thoraciques de tube neural d'embryons humains (Rayon et al., 2021), et d'autres études de caractérisation de ces différentes populations progénitrices et neuronales ont été récemment publiées (Andersen et al., 2023; Li et al., 2023).

Une autre étude menée sur des progéniteurs isolés, issus du domaine pMN du tube neural de poisson-zèbre en développement, a permis de révéler l'existence de deux types différents de progéniteurs au sein du domaine pMN, l'un produisant des neurones, et l'autre produisant des cellules précurseurs d'oligodendrocytes (Scott et al., 2021). Ceci indique que la technologie « transcriptomique cellule-unique » permet de révéler les différences existantes dans une population que l'on pourrait croire homogène à un niveau de résolution jamais atteint auparavant. Une étude plus récente pousse la séparation encore plus loin et identifie, toujours dans le domaine pMN, trois sous-populations de progéniteurs de motoneurones aux profils d'expression différents, qui semblent conservés entre la souris, le poulet et l'homme (Liau et al., 2023).

En plus d'identifier de nouveaux marqueurs pour différentes populations de progéniteurs et/ou neurones, l'aspect cellule-unique couplé à l'analyse de différents stades embryonnaires permet de recréer une « pseudo-neurogenèse » le long d'un axe pseudo-temporel. Ceci permet d'apprécier les différentes trajectoires développementales empruntées par les progéniteurs vers leur différenciation en types spécifiques de neurones. Ainsi, de nombreuses études de caractérisation transcriptomique à l'échelle cellule-unique ont été menées chez la souris, dans la région corticale en développement (Par exemple : Moreau et al., 2021; Telley et al., 2019, 2016). Ces études ont non seulement caractérisé les différents types de neurones composant cette région et retracé leurs origines (trajectoires) développementales, mais ont également permis de déchiffrer les contributions respectives des aspects temporels et spatiaux dans l'établissement des différentes identités neuronales dans le cortex en développement.

Ainsi, l'avènement des analyses transcriptomiques à l'échelle cellule-unique et le niveau de résolution de ces méthodes offre la possibilité de répondre à la question du programme transcriptomique sous-tendant la transition d'un mode de division symétrique prolifératif vers asymétrique neurogénique. Malgré la sensibilité de cette méthode, plusieurs difficultés restent néanmoins d'actualité :

L'absence de marqueurs identifiés, en dehors de Tis21, permettant la discrimination de ces deux populations de progéniteurs. Il est plus facile de mettre en lumière des différences fines/subtiles entre des populations bien caractérisées, par exemple par l'expression de plusieurs marqueurs moléculaires spécifiques.

L'existence de facteurs confondants (patterning, cycle cellulaire ...) qui pourraient masquer l'émergence de signatures transcriptionnelles entre les progéniteurs symétriques prolifératifs et asymétriques neurogéniques en analyse non supervisée.

Ainsi, même en analyse scRNA-seq, il est probable que des pipelines d'analyse dédiés soient nécessaires afin d'identifier les signatures transcriptionnelles des progéniteurs prolifératifs versus neurogéniques. Pour rappel, les études en bulk ont montré une grande similarité transcriptomique entre les progéniteurs prolifératifs et neurogéniques. Ainsi, faire émerger cette différence est extrêmement difficile dans des études où des facteurs tels que le sexe, la phase de cycle cellulaire dans laquelle se trouve les cellules, ou encore les programmes transcriptomiques de détermination de l'identité (patterning) sont autant de facteurs très différents entre les cellules, qui vont avoir un poids de ségrégation très fort lors des analyses. Même s'il existe des méthodes pour « éteindre » ou diminuer le poids de ces facteurs confondants, elles ne sont parfois pas suffisantes pour faire émerger les différences attendues. De plus, il se peut tout à fait qu'en fonction du contexte, ces facteurs confondants participent (en partie ou pleinement) à la différence à mettre en lumière. Par conséquent, il est possible que

des stratégies d'analyse visant à filtrer ces éventuels facteurs confondants aboutissent simultanément à écraser les signaux recherchés, ce qui complique les choix à faire dans une stratégie d'analyse.

Chapitre III : Cycle cellulaire et neurogenèse

Le cycle cellulaire est un processus biologique complexe, dont la régulation est capitale au cours du développement, notamment dans le cadre du contrôle de la balance entre prolifération et différenciation qui permet de produire la diversité cellulaire composant les différents organes. A l'âge adulte ce processus cellulaire assure le maintien de l'homéostasie tissulaire. Une altération des paramètres du cycle cellulaire est impliquée dans de nombreuses pathologies développementales et de types cancéreuses.

Au cours de la neurogenèse, la régulation de la balance prolifération/différenciation via le cycle cellulaire pourrait être envisagée de façon simple à la manière d'un interrupteur : une cellule reste dans le cycle et continue de proliférer (progéniteur), ou quitte le cycle et se différencie (neurone). Les mécanismes contrôlant le cycle cellulaire maintiendraient les cellules cyclantes pour produire le bon nombre de cellules au bon moment, et réguleraient leur sortie de cycle afin d'induire leur différenciation. Cependant, le rôle du cycle cellulaire dans cette balance entre différenciation et prolifération est bien plus complexe que cette régulation binaire On/Off. En effet, 1) les acteurs du cycle participent eux-mêmes à l'acquisition de destin cellulaire spécifique, parfois par un rôle indépendant de leur fonction régulatrice du cycle, 2) une sortie de cycle n'est pas forcément couplée à la différenciation (et vice versa – voir chapitre I, section D.4). Ces notions illustrent le dialogue complexe entre facteurs proneuraux et régulateurs du cycle cellulaire.

Récemment, un rôle crucial de la dynamique du cycle cellulaire dans l'acquisition d'un destin différencié a émergé de nombreuses études (Dalton, 2015; Lange and Calegari, 2010; Liu et al., 2019). En effet, une abondante littérature décrit une corrélation entre phases du cycle cellulaire, leur durée et programme de différenciation dans différents contextes. Ainsi dans les cellules souches embryonnaires, l'identité endodermique est privilégiée en « early » G1 (début de G1) et inhibée en « late » G1 (fin de G1) en faveur de l'identité neuro-ectodermique. Cette fonction est accomplie via la cycline D1, qui se lie à Sp1 et recrute une histone acétylase et une histone désacétylase (via E2F), pour réprimer l'identité endodermique (Pauklin et al., 2016). Un autre exemple dans le contexte de la neurogenèse : lorsque de jeunes neurones sont transplantés dans un hôte plus âgé, ils ne pourront acquérir un destin hôte que s'ils sont transplantés en phase S (Bohner et al., 1997). A l'inverse, lorsqu'ils sont transplantés en phase G2/M, ils ne pourront pas participer au développement de l'hôte et garderont leurs caractéristiques d'origine. Pourquoi ce dernier niveau de complexité ? Existe-il des événements qui ne se produisent que lors de certaines phases du cycle, en lien avec l'acquisition d'un phénotype différencié ? Si oui, sont-ils liés à une modification de la dynamique de ces différentes phases ?

Ce sont ces questions que je vais illustrer particulièrement dans le cadre de la neurogenèse et dans ces prochains paragraphes, après un court rappel historique et une brève description des différents acteurs du cycle cellulaire.

Partie A : Le cycle cellulaire eucaryote et sa régulation : aspect historique

Le cycle cellulaire est décrit actuellement comme étant composé de quatre phases : deux phases de gap (G1 et G2) entourant la phase de synthèse de l'ADN (ou phase S,) et la phase M pendant laquelle survient la mitose. Ces quatre phases se succèdent dans un ordre défini, créant ainsi un cycle qui se répète dans le même ordre lors des cycles suivants.

La première notion de processus cyclique lors de la prolifération cellulaire a été mise en évidence en 1882. Walther Flemming, via l'observation de cellules de salamandre en prolifération, a été le premier à révéler l'existence d'une étape de condensation d'un matériel dense appelé chromosome (avant même de savoir que ces chromosomes étaient le support du matériel génétique) préalablement à la division cellulaire. Il illustre ses observations à travers de formidables dessins (Flemming, 1882; Uzbekov and Prigent, 2022 - **Figure 1**).

Il oppose cette étape de condensation à une période pendant laquelle les chromosomes ne sont pas visibles qu'il appelle période intermédiaire, et qui est appelée aujourd'hui interphase.

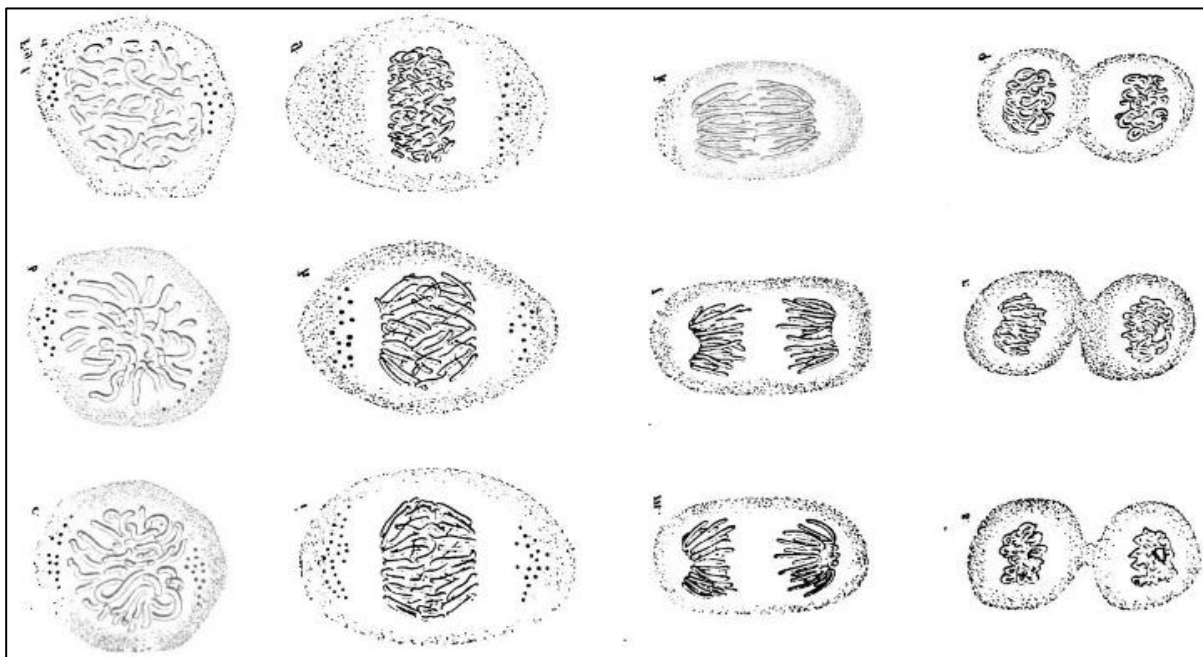


Figure 16 : condensation de la chromatine et mitose. – dessins de Walther Flemming, 1882

Au milieu des années 1900, la description de l'interphase se raffine grâce à la mise au point de la technique d'autoradiographie par Alma Howard et Stephen R. Pelc (Pelc, 1947). En effet, ces chercheurs ont été les premiers à observer l'incorporation de Phosphore-32 dans le noyau de cellules cyclantes du méristème de la racine de haricot *Vicia faba*, uniquement pendant une fenêtre temporelle délimitée au cours de l'interphase (Howard and Pelc, 1951). Ils ont appelé cette phase « S » pour phase de synthèse. C'est donc à la suite de ces travaux que le cycle cellulaire sera décrit comme étant composé de 4 phases distinctes : deux phases de Gap (G1 - Gap1 et G2 – Gap2) entourant la phase S d'une part et la mitose d'autre part. (Howard and Pelc, 1953).

En 1954, Laszlo Lajtha et collaborateurs ont observé que le cycle cellulaire de cellules souches hématopoïétiques cultivées *in vitro* est également composé de quatre étapes, démontrant ainsi que l'organisation du cycle cellulaire est un processus conservé et universellement retrouvé chez les mammifères (Lajtha et al., 1954). La même équipe a également découvert que certaines cellules peuvent quitter le cycle cellulaire sans pour autant se différencier. Ces cellules entrent alors dans une phase de repos/quiescence, appelée G0, au cours de laquelle elles peuvent rester temporairement dans l'attente d'un signal mitogène leur indiquant de réintégrer le cycle cellulaire pour se diviser et/ou se différencier (Lajtha, 1963). Aux quatre phases du cycle se rajoute donc une phase G0 pendant laquelle les cellules sortent temporairement ou définitivement du cycle cellulaire.

A cette époque, une question reste sans réponse : comment et/ou par quels mécanismes moléculaires est établie la séquence immuable de ces phases ?

C'est à partir des années 1970, que cette question a partiellement trouvé une réponse, par la découverte des mécanismes de la régulation du cycle. En m'appuyant sur les travaux de trois équipes, celles de Leland Hartwell, Paul Nurse et Timothy Hunt, récompensés par le prix Nobel de physiologie ou médecine en 2001, je décrirai brièvement ces mécanismes.

1) La notion de check point entre les phases.

Les travaux de l'équipe de Leland Hartwell sur des souches mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* ont permis de mieux comprendre la séquentialité des phases, permettant au cycle cellulaire de se dérouler dans un ordre immuable $G1 \rightarrow S \rightarrow G2 \rightarrow M$. Ils ont mis en évidence une régulation fine de la transition entre ces phases, par ce qu'ils ont appelé « points de contrôle » ou « checkpoints », qui détectent les erreurs lors de la progression au cours du cycle, et interviennent alors pour ralentir ou empêcher la cellule de passer à l'étape suivante (Hartwell, 2002).

2) La régulation entre les phases est assurée par une activité kinase

Dans les années 1970, de nombreux chercheurs s'attèlent depuis plusieurs années à déterminer la nature d'un mystérieux facteur appelé MPF (Mitosis Promoting Factor – Facteur Promouvant la Mitose), dont le rôle, comme son nom l'indique, est de provoquer l'entrée de la cellule en mitose. Une première étape dans sa caractérisation a été établie entre autres par l'équipe de Paul Nurse (Nurse et al., 1976). En étudiant Cdc2, une protéine dont la mutation chez la levure *Schizosaccharomyces Pombe* favorise une entrée plus rapide en mitose, ils ont montré que cette protéine possédait une activité kinase régulant la transition entre les phases G2 et M, en phosphorylant des substrats dont la nature était encore inconnue (Nurse, 2002).

3) Découverte des cyclines

D'autre part Timothy Hunt et son équipe, qui étudiaient les processus de synthèse protéique dans les œufs d'oursins, font la découverte surprenante de protéines synthétisées pendant l'interphase avant chaque division, puis dégradées rapidement après chaque division, puis synthétisées à nouveau lors de l'interphase des cellules filles, et ainsi de suite ... qu'ils nomment « cyclines » lié au processus cyclique de leur synthèse/dégradation lors du cycle cellulaire (Hunt, 2002). Ils montrèrent par la suite que ces protéines jouent un rôle dans la régulation du cycle cellulaire.

Il faudra attendre l'année 1988 et la purification du facteur MPF par des laboratoires travaillant sur les ovocytes du Xénope *Xenopus laevis* pour assembler les pièces du puzzle. Ces travaux concilient les deux découvertes mentionnées ci-dessus. Le facteur MPF est en fait composé de deux entités : un homologue de la kinase Cdc2 de la levure, associé à une cycline. Ces travaux ont ainsi permis de décrypter le cœur du mécanisme contrôlant la progression du cycle cellulaire : une protéine kinase (par exemple Cdc2) appartenant à la famille des Cyclin Dependant Kinases (CDK) doit s'associer à une cycline pour devenir catalytiquement active, et ainsi phosphoryler des substrats. La temporalité très courte d'expression des différentes cyclines permet de limiter dans le temps l'action de la protéine kinase, qui est-elle présente tout au long du cycle cellulaire. Cette action durant une période très spécifique du cycle cellulaire permet ainsi de contrôler la progression séquentielle des phases et les transitions entre les phases (Uzbekov and Prigent, 2022).

Au cours des années 1990, la compréhension du fonctionnement du cycle cellulaire, notamment dans les cellules humaines, s'est grandement accélérée. D'une part, Il a été montré que différents couples de cyclines-CDKs contrôlent des transitions différentes, comme le couple cycline E-CDK2 régulant la transition G1/S, ou encore le couple cycline B-CDK1 contrôlant la transition G2/M. D'autre part, de nouveaux régulateurs du cycle cellulaire agissant directement sur les couples cyclines – CDKs ont été découverts au cours de cette décennie : la famille des CKIs (Cyclin-Dependent Kinases Inhibitors), la famille des phosphatases CDC25 ou bien encore les kinases inhibitrices Wee1 et Myt1.

Aujourd'hui chez les organismes eucaryotes supérieurs, une vingtaine de CDKs ont été identifiées, et une trentaine de cyclines sont connues. Bien que toutes les cyclines ne puissent pas s'associer avec toutes les CDKs, ces nombres importants soulignent la complexité de la régulation du cycle cellulaire. A l'heure actuelle, de nombreux scientifiques continuent d'explorer les mécanismes de contrôle du cycle cellulaire, et il y a fort à parier que notre connaissance de la régulation de ce processus fondamental qu'est le cycle cellulaire devrait se compléter et se complexifier dans les prochaines années (Uzbekov and Prigent, 2022).

Partie B : Le cycle cellulaire eucaryote et sa régulation

Nous avons vu précédemment que le cycle cellulaire eucaryote est constitué de 4 phases, G1 - S - G2 et M, qui se succèdent selon cet ordre immuable et se répètent tant qu'une cellule continue de proliférer. Cette caractéristique est principalement due à la fonction et aux propriétés des différents couples cycline-CDK pendant chaque phase et à leur régulation, que je décrirai brièvement dans la suite de ce paragraphe.

B.1 - Les principaux acteurs du cycle

B.1.1 - Les couples cyclines - CDKs

Les CDKs, sont exprimées tout au long du cycle cellulaire, bien qu'à des niveaux différents selon les phases. Ce sont des sérine-thréonine kinases, dont l'activité catalytique nécessite une liaison avec une cycline (Lee and Nurse, 1987). En absence de liaison avec leur partenaire, la structure tridimensionnelle des CDKs est telle que la fente catalytique (le site de liaison à l'ATP) est fermée, ce qui empêche l'activité enzymatique. Après liaison avec une cycline, des changements conformationnels libèrent la fente catalytique et permettant une phosphorylation activatrice de la CDK par la CAK (CDK-Activating Kinase). Le couple cycline – CDK activé peut alors lier les molécules d'ATP, et exercer son activité de progression et de transition de

phase à travers la phosphorylation de ses cibles. Lorsque la transition est terminée, le découplage de la cycline permet à la CDK de réadopter une configuration tridimensionnelle inactive (Malumbres, 2014).

Les cyclines sont des protéines caractérisées par un niveau d'expression « oscillant » au cours du cycle cellulaire. (Martínez-Alonso and Malumbres, 2020). Toutes les cyclines connues contiennent (au moins) un domaine protéique spécifique appelé « Cyclin Box Domain (CBD) », permettant la liaison et l'activation de leurs partenaires CDKs (Quandt et al., 2020). Cependant, toutes les cyclines ne se lient pas à toutes les CDKs. La spécificité de liaison entre certaines cyclines et CDKs est expliquée par des variations de séquences dans le domaine CBD, du nombre de domaines CBD par cycline, ou bien par le reste de la séquence protéique de la cycline (Quandt et al., 2020). Ainsi, des couples spécifiques de cycline – CDK contrôlent la progression dans le cycle cellulaire et des transitions de phases particulières.

L'oscillation des niveaux protéiques au cours du cycle permet la présence « au bon endroit et au bon moment » des différentes cyclines, et est assurée par une balance entre synthèse et dégradation, finement régulée par des mécanismes généraux et cyclines-spécifiques. Le schéma ci-après permet d'apprécier les niveaux d'expression des différentes cyclines dans les différentes phases du cycle (**Figure 17**).

Toutes les cyclines peuvent être ciblées vers le protéasome pour dégradation par l'ajout d'une chaîne d'ubiquitines, bien que les acteurs d'ubiquitination diffèrent d'une cycline à l'autre (Gopinathan et al., 2011; Murray, 2004). De plus, des séquences spécifiques propres aux différentes cyclines permettent leur dégradation rapide. Par exemple, les cyclines de type D et E contiennent une séquence appelée PEST, et les cyclines A et B possèdent une séquence « boîte de destruction ».

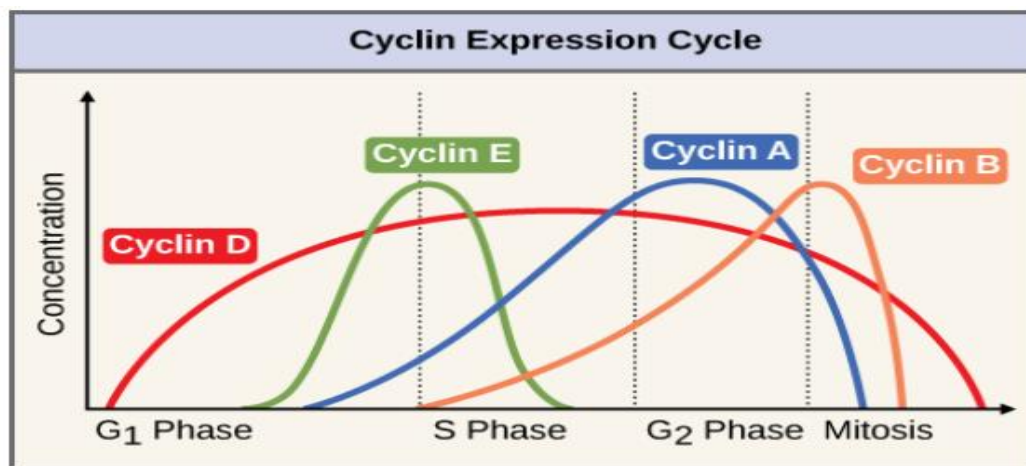


Figure 17 : Niveaux d'expression des différents types de cyclines en fonction des phases du cycle cellulaire. La concentration des différentes protéines cyclines évolue drastiquement au cours du cycle cellulaire, bien souvent après le passage d'un checkpoint. L'expression de la cycline E chute après le checkpoint G₁/S, celle de la cycline A après le checkpoint G₂/M, et celle de la cycline B après le checkpoint mitotique. L'expression des cyclines de type D en phase G₁ est dépendante de signaux mitogènes. Auteur du schéma = inconnu.

B.1.2 - Régulation de l'activité des couples cyclines – CDKs : le cœur de la régulation du cycle cellulaire

1) Régulation des couples cycline - CDK par phosphorylation inhibitrice/déphosphorylation activatrice

L'activité des complexes cycline - CDK est également modulée par un équilibre entre phosphorylation inhibitrice, les rendant inactifs pendant certaines phases du cycle, et de déphosphorylation activatrice, restaurant leur activité requise lors des phases suivantes.

La Famille des kinases WEE est principalement impliquée dans l'inhibition des couples cycline B – CDK1. Ces couples sont maintenus inactifs par la phosphorylation de deux résidus (thréonine14 et tyrosine15 sur CDK1) par les kinases WEE1 et MYT1. Chez les humains, cette famille est composée de 3 membres : PKMYT1 (plus connue sous le nom MYT1), WEE1 et WEE1B, ce dernier ne semblant pas avoir de rôle dans les cellules somatiques. Ainsi au cours de la phase G2, une forte activité des kinases de la famille WEE conduira à un ralentissement ou un arrêt du cycle (par inhibition des couples cycline B – CDK1), alors qu'une faible activité permettra à la cellule de s'engager vers la mitose (Schmidt et al., 2017).

Il est également à noter que, en condition de stress induit par une exposition aux UV, certains couples de cyclines – CDKs voient leur activité inhibée par phosphorylation. Par exemple, la phosphorylation de résidus spécifiques de CDK2, 4 et 6 peut conduire à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Blomberg and Hoffmann, 1999; Iavarone and Massagué, 1997; Terada et al., 1995). Cependant, la nature des kinases impliquées dans ce processus n'est pas connue. A l'inverse, les phosphatases CDC25 ont pour fonction de réaliser des déphosphorylations activatrices. Lorsque l'activité des CDK devient nécessaire à la progression du cycle cellulaire, ces phosphatases déphosphorylent spécifiquement les résidus thréonine14 et tyrosine15 phosphorylés sur les CDK, activant ainsi les complexes cycline - CDK. Cette famille des phosphatases CDC25, comprend trois membres chez les eucaryotes supérieurs : CDC25A, B et C. Ces protéines déphosphorylent les phosphorylations inhibitrices spécifiques présentes sur les différents couples cyclines – CDKs à des moments différents du cycle cellulaire. CDC25A participe à la progression de la phase G1/S par déphosphorylation des couples cycline E – CDK2, et à la transition G2/M par déphosphorylation des couples cycline B - CDK1. CDC25B et C quant à eux participent uniquement à la régulation de la transition G2/M, via la déphosphorylation de CDK1 (Abdelwahab et al., 2022).

2) Les Cyclin-Dependent Kinases Inhibitors (CKIs) : inhibiteurs de l'activité des CDKs

Les CKIs sont un ensemble de protéine dont le rôle principalement décrit dans la littérature est le contrôle négatif du cycle cellulaire, via l'inhibition de l'activité des CDKs. Classiquement, les CKIs sont réparties en 2 familles : INK4 et Cip/Kip selon leurs cibles dans le cycle cellulaire ainsi que leur structure protéique primaire.

La famille INK4 (INHibitors of Cdk4) est constituée de 4 membres : p16INK4a, p15INK4b, p18INK4c et p19INK4d. Les membres de cette famille sont synthétisés en réponse à des signaux antiprolifératifs, et inhibent spécifiquement CDK4 et 6 par liaison directe sur le domaine non-catalytique des CDKs, réduisant ainsi leur affinité pour les cyclines de type D. Ils sont des régulateurs importants de la phase G1 (Ortega et al., 2002; Schirripa et al., 2022) - **Figure 18**).

La famille Cip/Kip (CDK Interacting Protein/Kinase Inhibitory Protein) est constituée de p21^{Cip1}, p27^{Kip1} et p57^{Kip2}. Ces protéines inhibent l'activité cycline – CDKs par interaction directe avec les deux membres du couple (la CDK ET la cycline). Les protéines Cip/Kip peuvent se lier aux couples cyclines D – CDK4/6 et cyclines A/B/E – CDKs. Ainsi, et contrairement à la famille INK4, la régulation du cycle cellulaire par la famille Cip/Kip s'étend à l'ensemble du cycle cellulaire et ne se limite pas à la seule phase G1 (Schirripa et al., 2022) - **Figure 18**).

Bien qu'initialement décrits comme des inhibiteurs du cycle cellulaire, des fonctions pro-prolifératives dans des contextes physiologiques ont été rapportées pour p21^{Cip1} et p27^{Kip1}. Lorsqu'ils sont présents dans la cellule à de faibles niveaux protéiques, p21 et p27 s'associent aux couples cyclines D – CDKs 4/6 et facilitent leur localisation nucléaire et la progression du cycle cellulaire (Schirripa et al., 2022).

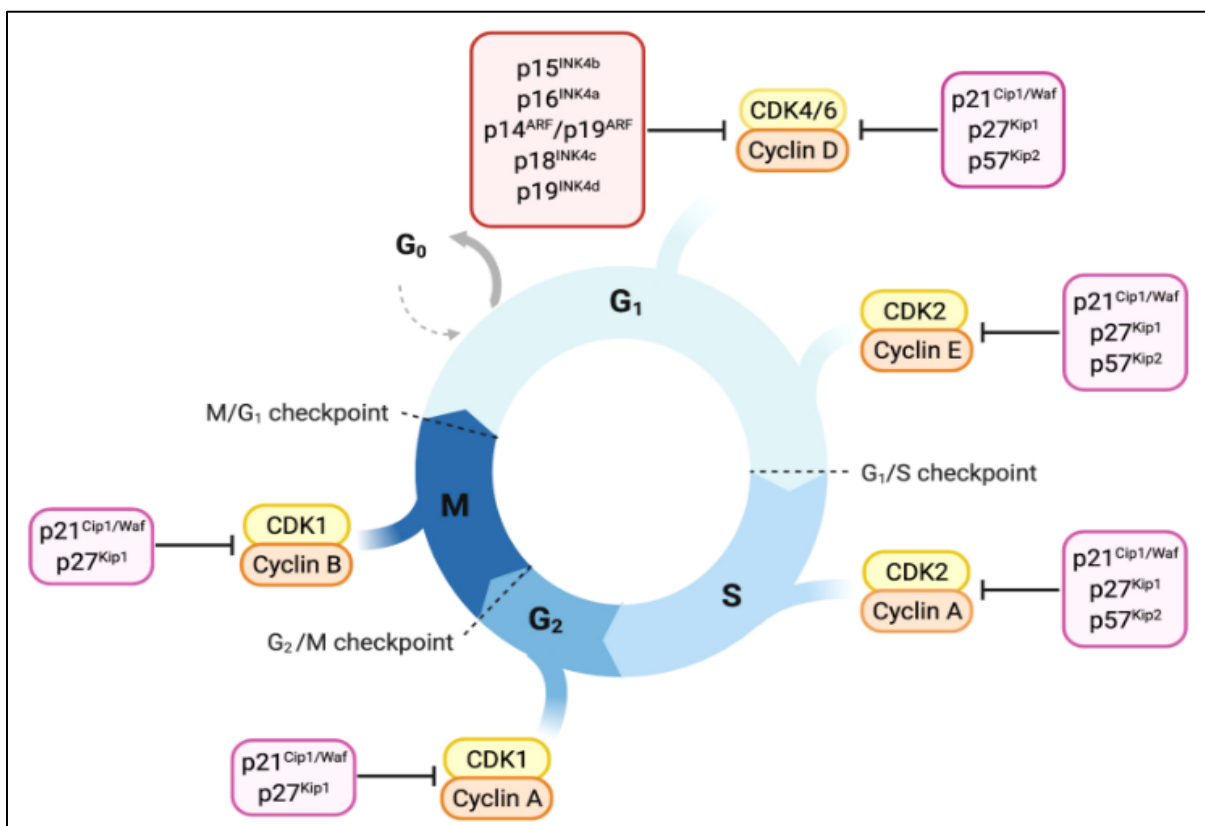


Figure 18 : Représentation schématique du contrôle du cycle cellulaire et de ses principaux régulateurs. La progression à travers les phases du cycle cellulaire est régie par différents complexes CDK-cycline et leurs inhibiteurs respectifs. Les inhibiteurs de la famille INK4 inhibent spécifiquement les complexes CDK4/6-cycline D, induisant l'arrêt du cycle cellulaire dans la phase G1. Les inhibiteurs Cip/Kip jouent leur rôle d'inhibiteurs du cycle cellulaire en s'opposant à un spectre plus large de complexes CDK-cycline. p21^{Cip1}/p27^{Kip1} et p57^{Kip2} freinent le cycle cellulaire au début et à la fin de la phase G1 par liaison aux complexes CDK4/6-cycline D ou CDK2-cycline E. Plus tard dans le cycle, ils peuvent lier et inhiber les complexes CDK1/2-cycline A, imposant ainsi un ralentissement pendant les phases S et G2. Enfin, p21^{Cip1} et p27^{Kip1} sont capables de retarder l'entrée dans la phase M en inhibant le complexe CDK1-cycline B. – Adapté de Schirripa et al., 2022

3) Les RPICs : une nouvelle famille de CKIs

Les protéines CKIs sont-elles mêmes finement régulées. Ainsi à titre d'exemple, il a été découvert récemment le rôle de certaines protéines ribosomales (RPs – Ribosomal Proteins) dans cette régulation lorsque celles-ci s'accumulent à l'extérieur des ribosomes (Bury et al., 2021). Cette nouvelle famille baptisée RPIC (Ribosomal Protein-Inhibiting CDKs) composée de nombreux membres (assez différents au niveau de leurs structures, cibles et modes d'action), possède un rôle de régulateur négatif dans la progression du cycle cellulaire par induction de l'expression de p21, de manière directe ou indirecte (par l'induction de l'expression de p53), ce qui aboutit à l'inhibition des différents couples cyclines – CDKs (**Figure 19 – A, B, C**). A l'inverse, des activités oncogènes ont été décrites pour certaines RPs, notamment en favorisant l'expression des cyclines D1/D3/B1/E1, de CDK1, ou par l'inhibition de l'activité de p27 (Bury et al., 2021; Zhou et al., 2015) - **Figure 19 – D**).

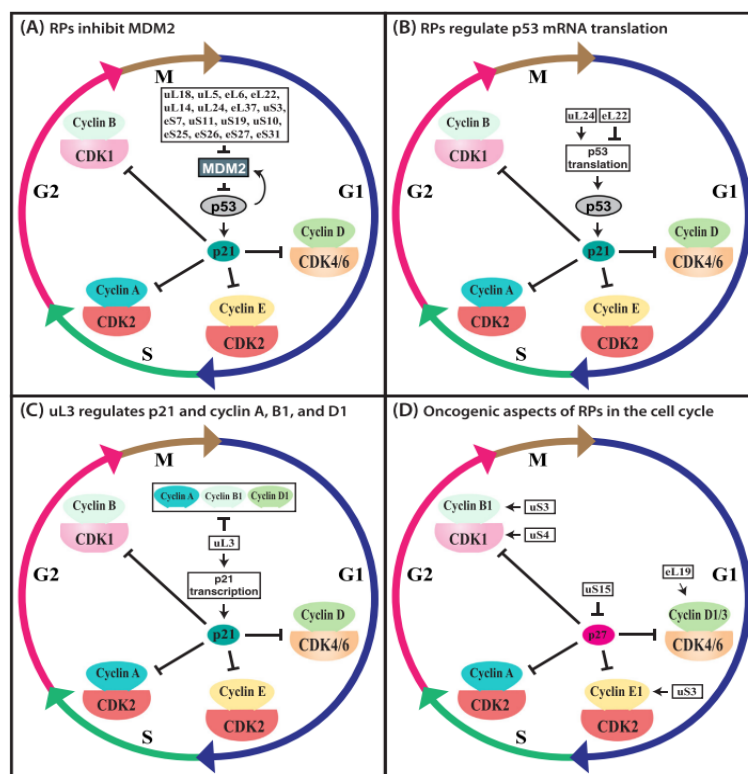


Figure 19 : Régulation de la progression du cycle cellulaire par les protéines ribosomales. – (A) De nombreuses protéines ribosomales (RPs) sont capables d’inhiber l’activité de l’ubiquitine ligase MDM2 (Murine Double Minute 2), ce qui conduit à une stabilisation de p53 puis à une accumulation de 21, qui aboutira sur l’arrêt du cycle cellulaire. (B) Les RPs peuvent contrôler la progression du cycle cellulaire dans les deux sens : ainsi uL24/RPL26 induit la traduction de l’ARNm de p53, alors que eL22/RPL22 exerce l’action opposée. (C) uL3/RPL3 induit la transcription de p21, qui inhibera par la suite les cyclines A, B1, and D1. (D) Certaines RPs, telles que eL19/RPL19, uS3/RPS3, uS4/RPS9 ou encore uS15/RPS13, possèdent des activités oncogéniques par l’induction de l’expression de certaines cyclines, notamment D1 / D3, B1 et E1 ; de CDK (notamment CDK1) ; ou via l’inhibition de p27. – Adapté de Bury et al., 2021

4) La voie p53

D'autre part, la modulation de l'expression du gène p53 joue aussi un rôle essentiel dans le contrôle du cycle cellulaire, en particulier au niveau des points de contrôle G1/S, intra-S et G2/M. Lors d'un stress endogène ou de dommages sur l'ADN, différents senseurs sont capables d'induire l'expression de nombreux gènes dont p53, afin de ralentir ou d'arrêter (temporairement ou définitivement) le cycle cellulaire. L'expression de p53 va entraîner l'activation de nombreux gènes dont p21, inhibiteur de nombreux complexes cyclines – CDKs. Ces inhibitions ont pour conséquence l'hypophosphorylation des protéines de la famille du Rétinoblastome (Rb, p107, p130) entraînant le ralentissement et/ou l'arrêt du cycle cellulaire (Engeland, 2022).

Deux voies de signalisation faisant intervenir p53 dans le contrôle de l'expression de p21 sont particulièrement bien caractérisées : la première est appelée « voie p53 – p21 – Rb » et intervient essentiellement en G1. L'inhibition des différents couples cyclines – CDKs par p21 favorise la forme hypophosphorylée de Rb, ce qui le maintient complexé à différents facteurs de transcription de la famille E2F, notamment E2F1/2 et 3. Ces complexes Rb-E2F hypophosphorylés sont capables de se fixer directement dans la région promotrice de nombreux gènes responsables de la progression vers la phase S pour en inhiber l'expression, et ainsi compromettre la transition vers la phase S (Engeland, 2022).

La deuxième voie est appelée « p53 – p21 – DREAM », et est impliquée dans la régulation globale du cycle cellulaire. Lorsque les protéines p107 et p130 sont hypophosphorylées, elles sont également liées à des facteurs E2F. Contrairement à la voie précédente, ces couples p107/p130 – E2F peuvent s'associer à d'autres protéines pour former un complexe appelé DREAM, capable d'inhiber la transcription de nombreux gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (Engeland, 2022; Sadasivam and DeCaprio, 2013). Le complexe DREAM se lie à au moins deux éléments d'ADN distincts dans les promoteurs de gènes contrôlant le cycle cellulaire. A travers la liaison via le motif E2F, DREAM réprime l'expression de gènes impliqués dans la progression vers la phase S (redondance avec la première voie). Via la liaison sur le motif CHR, DREAM inhibe l'expression de nombreux gènes impliqués dans la fin de la phase S et des phases G2 et M.

Ainsi, p21, lorsqu'il est activé par p53 peut intervenir tout au long du cycle cellulaire pour le réguler à travers ces différents acteurs.

B.2 - Progression du cycle cellulaire

La coordination précise de couples cycline - CDK et de leurs inhibiteurs permet la progression dans chaque phase et la transition entre les phases pour accomplir un cycle cellulaire complet. Quels sont les acteurs spécifiques des différentes phases du cycle ?

B.2.1 - La phase G1

Au cours de la phase G1, les cellules prolifératives vont croître en taille et produire un ensemble de protéines nécessaire à la réplication de l'ADN lors de la phase S.

Les principaux acteurs de la progression dans cette phase G1 sont les cyclines de type D (D1, D2 et D3) et les CDKs 4 et 6. Les cyclines de type D couplent la machinerie du cycle cellulaire aux signaux extracellulaires, à travers les signaux mitogènes qui induisent la synthèse des Cyclines D. Une fois activés, les complexes cyclines D – CDK4/6 sont responsables de la phosphorylation de cibles en aval, dont les principales sont les protéines de la famille du Rétinoblastome (Rb, p107, p130). Lorsque les protéines Rbs sont dans un état non-phosphorylé, elles séquestrent des facteurs de transcription de la famille E2F, notamment E2F1, 2 et 3 (Engeland, 2022; Thurlings and Bruin, 2016). La libération de ces facteurs de transcription est nécessaire pour activer la synthèse de protéines responsables de la transition vers la phase S, notamment CDK1 et les cyclines E et A ainsi que des gènes impliqués dans le processus de réplication de l'ADN tels que POLA1 et TK1 (Engeland, 2022).

Il est décrit classiquement que les complexes cyclines D – CDK4/6 phosphorylent progressivement les protéines Rbs, entraînant une levée partielle de répression des facteurs E2F, ce qui permet l'expression progressive de la cycline E. Une fois produite, la cycline E se complexe avec CDK2, et le couple va en retour multi-phosphoryler la protéine Rb, permettant une levée totale de la séquestration des facteurs E2F.

Récemment, d'autres scénarios alternatifs ont été proposés, dans différents contextes et avec différents outils, pour expliquer l'hyperphosphorylation de pRb au cours de la phase G1 (Rubin et al., 2020). Le premier suggère que seule une monophosphorylation de pRb serait réalisée par les couples Cyclines D - CDK4/6, mais nécessaire pour que les couples cycline E – CDK2 puissent réaliser les phosphorylations ultérieures. Ce phénomène de « priming » a notamment été observé chez la levure (Kõivomägi et al., 2013).

Le second scénario propose que l'augmentation de phosphorylation de pRb induite par les couples cyclines D - CDK4/6 serait indirecte, via la phosphorylation d'autres cibles, qui en retour activeraient les couples cycline E – CDK2. (Kaulich et al., 2021).

Enfin, une dernière alternative propose qu'une augmentation du nombre de couples cycline D – CDK4/6 au cours de la progression de la phase G1 séquestrerait progressivement les inhibiteurs du cycle tels que p21 et p27 et permettrait l'activité des complexes cycline E – CDK2 (Rubin et al., 2020).

A l'inverse, d'autres études suggèrent que les couples cyclines D – CDK4/6 sont responsables de toutes les activités de phosphorylation de Rb lors de la phase G1, avec des couples cycline E – CDK2 actifs uniquement à partir de la phase S (Chung et al., 2019). Des études supplémentaires, intégrant ou expliquant les différents résultats obtenus seront nécessaires pour faire toute la lumière sur ces questions.

Une fois hyperphosphorylée, la protéine Rb restera dans cet état pour le reste du cycle, et ne sera déphosphorylé par la phosphatase PP1 qu'en début de la prochaine G1 (Ludlow et al., 1993). Le point temporel de la phase G1 auquel Rb est hyperphosphorylé est appelé « point de restriction » et correspond à un point de non-retour, à partir duquel la cellule devient insensible aux signaux mitogènes et s'engage vers l'entrée en phase S. La phase G1 se termine par l'assemblage des complexes pré-réplcatifs (prereplicative complexes ou pre-RCs), complexes multiprotéiques physiquement accrochés sur l'ADN au niveau des sites origines de réplication (Takeda and Dutta, 2005) qui seront progressivement convertis en fourches de réplication avec le début de la phase S.

B.2.2 - La phase S

C'est au cours de la phase S que la cellule va répliquer son ADN. Cette réplication chez les eucaryotes est réalisée par l'activation de multiples origines de réplication qui doivent être coordonnées avec précision dans l'espace et le temps.

Les couples cycline A – CDK2 sont les régulateurs majeurs de la progression de la phase S. A travers leurs activités de phosphorylation, ces couples contrôlent de très nombreux facteurs. Par exemple, la phosphorylation de la protéine SAMHD1 module son activité dNTPase, contrôlant ainsi la disponibilité des dNTP. La cycline A participe également à la réparation des cassures d'ADN double brins par l'intermédiaire de l'expression de Mre11. Lorsque Mre11 est produit en quantité insuffisante, cela entraîne une mauvaise résolution des fourches de réplication bloquées et une réparation insuffisante des cassures d'ADN double-brins. L'activation des origines de réplication dépend de l'interaction directe de cycline A – CDK2 avec Ciz1, un régulateur positif de la réplication de l'ADN qui permet le recrutement de PCNA et interagit avec Cdc6.

C'est également pendant la phase S que le centrosome est dupliqué. La cycline A recrute Cdc6 et d'autres facteurs de réplication de l'ADN (Mcm5 et Orc1) au site proximal des centrioles pour réguler négativement la duplication des centrosomes, empêchant ainsi leur re-duplication (Takeda and Dutta, 2005).

Au cours de la phase S débute également l'expression de la cycline B qui interviendra dans la phase suivante. Les couples cyclines A – CDK2 inhibent l'activité des couples cyclines B – CDK1 tant que le processus de réplication est en cours. Une fois la réplication terminée, la répression de CDK1 est levée, et celui-ci peut alors se complexer avec cycline B pour phosphoryler diverses cibles, et ainsi faire progresser la cellule vers la phase G2.

Au cours de la réplication, de nombreux facteurs peuvent entraîner des dommages de l'ADN. En cas de lésions, le point de contrôle intra-phase S peut bloquer la progression du cycle cellulaire et déclencher les mécanismes de réparation de l'ADN. Ce point de contrôle possède deux principaux effecteurs chez les eucaryotes : les kinases ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et ATR (ATM and Rad3-related), toutes deux essentielles au maintien de l'intégrité génomique (Hlavová et al., 2011; Takeda and Dutta, 2005).

B.2.3 - La phase G2

Lors de la phase G2, la cellule se prépare à la prochaine étape du cycle cellulaire : la mitose. La cycline B, dont l'expression a débuté au cours de la phase S, atteint son maximum lors de la phase G2 et se complexe avec CDK1. L'activation des couples cycline B – CDK1 via leur phosphorylation par la CAK est finement régulée, et médiée par un ensemble complexe de boucles de rétroactions internes et externes (Lindqvist et al., 2009). A partir d'un certain niveau d'activation des couples cycline B – CDK1, une boucle de rétroaction positive se met en place afin d'activer de façon massive leur expression. Cet événement est décrit comme étant le point de bascule vers la phase M.

L'activation des couples cycline B – CDK1 est à l'origine de la phosphorylation d'un très grand nombre de substrats tels que : des composants du cytosquelette (réseaux de microtubules, filaments d'actines et filaments intermédiaires), des protéines de l'appareil de Golgi, des lamines nucléaires, des caspases, des composants du centrosome, ainsi que l'« Anaphase Promoting Complex/Cyclosome » (APC/C). L'ensemble de ces événements de phosphorylation

aboutira à une réorganisation massive de l'architecture cellulaire ainsi qu'à la destruction de l'enveloppe nucléaire, nécessaire pour le passage vers la mitose (Gavet and Pines, 2010).

Il existe en G2 un autre point de contrôle appelé classiquement « DNA damage checkpoint », permettant à la cellule de contrôler la qualité de l'ADN répliqué. En cas de cassures double-brin par exemple, les cascades de signalisation ATM et ATR décrites précédemment (Hlavová et al., 2011; Takeda and Dutta, 2005) interviennent dans la réparation de l'ADN, tandis que l'expression de Wee1 et Myt1 permet d'arrêter la progression de la phase G2 par phosphorylations inhibitrices de CDK1 (Schmidt et al., 2017). Une fois l'ADN réparé, ces phosphorylations inhibitrices sont retirées, et les couples cycline B – CDK1 sont à nouveau opérationnels. C'est notamment l'un des rôles des phosphatases CDC25A, B et C (Boutros et al., 2006). Une fois activés, les couples cycline B – CDK1 peuvent également promouvoir l'activation des phosphatases, qui déphosphoryleront d'autres couples cycline B – CDK1, créant ainsi une boucle d'activation positive (Boutros et al., 2006). Ainsi, la progression à travers la phase G2 est régulée par un équilibre entre les protéines de la famille WEE et celles de la famille CDC25.

B.2.4 - La Mitose

La progression du cycle cellulaire s'achève par la mitose, qui est en règle générale la phase la plus rapide du cycle cellulaire. Au cours de la mitose, la cellule se divise pour donner naissance à deux cellules filles. Le matériel génétique répliqué lors de la phase S est également distribué dans les deux cellules filles.

Le régulateur clé de la mitose est la sérine/thréonine kinase PLK1. La phosphorylation de substrats spécifiques par PLK1 contrôle la dégradation de l'enveloppe nucléaire, la maturation des centrosomes, l'assemblage correct du fuseau, la ségrégation des chromosomes et la cytokinèse (Kalous and Aleshkina, 2023). L'activation de PLK1 est réalisée par la kinase Aurora A à travers son cofacteur Bora, qui doit être phosphorylé par cycline B – CDK1 pour être actif (Parrilla et al., 2016).

Au cours de la mitose, la cellule doit traverser un dernier point de contrôle appelé « Spindle Assembly Checkpoint » (SAC – contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique). Au cours de ce point de contrôle, l'activité des complexes cycline B – CDK1 est requise pour assurer la liaison des chromatides sœurs au fuseau mitotique. Lorsque les chromatides sœurs sont en place, le checkpoint est levé, et le complexe APC/C entraîne la dégradation progressive des couples cycline B – CDK1 par ubiquitinylation. Cette dégradation s'accompagne d'une levée d'inhibition des phosphatases PP1 et PP2A, qui permet une déphosphorylation généralisée de nombreux substrats. En parallèle, l'activité du complexe APC/C favorise la protéolyse d'autres régulateurs mitotiques. Ensemble, ces activités orchestrent une série complexe d'évènements permettant l'achèvement de la mitose (Holder et al., 2020).

Partie C : Acteurs du cycle cellulaire et acquisition d'un phénotype différencié

C.1 - Les couples cyclines – CDKs, acteurs de destin dans les cellules souches selon des rôles dépendants et indépendants du cycle

C.1.1 - Rôles cycle-dépendant et indépendant des acteurs du cycle sur le destin

Dans les cellules souches embryonnaires (cellules ES) murines, les travaux de Coronado et collaborateurs ont montré qu'une surexpression de la cycline E favorisait le maintien de la pluripotence et inhibait la différenciation, à travers une diminution de la phase G1 (Coronado et al., 2013). A l'inverse, les auteurs observent un allongement de la phase G1 et une augmentation de la différenciation lors d'expériences de perte de fonction de cette même cycline E. Ainsi, les acteurs du cycle cellulaire, par leur contrôle sur la progression/durée des phases, peuvent influencer le destin des cellules. Ces mêmes acteurs peuvent également influencer le destin des cellules par des mécanismes indépendants de leur fonction dans le cycle cellulaire. Par exemple, dans les cellules ES de souris, les cyclines des familles D (1/2/3) et E (1 et 2) sont capables via leur interaction avec leurs partenaires CDKs respectifs, de phosphoryler des facteurs de maintenance de la pluripotence (Oct4, Sox2 et Nanog), les préservant de la dégradation et favorisant un état pluripotent (Liu et al., 2017). En retour, ces facteurs de pluripotence, notamment Nanog, sont capables de se lier aux régions promotrices de ces gènes pour activer leur expression (CDK6 et CDC25A), et ainsi promouvoir la progression dans le cycle cellulaire (Zhang et al., 2009). Également, dans des cellules ES humaines, il a été montré qu'Oct4 influe sur le maintien de l'état pluripotent par une répression transcriptionnelle directe de p53, ce qui induit une diminution de l'expression de p21 (Zhang et al., 2014).

C.1.2 - Les CKIs, des acteurs de la différenciation

Les inhibiteurs CKIs du cycle cellulaire peuvent également influencer l'acquisition de l'identité cellulaire par des mécanismes cycle cellulaire-indépendant. Par exemple, des travaux dans le cortex embryonnaire de souris ont montré que la surexpression de p27 promeut la différenciation des progéniteurs à travers la stabilisation du facteur proneural NeuroG2 (Nguyen et al., 2006). A l'inverse, une augmentation de la prolifération est observée lors de la perte de fonction de p27. De même, dans les cellules ES murines, p27 réprime l'expression du gène Sox2, et peut donc induire la différenciation par répression transcriptionnelle sans impact sur le cycle (Li et al., 2012).

Chez les mammifères, les inhibiteurs p27 et p57 jouent des rôles complémentaires dans le cadre de la neurogenèse. En effet, la perte de fonction de p57 (modèle K.O) dans le cortex embryonnaire de souris mène à un excès de neurones dans toutes les couches corticales, mais de façon plus prononcée dans les couches 5 et 6. Quant à p27, sa perte de fonction dans le même contexte entraîne une surproduction de neurones dans les couches 2 à 5, mais pas 6. Ainsi, ces deux inhibiteurs régulent la production des différentes couches corticales par un contrôle différentiel des populations de progéniteurs (Mairet-Coello et al., 2012).

C.1.3 - Découplage de la sortie du cycle cellulaire et du processus de différenciation

Comme mentionné, avec quelques exemples, dans la **section D.4** du chapitre I de ce manuscrit, sortie de cycle cellulaire et différenciation peuvent, dans certains cas, être découplées. Également, dans le tube neural murin en développement, la surexpression des différents membres de la famille des inhibiteurs Cip/Kip (p21, p27, p57) entraîne la sortie de cycle, mais pas la différenciation des progéniteurs neuraux (Gui et al., 2007). À l'inverse, les mêmes auteurs observent un phénomène de réentrée de cellules dans le cycle cellulaire lors d'une perte de fonction (modèle K.O) de p57. Ainsi, la seule sortie du cycle des progéniteurs ne serait pas suffisante pour entraîner la différenciation, et devrait s'accompagner de l'expression de facteurs proneuraux tels que NeuroG2. Il a été notamment montré pour NeuroG2, dans le tube neural embryonnaire de poulet, un rôle activateur de l'expression du FT Sox21, impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire ET la différenciation par inhibition de l'activité de gènes de pluripotence tels que Sox1, 2 et 3 (Molina and Pituello, 2017; Sandberg et al., 2005).

C.2 - Modulation des durées du cycle cellulaire et de ses phases, destin cellulaire et modes de division au cours de la neurogenèse embryonnaire

Comme écrit précédemment, la dynamique du cycle cellulaire et en particulier la durée des phases a émergé récemment comme un déterminant critique dans la régulation de balance entre prolifération et différenciation, ainsi que dans l'acquisition d'un phénotype différencié.

Il est bien admis que la durée du cycle cellulaire varie dans sa globalité au cours du processus de différenciation. Ainsi, les cellules souches ont des cycles cellulaires très courts, avec en particulier des phases de Gaps très réduites voire absentes. Ensuite, la durée de cycle s'allonge progressivement au cours du développement, en parallèle d'un processus de restriction de destin et de ciblage vers la différenciation (Boward et al., 2016; Coronado et al., 2013; Liu et al., 2019) Cet allongement du cycle se fait particulièrement par une augmentation de la phase G1, qui favoriserait le rôle des facteurs pro-différenciation. Ainsi, il a été suggéré que certaines des orientations concernant le destin des cellules se déroulent au cours de la phase G1, en convertissant les signaux extracellulaires en une cinétique distincte du cycle cellulaire.

C.2.1 - Allongement progressif de la durée du cycle cellulaire au cours de la neurogenèse embryonnaire

Pendant la phase d'amplification initiale des cellules progénitrices neurales, et donc avant le début du processus de neurogenèse, la durée moyenne du cycle cellulaire le long de l'axe dorso-ventral des tubes neuraux embryonnaires de poulet et souris est constante. Lorsque la neurogenèse se met en place, deux modifications surviennent : d'une part, la durée du cycle cellulaire augmente de manière générale, et d'autre part la durée du cycle devient variable et corrélée à la vitesse de production des neurones en fonction des différents domaines du tube neural (Kicheva et al., 2014).

Cette augmentation de la durée du cycle cellulaire concomitante au processus de différenciation a été observée par plusieurs équipes, et dans différents modèles d'études. Dans les années 1960, des premiers travaux utilisant la méthode d'incorporation cumulative de thymidine tritiée ont

montré un allongement de la durée du cycle cellulaire au cours de la neurogenèse, notamment dans le tube neural de poulet en développement (Fujita, 1962) et dans le cortex embryonnaire de rat (von Waechter and Jaensch, 1972). Des études plus récentes, s'appuyant sur les techniques d'incorporation cumulative et/ou de doubles marquages successifs par analogues de thymidine (EdU, BrdU, IdU) corroborent les observations précédentes d'allongement du cycle cellulaire au cours de la neurogenèse, dans la moelle épinière embryonnaire de poulet (Kicheva et al., 2014 ; Olivera-Martinez et al., 2014) et de souris (Kicheva et al., 2014), ainsi que dans le cortex embryonnaire de souris (Arai et al., 2011; Calegari et al., 2005; F. Calegari and Huttner, 2003; Takahashi et al., 1995a) et de macaque (Lukaszewicz et al., 2005). Seules deux études, l'une dans le domaine pMN du tube neural spinal d'embryon de poulet (Saade et al., 2013) et l'autre dans le cortex de furet (Turrero García et al., 2016) montrent une diminution de la durée du cycle lors de la progression dans la neurogenèse. Une partie de ces résultats contradictoires pourrait être expliquée par des différences ponctuelles dans les mécanismes régulant les durées de cycle dans des domaines particuliers (domaine pMN chez le poulet), des différences de dynamique de neurogenèse inter-espèces, ou encore par les différentes méthodes employées pour réaliser ces mesures.

Ces descriptions de durée de cycle au cours de la neurogenèse se raffinent également en intégrant la notion de dynamique de neurogenèse liée au patterning. Ainsi, en 1987, Smith et Schoenwolf déterminent les durées moyennes de cycle cellulaire des progéniteurs dorsaux et ventraux de la moelle épinière embryonnaire de poulet par exposition prolongée à la colchicine (molécule provoquant l'arrêt des cellules cyclantes en métaphase - Smith and Schoenwolf, 1987). Ils observent une durée de cycle plus courte dans les progéniteurs dorsaux (6.3h) que ventraux (9.9h). Des mesures similaires sont réalisées dans la région corticale et aboutissent à la même différence entre progéniteurs télencéphaliques dorsaux (7.7h) et ventraux (11.6h). Ces résultats suggèrent que l'allongement du cycle cellulaire est corrélé à la dynamique de production des neurones le long des axes AP (cortex VS moelle) et DV.

Dans l'ensemble des études mentionnées ci-dessus, les durées de cycle obtenues via des méthodes d'incorporations d'analogue de thymidine reposent sur des paradigmes expérimentaux (populations progénitrices considérées comme homogènes, croissance stable des progéniteurs au cours du temps) qui ne reflètent pas totalement les réalités biologiques du système nerveux en développement. Cependant, même si les valeurs « absolues » de durées de cycle mesurées sont probablement imprécises, l'analyse comparative de leur évolution au cours du processus de neurogenèse permet de mettre en évidence un phénomène d'allongement du cycle cellulaire.

Afin d'obtenir des mesures plus précises des paramètres du cycle cellulaire et de leur évolution pendant la neurogenèse, plusieurs équipes ont développé des méthodes d'imagerie en-live pour effectuer ces mesures. Ainsi, des travaux réalisés sur des tranches *ex vivo* de tube neural spinal embryonnaire de poulet ont permis de mettre en lumière : 1) une grande hétérogénéité des durées de cycles entre des progéniteurs de même stade et dans une même localisation tissulaire et 2) un allongement progressif du cycle cellulaire au cours de la progression dans la neurogenèse (Molina et al., 2022; Wilcock et al., 2007). Une autre étude, réalisée sur des tranches organotypiques de cortex de macaque, montre une augmentation progressive de la durée de cycle des progéniteurs de la zone ventriculaire (E48 → E65) suivie d'une phase de diminution (E65 → E80) (Betizeau et al., 2013). Cette diminution ne ramène cependant pas le cycle cellulaire à une durée inférieure à celle du point d'origine.

Si l'ensemble de ces travaux montre un allongement de la durée du cycle cellulaire proportionnel à la cinétique de progression de la neurogenèse embryonnaire dans différentes régions du SNC, qu'en est-il des durées des différentes phases (et de leur variation) au cours de ce processus ?

C.2.2 - Evolution des durées de phases lors de la neurogenèse embryonnaire

De nombreuses études ont eu pour objectif de caractériser l'évolution de la dynamique de chaque phase au cours de la neurogenèse embryonnaire. Ces travaux ont montré que celle-ci variait soit en durée absolue, soit en durée relative par rapport à la durée totale du cycle. Dans leur ensemble, les conclusions de ces études montrent un allongement de la durée de la phase G1 au cours de la neurogenèse, au contraire des phases S et G2 dont la tendance semble être à la diminution.

1) Allongement de la durée de la phase G1

De multiples travaux dans le cortex embryonnaire de souris ont montré, via des méthodes d'incorporation cumulatives d'analogues de thymidine, un allongement de la durée **absolue** de la phase G1 au cours de la neurogenèse (Arai et al., 2011; Calegari et al., 2005; Takahashi et al., 1995a). Par exemple, les travaux d'Arai et collaborateurs mesurent les durées de phases des progéniteurs corticaux apicaux (Pax6-positifs) et basaux (Tbr2-positifs), prolifératifs (Tis21-négatifs) et neurogéniques (Tis21-positifs) (stade E14.5) identifiés à l'aide de marqueurs moléculaires spécifiques. Leurs résultats montrent un allongement de la phase G1 associé à la transition progressive des progéniteurs aRGs vers une identité bIP, ce qui suggère que le passage d'aRG vers un état de progéniteur intermédiaire représente une étape de progression dans la neurogenèse. Leurs résultats suggèrent également un allongement relatif de cette phase G1 lorsque les progéniteurs transitent d'un mode de division prolifératif vers un mode neurogénique.

Dans le cortex embryonnaire de macaque, les progéniteurs de l'OSVZ de l'aire 18 présentent une durée de cycle plus longue que celle des progéniteurs de l'aire 17, dont la capacité proliférative plus réduite est liée à un allongement de la durée de G1 (Lukaszewicz et al., 2005). Ceci s'accompagne d'une cinétique de différenciation différente entre les deux régions, avec une aire 18 se différenciant plus précocement que l'aire 17.

Dans la région spinale du tube neural d'embryons de poulets et souris en développement, Kicheva et collaborateurs ont montré également un allongement de la durée de G1 progressif le long de l'axe rostro-caudal et dorso-ventral. En utilisant le système FUCCI S/ G2/M ils observent lors du processus de différenciation une augmentation du pourcentage de progéniteurs (Sox2+) négatifs pour l'expression de cette construction, dont ils déduisent une augmentation de la durée de G1 (Kicheva et al., 2014).

Dans le domaine pMN du tube neural embryonnaire de poulet, Saade et collaborateurs observent une diminution de la durée du cycle, mais une durée constante de la phase au cours de la différenciation (stade HH14 → HH24) (Saade et al., 2013). Ainsi, bien que la durée du cycle totale diminue, le poids **relatif** de la phase G1 augmente de 30 à 50%.

Plus récemment, Molina et collaborateurs, en utilisant une approche *ex vivo* d'imagerie en live de progéniteurs neuronaux individuels du tube neural de poulet ont montré un allongement de la phase G1 lors de deux cycles cellulaires consécutifs, les cellules filles ayant une G1 plus longue

que leur cellule mère (Molina et al., 2022). Ainsi, la durée de la phase G1 semble augmenter progressivement à chaque cycle cellulaire lors du processus de neurogenèse.

Ainsi, l'allongement de la durée de G1 semble être corrélé/causal dans le processus de différenciation neuronale.

2) Quels sont les mécanismes moléculaires de cet allongement de la phase G1 au cours de la neurogenèse ?

Des études portant sur des progéniteurs corticaux murins *in vitro* ont montré une diminution de la durée de la phase G1 lorsqu'ils sont traités par du bFGF, un facteur pro-prolifératif liée à une forte augmentation de l'expression de la cycline D2, régulateur positif de la phase G1 (Lukaszewicz et al., 2002). A l'inverse, les mêmes auteurs observent une augmentation de sa durée après administration de facteur antiprolifératif (NT3). Ces variations de durée de phase étaient accompagnées d'une augmentation et d'une diminution de la prolifération, respectivement. Ainsi, les auteurs établissent un lien entre durée de G1 et division des progéniteurs corticaux : une durée courte de G1 favorise des divisions prolifératives, et une durée longue des divisions neurogéniques.

La durée de la phase G1 est notamment connue pour être modulée par une variation d'expression des cyclines D, leurs partenaires CDK4 et 6 et de leurs inhibiteurs de la famille Cip/Kip (Fluckiger et al., 2006; Fujii-Yamamoto et al., 2005; Savatier et al., 1996; Wang et al., 2017; White and Dalton, 2005) La majeure partie des travaux a ainsi exploré le rôle de ces acteurs clés du cycle cellulaire, en utilisant des approches de perte et gain de fonction. Plusieurs études ont ainsi exploré la durée de la phase G1 en modulant l'activité des cyclines et CDKs responsables de la régulation de la phase G1. Que ce soit par l'utilisation de molécule inhibitrice spécifique des couples cyclines – CDKs (Pilaz et al., 2009), par la surexpression ou la réduction d'expression ponctuelle de différentes cyclines et/ou CDKs (Lange et al., 2009; Pilaz et al., 2009), ou bien l'analyse de souris K.O pour certaines CDKs / CKIs (Lim and Kaldis, 2012; Mairet-Coello et al., 2012), toutes les études convergent vers une conclusion similaire : la diminution de la durée de G1 par modulation des régulateurs intrinsèques favorise l'aspect prolifératif, alors qu'une augmentation favorise la neurogenèse.

D'autres études, réalisées dans le tube neural d'embryon de poulet par Lobjois et collaborateurs s'intéressent particulièrement aux rôles des cyclines D1 et D2 lors de la fermeture du tube neural chez le poulet (Lobjois et al., 2004). La surexpression de ces cyclines D au stade HH10 augmente le taux de prolifération des progéniteurs par rapport à la condition contrôle, et freine la neurogenèse. Ces deux cyclines étant des régulateurs de la phase G1, il est raisonnable de supposer que cette augmentation de prolifération se fait à travers une progression plus rapide des progéniteurs à travers cette phase.

Les travaux récents du groupe de Fabienne Pituello ont montré que lorsque la phosphatase CDC25B est surexprimée dans le tube neural de l'embryon de poulet, la durée de la phase G1 des progéniteurs neuraux augmente (Molina et al., 2022). Il est intéressant de noter que cette surexpression induit également une augmentation de l'hétérogénéité de la phase G1 entre les progéniteurs. Ce rôle de CDC25B est cycle cellulaire-dépendant, car la surexpression d'une construction CDC25B mutée (incapable d'interagir avec son partenaire CDK1) n'entraîne pas d'altérations du cycle cellulaire. Ces données montrent que certains acteurs, bien qu'agissant principalement dans une phase du cycle, sont également capables de moduler la durée d'autres phases. Il est ainsi tentant de spéculer que l'augmentation de l'expression de CDC25B induit

des modifications de la phase G1 lors du cycle cellulaire suivant. Cependant la nature des effecteurs à travers lesquels CDC25B module la longueur de la phase G1 dans les cellules filles après la division n'est pas encore connue.

3) Diminution de la durée de la phase S

Dans le cortex en développement, plusieurs études soulignent une diminution de la durée absolue de la phase S au cours de la progression dans la neurogenèse. Par exemple, Arai et collaborateurs ont observé une diminution de la durée de phase S dans le cortex de souris en développement, associée à un changement d'état prolifératif vers neurogénique dans les progéniteurs aRGs et bIPs (Arai et al., 2011). Cette diminution de la durée de phase S est également retrouvée dans les progéniteurs corticaux de furet en développement (Turrero García et al., 2016) et corrèle à nouveau avec une progression d'un état prolifératif vers neurogénique.

Au sein du tube neural embryonnaire de poulet, Saade et collaborateurs ont également mesuré une diminution de la durée absolue du cycle cellulaire, majoritairement liée à une réduction drastique de la durée la phase S (divisée par 2) dans les progéniteurs du domaine pMN au cours du processus de différenciation (Saade et al., 2013). Également, une telle diminution de la durée de la phase S est observée, cette fois-ci le long de l'axe DV, par Le Dréau et collaborateurs, et semblent mettre en jeu la voie de signalisation BMP à travers l'activité Smad (Le Dréau et al., 2014).

Par ailleurs, une autre étude a rapporté une dynamique variable de la phase S des progéniteurs neuraux, cette fois-ci le long de l'axe AP (Olivera-Martinez et al., 2014). Cette modulation des paramètres du cycle cellulaire s'accompagne d'un remodelage de l'expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire tels que : CDC7, Wee1, P57, P27 et Cycline D1 (Olivera-Martinez et al., 2014). Kicheva et collaborateurs ont quant à eux observé, dans les régions spinales des tubes neuraux de poulet et souris, une diminution relative de la phase S dans les différents domaines dorsaux et ventraux étudiés (Kicheva et al., 2014)

Ainsi, la diminution de la phase S semble corrélérer avec la progression dans la neurogenèse, et être associée (tout du moins dans le cortex) à la transition d'un état prolifératif vers neurogénique des progéniteurs.

4) Evolution de la durée de G2

Les conclusions des travaux de mesure de durée de la phase G2 et son évolution au cours de la neurogenèse embryonnaire conduisent à une vision différente entre les régions corticale et spinale. En effet, les mesures réalisées dans le cortex embryonnaire de différentes espèces s'accordent sur une durée plutôt constante de la phase G2 au cours du processus de différenciation (Arai et al., 2011; Lukaszewicz et al., 2005; Takahashi et al., 1995a; Turrero García et al., 2016).

A l'inverse, plusieurs études réalisées dans la région spinale du tube neural de poulet en développement indiquent une diminution absolue de la durée de la phase G2 au cours de la neurogenèse, notamment dans le domaine pMN (Saade et al., 2013), mais également entre progéniteurs ventraux et dorsaux à un même stade de développement (Peco et al., 2012). Une diminution relative est également observée dans plusieurs domaines des tubes neuraux spinaux aviaires et murins via l'utilisation d'un outil FUCCI (Kicheva et al., 2014).

Dans la région spinale du tube neural de poulet en développement, l'équipe de Fabienne Pituello a étudié le rôle de la phosphatase CDC25B dans le processus de neurogenèse. Dans une première étude, ils observent un allongement de la phase G2 (compensé par une réduction de la phase G1) des progéniteurs neuraux lors de la diminution de l'expression de CDC25B (siRNA), associé à une diminution de la neurogenèse (Peco et al., 2012). Ils en déduisent ainsi un rôle pro-neurogénique pour CDC25B, potentiellement associé à une modulation de la durée de G2. Cependant, des travaux ultérieurs du groupe révèlent que ce rôle de CDC25B dans le contrôle de la production neuronale est indépendant de son rôle de modulateur de la phase G2 (Bonnet et al., 2018). Ainsi, dans la région spinale en développement, la diminution de la durée de G2 semble associée au processus de neurogenèse, sans être un facteur causal.

Dans le cortex en développement, des travaux récents indiquent que la modulation de l'expression de CDC25B (perte et gain de fonction) impacte la neurogenèse à travers la régulation de la durée de la phase G2 (Roussat et al., 2023). Au contraire de ce qui est observé dans la moelle épinière, l'analyse du cortex de souris K.O pour CDC25B a montré une augmentation transitoire de la production de neurones, lors des stades précoces de la neurogenèse, associée à une augmentation de la durée de la phase G2 et une diminution de la production de BIPs. A l'inverse, une diminution de la durée de la phase G2 chez des souris sauvages via traitement pharmacologique entraîne une augmentation de la génération de BIPs, au détriment de la génération de neurones. Les auteurs montrent que ces effets s'appuient sur la capacité de CDC25B à réguler l'activité de CDK1. Ainsi, CDC25B favorise l'induction des progéniteurs dans les deux tissus (cortex et moelle épinière), et ces travaux semblent mettre en lumière une certaine importance de la durée de la phase G2 dans l'acquisition de l'identité, avec un allongement de G2 corrélée à un destin neuronal.

5) Evolution de la durée de la phase M

La durée de la mitose semble évoluer relativement peu au cours de la neurogenèse embryonnaire, que ce soit dans la région spinale (Kicheva et al., 2014 ; Peco et al., 2012; Saade et al., 2013; Wilcock et al., 2007) ou corticale (Arai et al., 2011; Takahashi et al., 1995a; Turrero García et al., 2016).

A travers la littérature, les seuls travaux abordant un lien entre durée de mitose et neurogenèse embryonnaire ont été conduits par Pilaz et collaborateurs (Pilaz et al., 2016). Les auteurs étudient dans le cortex murin embryonnaire le rôle du gène *Magoh*, un régulateur mitotique pour lequel ils ont précédemment montré que la perte de fonction complète entraîne des phénotypes micro-céphaliques. Les auteurs mesurent, dans une souris mutante haplo-insuffisante *Magoh*^{+/-}, la progression de la mitose par imagerie en-live de progéniteurs issus de tranches organotypiques de cerveau en développement au stade E13.5. Ils observent une mitose plus longue dans les progéniteurs *Magoh*^{+/-} que dans les progéniteurs sauvages, accompagnée d'une augmentation de la proportion de divisions neurogéniques. Ils observent également un lien direct entre l'allongement de la mitose et les phénomènes apoptotiques. En effet, plus la durée de mitose est augmentée, et plus la probabilité que les progéniteurs (et pas les neurones) issus de cette division subissent l'apoptose augmente. Ce phénotype est associé à un délai dans l'activation du gène *p53*. Les mêmes résultats sont observés lors d'utilisation de 2 inhibiteurs différents de la mitose. Ainsi, les auteurs apportent des premiers arguments en faveur de l'existence d'un lien entre allongement de la mitose et neurogenèse. A l'inverse, les travaux de l'équipe de Mora-Bermudez et collaborateurs ont observé, dans une lignée de souris *Tis21*-GFP,

une durée de mitose plus longue (de quelques minutes) dans les progéniteurs neuraux corticaux prolifératifs (Tis21-négatifs) par rapport aux progéniteurs neurogéniques (Tis21-positifs) (Mora-Bermúdez et al., 2016). Ainsi, le lien entre durée de mitose et modulation de la neurogenèse reste très tenu et peu compris sur le plan moléculaire.

Partie D : Modulation des durées de cycle / phases et les modes de division au cours de la neurogenèse

Au cours de la neurogenèse les études décrites précédemment montrent que la modulation des durées de phases est associée et/ou corrélée à l'acquisition d'un destin progéniteur ou neuronal. Ces modulations de la dynamique concernent les différentes phases du cycle, mais affectent le plus souvent la phase G1, avec un allongement progressif de cette phase pendant la période neurogénique. Ces variations surviennent en parallèle du changement des proportions des différents modes de division (symétrique prolifératif, asymétrique neurogénique et symétrique terminal) pendant le processus de différenciation. Ainsi, il semble légitime de poser la question suivante : la variation de la dynamique des différentes phases est-elle à l'origine des changements de mode de division ? Les perturbations dans le processus de neurogenèse observées lors de certaines études apportent quelques éléments de réponse.

En 2007, Wilcock et collaborateurs développent un système d'imagerie en-live à long terme permettant la mesure de la durée du cycle cellulaire de progéniteurs individuels, issus de tranches organotypiques de tube neural spinal d'embryons de poulet âgés d'1.5 jour (Wilcock et al., 2007). Dans leur système, l'identité progénitrice est déterminée par l'entrée d'une cellule en mitose, et l'identité neuronale par un détachement de la cellule de la surface apicale ou bien l'acquisition de caractéristiques morphologiques neuronales spécifiques. Ainsi, la durée de cycle d'un progéniteur est définie comme le temps écoulé entre deux mitoses successives. Grâce à ce système, les auteurs ont observé une durée de cycle cellulaire plus courte dans les progéniteurs réalisant des divisions symétriques prolifératives que dans les progéniteurs réalisant des divisions asymétriques neurogéniques. Ils émettent également l'hypothèse que la durée du cycle cellulaire des progéniteurs réalisant des divisions symétriques terminales doit être encore plus longue, car ils n'ont pas réussi à capturer de tels événements. Leurs résultats montrent ainsi une variation de durée de cycle entre progéniteurs prolifératifs et progéniteurs se divisant de manière asymétrique, ces derniers ayant un cycle plus long.

Un argument supplémentaire est apporté par les travaux de Pilaz et collaborateurs, qui ont étudié l'impact de la modulation de la durée de la phase G1 sur les modes de division des progéniteurs corticaux murins embryonnaires (Pilaz et al., 2009). Via l'utilisation de cultures organotypiques de cerveau (tranches de cerveau), les auteurs ont montré une diminution moyenne de 25% de la durée de la phase G1 lors de la surexpression de cycline D1 ou E1 (par rapport à la condition contrôle) à l'échelle tissulaire. Des progéniteurs corticaux individuels ont ensuite été cultivés. L'analyse de la taille (nombre de cellules) et de l'identité (proliférative ou non – Ki67-positif ou négatif) des cellules composant les clones a révélé une augmentation du nombre total de cellules, ainsi que du nombre de progéniteurs, dans la condition de surexpression de cycline D1, c'est-à-dire lorsque la durée de la phase G1 était diminuée. Ces expériences suggèrent donc de façon indirecte que le raccourcissement de la durée de G1 et/ou la surexpression de la cycline D1 favorise un mode de division prolifératif.

A l'inverse, une augmentation de la durée de la phase G1 semble favoriser les modes de division neurogéniques. Ceci est notamment observé par Molina et collaborateurs dans le tube neural spinal de poulet, qui investiguent dans ce modèle le lien entre durée de phase G1 et mode de division des progéniteurs neuraux. Les auteurs observent, à travers une méthode d'imagerie en live, un rallongement important de la phase G1 lors de la surexpression de la phosphatase CDC25B, associé à un déplacement des progéniteurs vers des modes de division neurogéniques (Molina et al., 2022). Lors de la surexpression d'une construction CDC25B mutée, incapable de moduler la durée du cycle cellulaire via l'interaction avec son partenaire CDK1, les auteurs ont observé des durées de phases et des fréquences de mode de division quasi similaires à celles de la condition contrôle. Ainsi, les résultats obtenus suggèrent fortement un lien entre durée de phase G1 et mode de division.

De plus, ce changement des modes de division des progéniteurs neuraux lors de la surexpression de CDC25B dans le tube neural spinal avait déjà été mis en avant lors de travaux précédents du groupe (Bonnet et al., 2018), au sein desquels la durée de la phase G1 n'a pas été mesurée.

Jusqu'ici, la majeure partie des travaux étudie la corrélation entre dynamique du cycle cellulaire et régulation de la balance entre prolifération et différenciation à l'aide de marqueurs spécifiques. Cependant, peu d'études adressent directement la question d'un changement de mode de division à l'origine de ces modifications.

Attester d'une corrélation/causalité entre variations de durée de phase et changement de mode de division n'est pas trivial sur le plan expérimental. Une première étape dans ce processus expérimental consiste en une mesure précise des durées de cycle et des différentes phases. La seconde étape nécessiterait une identification des différentes catégories de progéniteurs selon leur mode de division (symétriques prolifératifs, asymétriques neurogéniques et symétriques terminaux) par des marqueurs fiables. Un exemple est représenté par l'étude d'Arai et collaborateurs, qui discriminent les différents types de progéniteurs à l'aide de marqueurs moléculaires spécifiques. Une alternative consisterait en l'identification précise du destin des cellules filles rapidement après la mitose à l'aide de marqueurs spécifiques. De tels marqueurs ne sont actuellement pas disponibles en particulier concernant l'identification des neurones, dont la plupart des marqueurs ne sont exprimés que tardivement lors du processus de différenciation et ne permettent pas d'identifier les neurones naissants.

Peu ou pas de stratégies « parfaites » existent donc à l'heure actuelle. Cependant une approche *ex vivo* (très proche de *in vivo*) combinant une **analyse clonale** par **imagerie en live** avec **mesures précises des durées** de cycle et **identification des destins des cellules filles par suivi long-terme**, comme utilisé par Molina et collaborateurs en est la plus proche (Molina et al., 2022). Ainsi des études supplémentaires utilisant ce type d'approche dans différents contextes (par exemple cortex VS moelle) et différents modèles pourraient apporter de nouveaux arguments en faveur d'un lien entre durée de phase et mode de division. De plus, le développement de nouveaux outils, comme des marqueurs de destin précoce des cellules filles après division, devrait permettre d'alléger la stratégie expérimentale.

Bien entendu, de telles approches se reposent sur l'identification des cellules filles pour identifier rétrospectivement le MDD de la cellule mère, et ce longtemps après la division de cette dernière. Ainsi, il existe toujours dans ces approches une fenêtre après la division de la cellule mère, pendant laquelle pourrait se dérouler des événements menant à l'acquisition d'identités dans les cellules filles qui ne correspondraient pas au « vrai » MDD utilisé par la mère (Par exemple, une cellule mère pourrait se diviser de manière asymétrique, mais les événements post-divisions conduiraient à la génération de deux progéniteurs). **Ainsi, une véritable approche parfaite devrait pouvoir identifier de manière prospective le MDD utilisé par la cellule mère.** Cependant, des marqueurs prospectifs des différents MDD ne sont pas aujourd'hui connus.

Cette question de la modification des durées de phase/cycle et de son impact sur un changement du MDD au cycle n (effet pré-mitotique), ou sur un changement de l'acquisition de l'identité des cellules filles au cycle $n+1$ (effet post-mitotique) fait toujours l'objet d'intenses recherches. Par exemple, quelques études récentes suggèrent que le timing du point de restriction en G1 dépendrait de l'historique de la signalisation de la cellule mère dans le cycle cellulaire précédent, et en particulier de l'accumulation de régulateurs dans la phase G2 précédente (Min et al., 2020; Moser et al., 2018; Naetar et al., 2014). Dit autrement, les événements se déroulant dans les cellules filles découleraient (au moins en partie) des événements s'étant déroulés précédemment dans la cellule mère.

Ici également, la stratégie expérimentale pour aborder cette question n'est pas simple à définir. Une possibilité serait de moduler précisément la diminution ou la surexpression de facteurs clés au cours du cycle cellulaire d'une cellule mère, par exemple par un pulse court desdits facteurs, et de s'assurer une absence d'exposition dans les cellules filles immédiatement après la mitose. Il y a fort à parier que de telles stratégies expérimentales se développeront dans le futur, pour répondre à la question d'un rôle pré- ou post-mitotique dans l'acquisition d'un destin cellulaire, qui reste au cœur d'un débat toujours actuel.

Chapitre IV : p57Kip2 (CDKN1C), un CKI régulateur de la neurogenèse

Dans le cadre de mes travaux de thèse, j'ai identifié p57Kip2 (CDKN1C) à travers des analyses transcriptomiques comme potentiel candidat à la régulation de la transition du mode de division symétrique prolifératif vers asymétrique neurogénique au cours de la neurogenèse embryonnaire. P57Kip2 est un acteur extrêmement important du développement embryonnaire, jouant de multiples rôles, et dont la régulation est très finement contrôlée. Ainsi, au travers d'une première partie, je décrirai la structure, les différentes fonctions connues et les mécanismes régulant l'expression et l'activité de p57Kip2. J'aborderai également, de façon succincte, les quelques pathologies connues résultant d'une régulation anormale de p57Kip2. Dans un second temps, je me focaliserai sur le profil d'expression et les études de modulation de p57Kip2 au cours de la neurogenèse, dont les résultats nous amènent à poser la question de l'implication de p57Kip2 dans le contrôle des modes de division.

Partie A : p57Kip2 (CDKN1C) : Généralités - Structure – Fonctions – Régulation

Comme précédemment évoqué, p57Kip2 (CDKN1C) appartient avec p21Cip1 (CDKN1A) et p27Kip1 (CDKN1B) à la famille des inhibiteurs Cip/Kip, dont le premier rôle décrit à travers la littérature est la régulation négative du cycle cellulaire à travers une interaction avec les divers complexes cyclines – CDKs (p21Cip1 : Gu et al., 1993 ; Harper et al., 1993 ; p27Kip1 : Polyak et al., 1994a., 1994b.; Toyoshima and Hunter, 1994 ; p57Kip2: Lee et al., 1995; Matsuoka et al., 1995), bien que des travaux plus récents aient également décrit des rôles cycle cellulaire-indépendants pour chacun des membres de la famille (Besson et al., 2008; Lim and Kaldis, 2013).

A.1 – Structure du gène CDKN1C et de la protéine p57Kip2

CDKN1C est un gène à empreinte paternelle, présentant chez l'Homme et la souris une expression largement préférentielle (mais non exclusive) de l'allèle maternel (Matsuoka et al., 1996). CDKN1C est localisé chez l'homme sur le chromosome 11, au locus 11p15.5 (Matsuoka et al., 1995), et sur le chromosome 7 chez la souris (Hatada and Mukai, 1995.). Il est intéressant de noter que les régions génomiques contenant CDKN1C sont agencées de la même manière chez l'Homme et la souris, suggérant une importance de l'organisation génomique dans la régulation de l'expression du gène. Chez l'Homme, CDKN1C contient 4 exons et 3 introns, et la protéine p57Kip2 est codée par les exons 2 et 3 (Tokino et al., 1996).

Chez le poulet, le modèle d'étude utilisé dans le cadre de mes travaux de thèse, les séquences nucléotidiques (et par extension protéiques) de CDKN1C (p57Kip2) ont été identifiées par des procédés d'annotations automatiques du génome (RefSeq –NCBI) et restent à l'état de séquences « prédites ». Cependant, une analyse d'alignement des séquences nucléotidiques et protéiques de la version aviaire de CDKN1C/p57Kip2 VS les versions humaines/souris montrent un assez haut degré d'homologie entre les séquences, particulièrement au niveau protéique. Ceci permet d'émettre l'hypothèse de rôles conservés entre les différentes espèces.

Chez l'Homme, la structure protéique de p57Kip2 comprend 3 domaines (**Figure 20**). Les domaines I et III présentent notamment une forte homologie avec p21Cip1 et p27Kip1. Le domaine I est subdivisé en trois sous-régions permettant les interactions cyclines – CDKs : la région 1 permet la liaison avec la cycline, la région 2 la liaison avec la CDK, et la région 3 correspond à une hélice α responsable de l'inhibition des couples cyclines A/E – CDK2 par insertion dans le site catalytique du complexe cycline – CDK (Hashimoto et al., 1998). Le domaine I est également responsable de la liaison avec différents facteurs de transcription. Le domaine III comprend un motif QT, une séquence de localisation nucléaire putative (Lee et al., 1995) ainsi qu'un site consensus de phosphorylation par CDK2 (Thréonine 310 – Kamura et al., 2003a) permettant la dégradation de p57Kip2 par la voie du protéasome. Enfin, le domaine II, spécifique à p57Kip2, est riche en répétitions de proline et alanine et est appelé domaine PAPA. Ce domaine est spécifique à la protéine p57Kip2 humaine (Matsuoka et al., 1995), et lui confère des interactions spécifiques (par exemple, avec la Kinase LIMK1, un effecteur de la voie Rho impliqué dans la régulation de la polymérisation de l'actine – Yokoo et al., 2003).

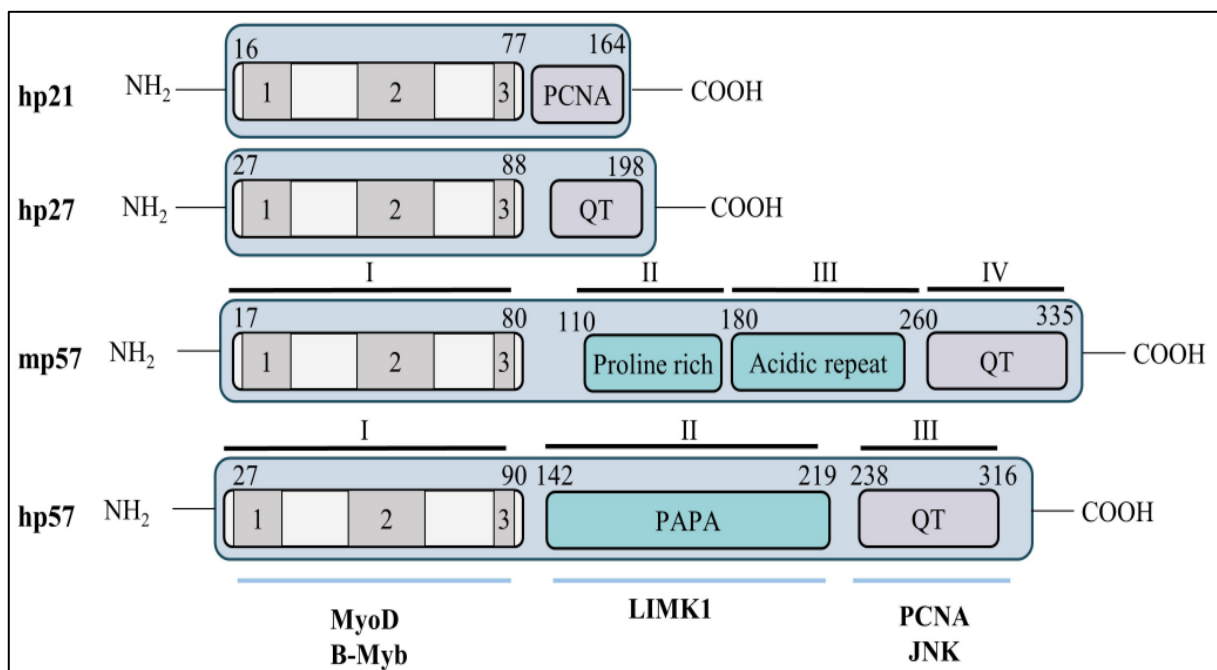


Figure 20 : Représentations schématiques des protéines humaines p21Cip1 (hp21), p27Kip1 (hp27), p57Kip2 (hp57) et souris p57Kip2 (mp57). Le domaine I contient notamment les éléments permettant l'interaction et l'inhibition des couples cyclines – CDKs. – Adapté de Creff et Besson., 2020.

A.2 – Fonctions de p57Kip2

Au cours du développement embryonnaire, p57Kip2 et les autres membres de la famille Cip/Kip sont exprimés dans de très nombreux organes et régions (notamment le SNC - Campbell et al., 2020 - **Figure 21**). Leurs rôles cruciaux au cours du développement ont été mis en évidence à travers les nombreux phénotypes sévères observés lors d'analyse de modèles K.O pour les différents gènes (Campbell et al., 2020). Les différents phénotypes observés dans ces modèles sont bien souvent associés à un défaut de contrôle du cycle cellulaire, ce qui représente la fonction canonique des inhibiteurs de la famille Cip/Kip. D'autres études ont également mis en lumière des fonctions de p57Kip2 dans d'autres processus.

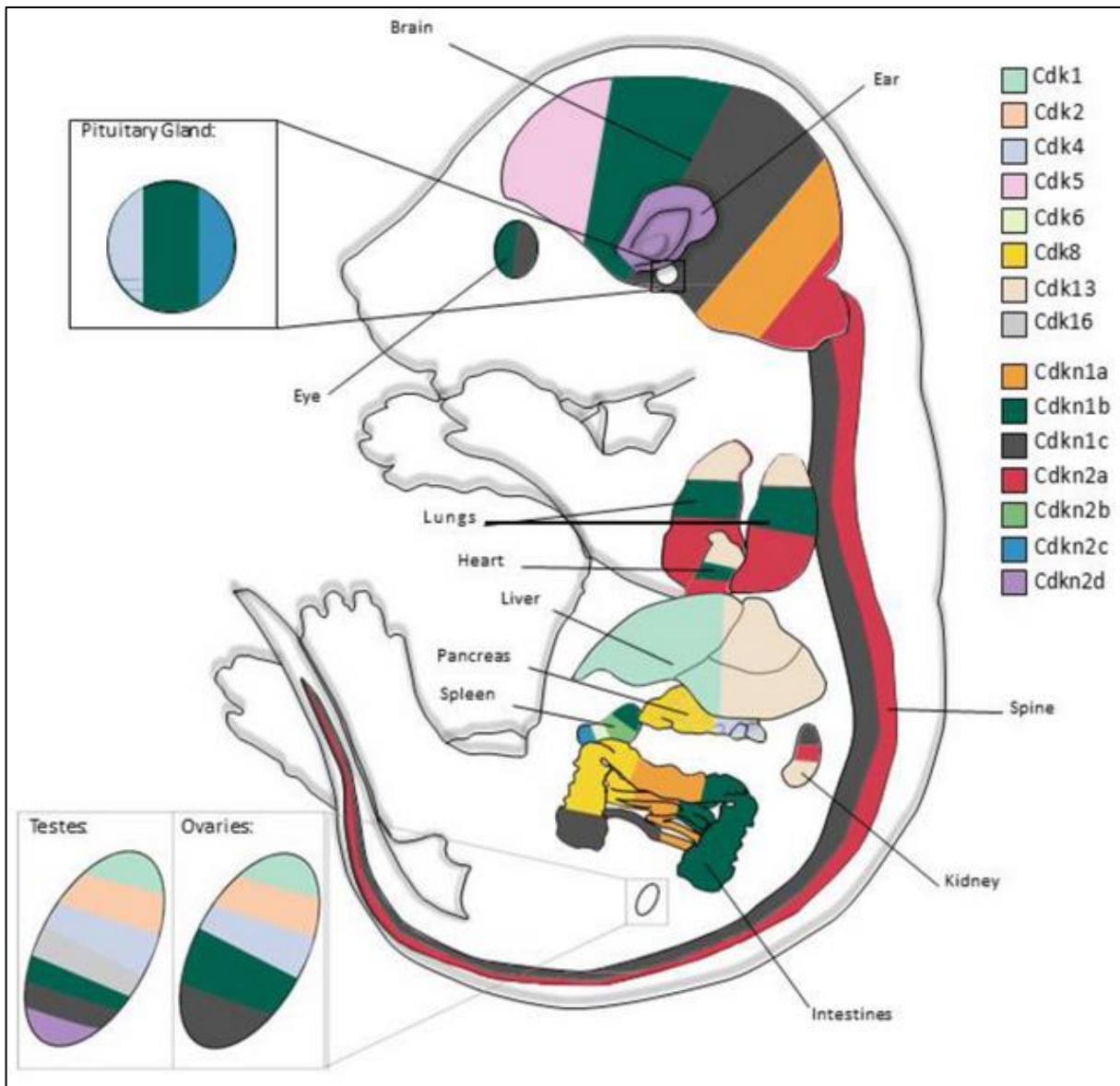


Figure 21 : Représentation schématique des principales zones d'implication des CDKs et CKIs au cours du développement murin. Les différentes régions d'un embryon de souris au stade E17.5 présentent certains phénotypes lors de l'altération de l'expression d'une CDK ou d'un CKI, et sont représentées avec des couleurs différentes en fonction de la CDK/CKI incriminée. Ces différentes zones ont été déterminées par l'observation de phénotypes dans des modèles de souris KO et cKO. Les KO de CDK1, CDK4, CDK6, CDK11, CDK13, CDKN1B, **CDKN1C** et CDKN2C affectent le développement embryonnaire global. – Adapté de Campbell et al., 2020

A.2.1 – Fonction canonique de p57Kip2

Pour élucider les rôles et fonctions de p57Kip2 au cours de l'embryogenèse, des premières études se sont appuyées sur la génération de modèles murins mutants pour son expression. Dans un premier temps, des modèles K.O par ablation de p57Kip2 (p57Kip2^{-/-} - Yan et al., 1997) et par transmission à la descendance d'un allèle maternel défaillant (p57Kip2^{+p/-m} - Zhang et al., 1997) ont montré de très nombreux défauts de développement embryonnaire avant la naissance (Omphalocèle, divers défauts de développement intestinaux, de positionnement correct des muscles, d'ossification du squelette, une dysplasie médullaire rénale ou encore une hyperplasie du cortex surrénalien) chez les animaux déficients pour p57Kip2, en lien avec **un défaut de contrôle de la prolifération prénatale** et une augmentation de l'apoptose dans les divers organes affectés. La mortalité embryonnaire s'approche des 90%, et les nouveau-nés présentent des anomalies supplémentaires, notamment une fente labio-palatine et des difficultés respiratoires. Dans un autre modèle murin, exprimant de 1 à 8 copies supplémentaires du gène CDKN1C (Andrews et al., 2007), la croissance est diminuée à partir de E13.5, selon un effet dose-dépendant. Ainsi, ces études ont montré la nécessité de p57Kip2 pour le développement embryonnaire correct, à travers une expression en provenance d'un seul allèle.

Ces différents phénotypes s'expliquent par un défaut de régulation de la balance entre prolifération et différenciation, se traduisant par un excès de prolifération en l'absence de p57Kip2 ou un excès de sortie de cycle des cellules progénitrices en condition de surexpression. En effet, p57Kip2 est un inhibiteur du cycle cellulaire, capable d'induire l'arrêt du cycle cellulaire au cours de la phase G1 (Sherr and Roberts, 1999). Des études *in vitro* ont montré que p57Kip2 pouvait s'associer et inhiber l'activité de nombreux complexes cyclines – CDKs tels que les couples cyclines A/E – CDK2, cycline E - CDK3, cycline D2 - CDK4, et dans une moindre mesure des couples cycline B – CDK1 et cycline D2 – CDK6 (Matsuoka et al., 1995). Cependant, il est à noter que les capacités d'interaction de p57Kip2 avec l'ensemble des différents couples cyclines – CDKs caractérisés dans des contextes *in vivo* restent peu connues. A travers l'insertion d'une hélice α spécifique dans le domaine catalytique des CDKs, la liaison de l'ATP est empêchée, ce qui entrave l'activité de phosphorylation des couples cyclines – CDKs. Bien que ce mécanisme n'ait été montré qu'à travers l'étude de la structure cristalline de p27Kip1 associé au complexe cycline A - CDK2, l'homologie de séquence du domaine inhibiteur avec les autres membres de la famille Cip/Kip suggère un mécanisme d'inhibition commun (Russo et al., 1996).

Ainsi, les nombreux phénotypes observés dans les souris K.O pour l'expression de p57Kip2 sont associés à un excès de prolifération et un défaut de contrôle de la sortie du cycle cellulaire. Cependant, les modèles K.O pour l'expression des autres membres de la famille Cip/Kip (p21Cip1 et p27Kip1) présentent aussi de nombreux phénotypes embryonnaires associés à une dérégulation de la balance entre prolifération et différenciation (Campbell et al., 2020). Ainsi se pose la question de la spécificité des phénotypes observés lors de la dérégulation de p57Kip2.

Pour répondre à cette question, un modèle murin mutant K.I p57^{p27KI}, au sein duquel la séquence codante de p27Kip1 a été insérée (Knock-In) au locus p57Kip2, a été généré. L'analyse des phénotypes développés par les souris mutantes au cours de l'embryogenèse a révélé une redondance fonctionnelle importante entre p27Kip1 et p57Kip2, car l'expression de p27Kip1 corrige de nombreux phénotypes causés par l'absence de p57Kip2 (Susaki et al., 2009). P57kip2 et p27Kip1 partageant un rôle commun de régulateur de sortie de cycle, il semble plausible que l'ensemble des phénotypes p57Kip2 K.O corrigés par le Knock-In de p27Kip1 soient associés à un contrôle correct de la sortie de cycle. De façon intéressante, certains défauts observés chez les souris p57Kip2 K.O ne sont pas restaurés via l'expression de p27Kip1, reflétant des fonctions spécifiques jouées par p57Kip2 au cours du développement (**Figure 22**).

p57Kip2 K.O	p57 ^{p27KI}	p57 ^{CK-}	Interprétation
Mort néonatale (90%)	Sauvetage	Phénocopie	CDK-dépendant
Défaut de formation de la lentille (60%)	Sauvetage	Phénocopie	CDK-dépendant
Raccourcissement des os (100%)	Sauvetage	Phénocopie	CDK-dépendant
Défaut de fermeture du mur abdominal (Omphalocèle)	Phénocopie	Phénocopie	CDK-dépendant mais p27 semble ne pas sauver
Raccourcissement des intestins (30%)	Sauvetage	Sauvetage	CDK-indépendant / commun avec p27 ?
Dysplasie rénale (80%)	Phénocopie	Sauvetage	CDK-indépendant
Fente labio-palatine (50%)	Sauvetage	Augmentation (76%)	CDK-dépendant et indépendant
Hyperplasie surrénale (70%)	Sauvetage 50%	Augmentation	CDK-dépendant et indépendant

Figure 22 : Résumé des phénotypes observés chez les souris p57Kip2 K.O, p57^{p27KI} et p57^{CK-}. Adapté de Creff et Besson 2020.

A.2.2 – Fonctions non canoniques de p57Kip2

De nombreuses études ont décrit des rôles additionnels pour p57Kip2, dépendant ou non de son activité sur le cycle cellulaire. Je développerai ici et de façon succincte les diverses fonctions découvertes.

Bien que le rôle principalement décrit de p57Kip2 jusqu'à présent soit le contrôle du cycle, l'étude d'un modèle mutant K.I pour une version de p57Kip2 incapable de se lier aux divers complexes cyclines – CDKs (p57^{CK-}, Duquesnes et al., 2016) a permis de mettre en évidence des fonctions cycle cellulaire-indépendantes de p57Kip2 au cours du développement. En effet, certains phénotypes observés chez les animaux p57Kip2 K.O sont totalement absents chez les souris p57^{CK-}, et d'autres sont aggravés ou plus fréquents chez les souris p57^{CK-}, suggérant des rôles dépendant et indépendant des complexes cyclines – CDKs pour p57Kip2 dans les divers tissus (**Figure 22**).

P57Kip2 peut également jouer un rôle de **régulateur de la transcription**, de manière directe et/ou indirecte. A l'instar des autres membres de la famille Cip/Kip, p57Kip2 peut réprimer la transcription par inhibition des complexes cyclines – CDKs, bloquant la phosphorylation des protéines de la famille Rb et l'activation des facteurs de transcription de la famille E2F. De plus, il a été montré que p57Kip2 peut réguler négativement l'activité de l'ADN polymérase II par interaction avec E2F1 (Ma et al., 2010). Dans divers contextes, p57Kip2 peut moduler l'activité transcriptionnelle (à la hausse ou à la baisse) par interaction directe avec des facteurs de transcription. Par exemple, p57kip2 peut s'associer avec Mash1 dans les progéniteurs neuraux pour inhiber son activité transcriptionnelle et favoriser la différenciation (Joseph et al., 2009). Enfin, une étude récente a établi l'interactome de p57Kip2 et identifié 183 protéines partenaires de p57Kip2, dont de nombreux facteurs de transcription (Duquesnes et al., 2016).

Des rôles de p57Kip2 dans la **régulation de la différenciation** de nombreux type cellulaires ont également été décrits à travers la littérature, notamment au cours du développement embryonnaire. Dans le contexte de la neurogenèse, p57Kip2 régule la différenciation des cellules souches neurales en oligodendrocytes (SNC) et cellules de Schwann (SNP) via divers mécanismes, dépendant et indépendant de sa fonction de régulateur du cycle cellulaire (Creff and Besson, 2020). La régulation du destin oligodendrocytaire peut être positive ou négative, en fonction du contexte et de la localisation subcellulaire de p57Kip2. P57Kip2 est également impliqué dans la différenciation des neurones dopaminergiques via une interaction avec le récepteur nucléaire Nurr1 (Joseph et al., 2003), et participe à la différenciation d'une sous-population de progéniteurs neuraux en interneurons amacrines dans la rétine embryonnaire de souris (Dyer and Cepko, 2000).

P57Kip2 joue également un rôle crucial dans l'ossification chez l'embryon via l'arrêt du cycle cellulaire des chondrocytes, ce qui déclenche leur différenciation (Stewart et al., 2003). En parallèle, P57Kip2 participe à la régulation de la production du collagène de type X au sein de ces chondrocytes en différenciation. Enfin, p57Kip2 déclenche la différenciation des cellules musculo-squelettiques (Zhang et al., 1999) via une action coordonnée avec p21Cip1 et le facteur de transcription myogénine.

P57Kip2 est également impliqué dans la **régulation et le maintien de la quiescence** dans plusieurs types de **cellules souches adultes**. Par exemple, dans les cellules souches hématopoïétiques, p57Kip2 favorise la quiescence par interaction avec la protéine chaperonne Hsc70, ce qui résulte en la formation de complexes Hsc70 – cycline D1 séquestrés dans le cytoplasme. Dans ce contexte, cycline D1 ne peut assurer la phosphorylation des protéines de la famille Rb avec un partenaire CDK, et le cycle cellulaire est interrompu (Zou et al., 2011). Au sein de l'hippocampe adulte, p57Kip2 lutte contre l'épuisement de la réserve de cellules souches progénitrices en maintenant ces dernières dans un état quiescent (Furutachi et al., 2013).

Enfin, p57Kip2 joue également un rôle dans la **régulation du cytosquelette**, à travers une interaction avec la kinase LIMK1 médiée via le domaine spécifique PAPA (**Figure 20**). Dans certains contextes, cette interaction résulte en la translocation des complexes p57Kip2 – LIMK1 vers le noyau, avec pour conséquence une diminution de la production de fibres de stress (Heinen et al., 2008; Yokoo et al., 2003). Dans d'autres contextes, la liaison de p57Kip2 avec LIMK1 augmente son activité de kinase, et favorise la production de fibres de stress (Vlachos and Joseph, 2009). Ceci indique que le rôle de p57Kip2 dans la régulation du cytosquelette est

contexte-dépendant. Également, il a été montré *in vivo* que la diminution de l'expression de p57Kip2 (shRNA) défavorise la migration des neurones dans le cortex de souris en développement (Itoh et al., 2007), alors que la surexpression favorise la migration radiale des progéniteurs neuronaux (Tury et al., 2011).

A.3 – Régulation de p57Kip2

Conformément au rôle crucial de p57Kip2 dans la régulation spatio-temporelle de la prolifération, notamment au cours du développement, son expression est fortement contrôlée à travers de multiples mécanismes de régulation. Ceci se traduit par un pattern d'expression de p57Kip2 spécifique au tissu, à la phase de développement et au type cellulaire. De plus, p57Kip2 est un gène à empreinte, ce qui souligne l'importance du bon dosage de son expression. Je décrirai ici les différents mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression de p57Kip2 au cours du développement et de la différenciation.

A.3.1 – Régulation par les voies de signalisation

La transcription de p57Kip2 est régulée de manière type-cellulaire spécifique, en partie via des voies de signalisation intracellulaires et des facteurs extracellulaires. De nombreux effets indirects, liés au dialogue croisé entre les différentes voies, rendent le tableau final difficile à interpréter. Cependant, certains liens fonctionnels directs entre voies de signalisation et régulation de p57Kip2 ont été établis, notamment pour les voies Notch et TGF- β .

En effet, la voie de signalisation Notch peut directement réprimer l'expression de p57Kip2 au cours du développement embryonnaire (à travers des effecteurs tels que Hes1 ou Herp2) dans divers types de progéniteurs, tels que les progéniteurs pancréatiques (Georgia et al., 2006), des cryptes intestinales (Riccio et al., 2008), du cristallin (Jia et al., 2007) et des cellules souches musculaires (Zalc et al., 2014), favorisant ainsi l'aspect prolifératif des populations progénitrices. La Figure 24 récapitule les différents types cellulaires pour lesquels cette répression de la transcription de p57Kip2 par la voie Notch a été observée (**Figure 24**).

Également, il a été montré une activité de répression de l'expression de p57Kip2 par la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans divers contextes, tels que les cellules souches hématopoïétiques, les cellules souches épithéliales de la cornée ou encore les progéniteurs neuronaux (Rossi et al., 2018). Cependant, le rôle fonctionnel de la répression de p57Kip2 par la voie Wnt/ β -caténine n'a pas encore été étudié. À l'inverse, la voie TGF- β /Smad promeut l'activation de l'expression de p57Kip2 dans certains contextes cellulaires, notamment de quiescence. Par exemple, il a été montré dans les cellules souches hématopoïétiques que l'arrêt du cycle cellulaire dépendant de p57Kip2 permet la mise en place de la signalisation TGF- β /Smad, dont la conséquence sera l'augmentation de l'expression de p57Kip2 (Billing et al., 2016; Scandura et al., 2004). Également, certains autres membres de la superfamille TGF- β entraînent une augmentation de l'expression de p57Kip2 dans des contextes de différenciation (Gosselet et al., 2007; Shi and Liu, 2011).

bHLH	Effet sur transcription p57Kip2	Type cellulaire
Hes1	Répression	Cellules musculaires
		Cellules intestinales
		Progéniteurs pancréatiques
		Cellules β pancréas
		Cellules carcinome hépatocellulaire
		Progéniteurs pituitaires
Herp2	Répression	Cellules fibreuses cristallin
MyoD	Induction	Cellules musculaires
Mash2	Induction	Cellules de Schwann
TCF4/E2-2	Induction	Progéniteurs neuraux
Id2	Répression	Cellules neurectodermes
		Cellules neurectodermes
E47	Induction	Cellules β pancréas
		Cellules β pancréas
Ngn2	Induction	Progéniteurs neuraux
HIF1 α /HIF2 α	Induction	Cellules souches hématopoïétiques
HIF1 α	Induction	Chondrocytes

Figure 24 : Facteurs de transcription bHLH impliqués dans la régulation de la transcription de p57 dans divers types cellulaires. - Adapté de Rossi et al., 2018.

Également, plusieurs études ont mis en lumière une activation de l'expression de p57Kip2 en aval de la voie de signalisation HIF1 de réponse à l'hypoxie (Eliasson et al., 2010; Schipani et al., 2001). Enfin, il a été montré que la voie de signalisation DDR (DNA Damage Response) peut induire l'expression de p57Kip2 en réponse à des stress génotoxiques, résultant en l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 tout en favorisant la survie cellulaire (Jia et al., 2015).

A.3.2 – Facteurs trans et éléments cis de régulation

De nombreuses études ont permis d'identifier de multiples facteurs de régulation de l'expression de p57Kip2, agissant en-cis ou en-trans. Concernant les éléments en-trans, un rôle de régulation contexte-dépendant a été identifié pour plusieurs facteurs bHLH (**Figure 24** – Rossi et al., 2018), via leur fixation sur des sites E-box et E-box-like contenus dans les régions promotrices distales de p57Kip2 (**Figure 25**). Les protéines à doigts de Zinc Sp1 et Egr1 participent également à la régulation de l'expression de p57Kip2 via leur liaison sur des sites spécifiques dans la région promotrice proximale. Ces protéines sont notamment impliquées dans la trans-activation de p57Kip2 dépendante de MyoD dans les cellules musculaires (Figliola et al., 2008). La région promotrice proximale contient également des sites de fixation pour la protéine CTIP2, réprimant l'expression de p57Kip2 dans certaines cellules tumorales humaines, via sa fixation et le recrutement d'enzymes de modification de la chromatine dans la région promotrice (Cucciolla et al., 2007; Topark-Ngarm et al., 2006).

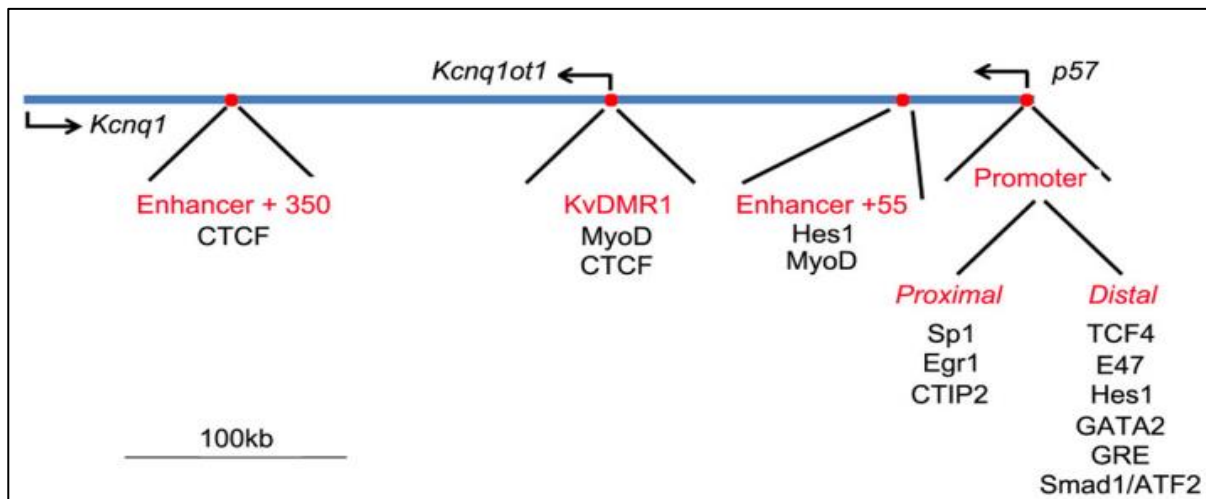


Figure 25 : Facteurs en-trans et séquences en-cis de régulation de l’expression de p57Kip2. Les petits ronds rouges représentent les régions régulatrices connues de p57Kip2 chez l’Homme et/ou la souris. Les facteurs en-trans connus pour se lier aux différentes régions de régulation sont indiquées en bas. - Adapté de Rossi et al., 2018

Au regard des éléments de régulation en-cis, les régions promotrices distale et proximale ont été bien caractérisées, et contiennent de nombreux sites de liaison pour les facteurs mentionnés précédemment. A l’inverse, peu d’études se sont intéressées aux éléments de régulation en-cis plus distaux. Quelques travaux, s’appuyant sur la conservation (entre l’Homme et la souris) de la distribution de marques chromatinienne caractéristiques d’éléments « enhancers », ont permis l’identification de 3 séquences enhancers putatives (+55, +96 (KvDMR1) et +350kb – **Figure 25**) pour le gène CDKN1C chez l’Homme (Cerrato et al., 2014; López-Abad et al., 2016). Le plus distal de ces éléments est capable d’interagir avec la protéine CTCF et de se retrouver en contact avec la région promotrice via la formation d’une boucle de chromatine. Le rôle exact de cette interaction n’a cependant pas encore été étudié. L’expression de p57Kip2 est également sous la régulation d’une région de contrôle de l’empreinte (ICR : Imprinting Control Region) appelée KvDMR1 ou IC2 (**Figure 25**). Cette région participe notamment à la répression de l’expression en provenance de l’allèle paternel (Sanli and Feil, 2015; Shin et al., 2008).

A.3.3 – Modifications de la chromatine

L’expression de p57Kip2 est également régulée par des modifications de l’état de la chromatine dans la région promotrice, le corps du gène, et dans la région de contrôle de l’empreinte KvDMR1. Parmi ces modifications, la méthylation de l’ADN et les modifications post-traductionnelles des protéines histones ont été les plus étudiées.

P57Kip2 est presque entièrement inclus dans un îlot CpG, dont la séquence débute environ 600 paires de bases en amont du site d’initiation de la transcription et se prolonge jusque dans le corps du gène. Chez la souris, mais pas chez l’Homme, cette région est hyperméthylée sur l’allèle paternel et hypométhylée sur l’allèle maternel. Certaines études suggèrent que cette marque épigénétique, acquise au cours du développement, est impliquée dans la maintenance et/ou le renforcement de la répression de l’expression depuis l’allèle paternel (Bhogal et al., 2004). La méthylation complète du promoteur de P57Kip2 a également été observé dans plusieurs cas de cancers humains et dans diverses lignées de cellules tumorales (Kikuchi et al., 2002; Rossi et al., 2018). Dans ces contextes, la méthylation rend inaccessible l’accès au

promoteur à divers facteurs en-trans (Exemples : Sp1 et Egr1) et est associée à une répression de l'expression de p57Kip2. Ce mécanisme d'inhibition de l'expression par méthylation complète de la région promotrice est également retrouvée dans les cellules musculaires non-différenciées (Figliola et al., 2008). De manière contre-intuitive, la méthylation de l'ADN au niveau de la région de contrôle de l'empreinte KvDMR1, normalement présente sur l'allèle maternel, est associée à l'expression de p57Kip2. A l'inverse, l'hypométhylation observée sur l'allèle paternel est associée à la répression (**Figure 26**).

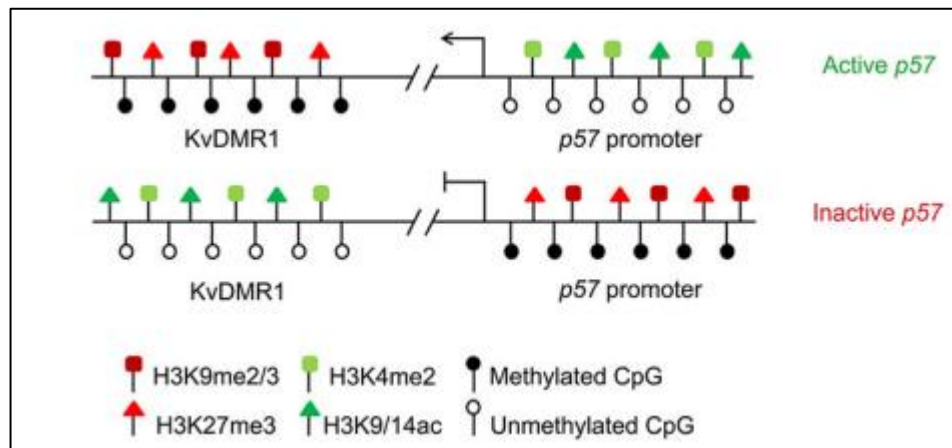


Figure 26 : Représentation schématique des principales marques épigénétiques retrouvées sur la région promotrice de p57Kip2 et dans la région de contrôle KvDMR1 en relation avec l'activité du gène. Les symboles rouges représentent des marques épigénétiques répressives, et les symboles verts des marques activatrices - Adapté de Rossi et al., 2018

Les modifications post-traductionnelles des protéines histones participent également à la régulation de l'expression de p57Kip2. Par exemple, un faible niveau d'acétylation des lysines est observé dans la région promotrice et le corps du gène de l'allèle paternel, associé à sa répression (et l'inverse est observé sur l'allèle maternel – **Figure 26**). A l'inverse, la méthylation des lysines favorise généralement la répression de l'expression. Cette combinaison de différentes marques épigénétiques reflète la nécessité d'un contrôle spatio-temporel et type-cellulaire spécifique précis de l'expression de p57Kip2. Bien que les différentes marques et leurs effets aient été caractérisées dans certains contextes, peu de choses sont connues sur les mécanismes régulant leur dépôt et retrait.

A.3.4 – Régulation par les miRNAs et LncRNAs

Certains types d'ARNs participent aussi à la régulation de l'expression de p57Kip2. Parmi ces molécules, Kcnq1ot1, un long ARN non-codant dont la séquence génomique est localisée dans le locus p57Kip2 (**Figure 24**), a été le plus étudié. Ce LncRNA est exprimé uniquement depuis l'allèle paternel et réprime en-cis l'expression des divers gènes codants retrouvés dans le locus de p57Kip2 (Mohammad et al., 2008; Pandey et al., 2008). Plus récemment, et dans des modèles tumoraux, d'autres LncRNAs ont été identifiés comme des régulateurs de l'expression de p57Kip2 (Zhang et al., 2016). Enfin, de nombreux miRNAs contribuent également à la régulation négative de l'expression de p57Kip2, notamment dans les cellules souches (Sengupta et al., 2009) et divers contextes tumoraux (Creff and Besson, 2020).

A.3.5 – Régulation post-transcriptionnelle

Alors que beaucoup d'études se sont intéressées aux mécanismes de régulation transcriptionnelle de p57Kip2, paradoxalement peu de choses sont connues sur les mécanismes post-transcriptionnels contrôlant l'expression de ce gène. La stabilité protéique des différents membres de la famille Cip/Kip est régulée par des mécanismes d'ubiquitinylation ciblant les CKIs pour la dégradation médiée par le protéasome (Lu and Hunter, 2010). Chez l'Homme et la souris, il a été montré l'existence dans le site C-terminal de p57Kip2 d'un site de phosphorylation consensus pour CDK2, qui promeut la dégradation de p57Kip2 par la voie du protéasome. Cette dégradation s'appuie notamment sur le complexe d'ubiquitination SCFSkp2, composé des protéines Skp1/Cul1 et Skp2 (Kamura et al., 2003b). Dans un contexte de cancer cervical, une suractivité de la voie ubiquitinylation/protéasome, menant à une dégradation trop importante de p57Kip2, a été mise en cause.

A.4 – p57Kip2 et pathologies

La dérégulation de l'expression et/ou de l'empreinte génomique de p57Kip2, l'apparition de mutations ponctuelles dans la séquence codante ou encore la perte d'hétérozygotie sont à l'origine du développement de plusieurs pathologies héréditaires (tels que les syndromes de Beckwith-Wiedemann, IMAGE et Silver-Russell) et peuvent également contribuer au développement et à la progression du cancer.

En effet, une diminution de l'expression de p57Kip2 est observée dans divers types de cancers (sein (Borriello et al., 2011), foie (Kavanagh and Joseph, 2011), hématologiques (Guo et al., 2010)). Ainsi, les niveaux d'expression de p57Kip2 sont utilisés comme marqueurs pronostiques et prédictifs de l'évolution de ces pathologies. Dans ces contextes, l'expression de p57Kip2 est dérégulée via la perturbation de mécanismes de régulation transcriptionnels (altération de voies de signalisation, modification du statut chromatinien) et post-transcriptionnels. En particulier, la surexpression de miRNAs spécifiques est observée dans plusieurs cancers (Cioffi et al., 2015; Fornari et al., 2008; Mishra et al., 2014).

Le syndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) est une maladie génétique rare, caractérisée par de nombreuses anomalies de développement, une croissance excessive et une prédisposition au développement de tumeurs chez l'enfant. Les principales causes de cette pathologie sont des perturbations génétiques ou épigénétiques survenant dans la région chromosomique 11p15.5, conduisant à la perte de l'expression de p57Kip2 (Brioude et al., 2013a). En particulier, la perte de la méthylation de l'ADN de la région de contrôle de l'empreinte KvDMR1 sur l'allèle maternel est l'altération la plus couramment observée (environ 50% des patients - Eggermann et al., 2014).

A l'inverse, les syndromes IMAGE et de Silver Russell (SSR) sont associés à des mutations gain-de-fonction de p57Kip2 (Brioude et al., 2013). Ces pathologies, dont l'occurrence est très rare, présentent des phénotypes contraires à ceux observés chez les patients BWS (Eggermann et al., 2014). Les principales causes du syndrome IMAGE sont des mutations ponctuelles dans la séquence codante (de p57Kip2) pour le domaine de liaison avec PCNA, entraînant une diminution de l'interaction p57Kip2 – PCNA associée à une diminution de la dégradation de p57Kip2 (Arboleda et al., 2012). Certaines de ces mutations sont également impliquées dans le développement du syndrome de Silver Russell, mais ne sont pas la principale cause de à l'origine de cette pathologie (Brioude et al., 2013).

Partie B : p57Kip2 et la régulation de la neurogenèse embryonnaire

Au cours des prochains paragraphes, je me focaliserai sur le rôle de p57Kip2 dans la régulation de la neurogenèse embryonnaire, à travers l'étude des patrons d'expressions de CDKN1C/p57Kip2 et des travaux de modulation de l'expression de p57Kip2 au cours de la neurogenèse embryonnaire spinale et corticale.

B.1 Patrons d'expression de CDKN1C/p57Kip2 au cours de la neurogenèse embryonnaire

Au sein des régions spinales et corticales du tube neural en développement, le début d'expression de CDKN1C/p57Kip2 coïncide avec le début de la neurogenèse. Par la suite, cette expression évolue de manière différente le long de l'axe neuronal, de manière région-spécifique et en fonction du temps, en corrélation avec la progression de la neurogenèse dans les différentes régions en développement.

B.1.1 – Expression dans la région spinale en développement

Dans la région spinale des tubes neuraux de souris et poulet à stades équivalents de la neurogenèse (E11.5 souris – E4 poulet), l'ARNm de CDKN1C est détecté tout au long de l'axe dorso-ventral, à l'exception de deux domaines ventraux : V2 et pMN (Gui et al., 2007 - **Figure 27**). Le patron d'expression décrit une « bande » de cellules, localisées à la périphérie de la région ventriculaire. La protéine p57Kip2 est quant à elle détectée à partir du stade E9.5, atteint un maximum d'expression entre E10.5 et E12.5 (stades auxquels de nombreux neurones sont générés) et diminue fortement à E13.5 – E14.5 (Gui et al., 2007). Un patron d'expression en bande, tout à fait similaire à celui de l'ARNm, est observé (**Figure 27**). Cette bande peut être divisée en 2 sous-bandes : l'une proche de la région du manteau, dans laquelle les cellules expriment des marqueurs de différenciation et sont donc des neurones ; et l'autre plus à l'intérieur de la région ventriculaire, avec une faible proportion de cellules p57Kip2-positives exprimant des marqueurs de prolifération, correspondant à des progéniteurs (Gui et al., 2007).

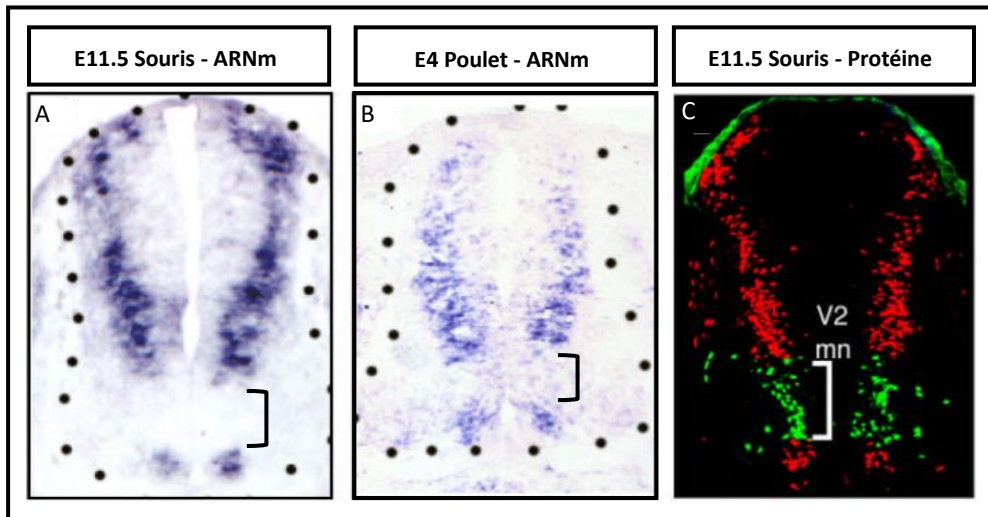


Figure 27 : **Patrons d'expression de CDKN1C/p57Kip2 au cours de la neurogenèse embryonnaire spinale.** (A, B) Patrons d'expression de l'ARNm de CDKN1C dans le tube neural d'embryons de souris au stade E11.5 (A) et de poulet au stade E4 (B) obtenus par hybridation *in situ*. (C) Patron d'expression de la protéine p57Kip2 (rouge) dans le tube neural de souris au stade E11.5 obtenu par immunomarquage. L'utilisation d'un anticorps anti Lhx3 (vert) permet d'apprécier l'absence d'expression dans les domaines V2 et MN. - Adapté de Gui et al., 2007

B.1.2 – Expression dans la région corticale en développement

Dans le cortex de rat en développement, les ARNm des différents membres de la famille Cip/Kip sont tous exprimés entre les stades E12.5 et E20.5 et présentent des profils d'expression dissemblables, suggérant des rôles distincts pour chaque CKI à différents stades du développement cortical (Tury et al., 2011). L'ARNm de p57Kip2 est plus abondamment exprimé entre les stades E12.5 et E16.5, correspondant à la première partie de cette phase neurogénique (**Figure 28**).

Au niveau protéique, p57Kip2 est détecté dans de très nombreuses régions du cerveau en développement (Ye et al., 2009). Entre E12.5 et E16.5, p57Kip2 est principalement détecté, dans les différentes régions, dans les noyaux des cellules de la VZ, la SVZ et le début de la zone du manteau (**Figure 28**). Comme dans la région spinale, une partie des cellules p57Kip2-positives expriment des marqueurs de prolifération (PCNA) et sont localisées principalement à la périphérie de la VZ, voir dans la SVZ ; et une autre partie des cellules expriment des marqueurs de différenciation (Tuj1) (Tury et al., 2011; Ye et al., 2009 - **Figure 28**). Ce patron général d'expression est également retrouvé dans le cortex de souris en développement (Mairet-Coello et al., 2012).

Bien que les patrons d'expressions diffèrent selon les régions et évoluent au cours du temps, la détection de p57Kip2 dans des progéniteurs et neurones de nombreuses régions du cerveau en développement, de E12.5 à E16.5, une phase temporelle au cours de laquelle sont produits de nombreux neurones, suggère une implication de p57Kip2 dans le contrôle de la transition d'un état de prolifération vers la différenciation neuronale.

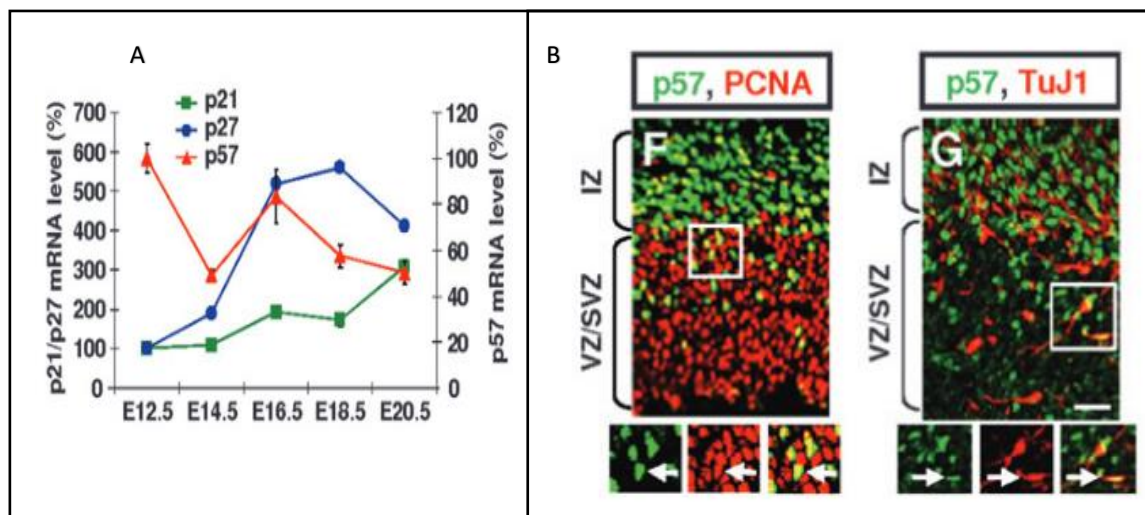


Figure 28 : Patrons d'expression de CDKN1C/p57Kip2 au cours de la neurogenèse embryonnaire corticale. (A) Patrons temporels de l'expression des différents gènes de la famille Cip/Kip dans le cortex du rat en développement, obtenus par Q-RT-PCR. (B) Expression de la protéine p57Kip2 dans des cellules cyclantes (PCNA-positives – Image de gauche) et dans des neurones (TuJ1-positifs – Image de droite) dans la VZ et la SVZ de cortex de rat en développement au stade E14.5. - Adapté de Tury et al., 2011

B.2 Modulation de l'expression de p57Kip2 et impact sur la neurogenèse embryonnaire

Plusieurs études ont évalué l'impact de la modulation de l'expression de p57Kip2 sur la neurogenèse embryonnaire et les mécanismes qui sous-tendent ces perturbations.

Dans les souris mutantes homozygotes $p57Kip2^{-/-}$, la perte de fonction dans le cortex en développement provoque une augmentation temporaire de la prolifération des cellules progénitrices au cours de la période neurogénique (stades embryonnaires E13.5 → E16.5), qui mène à une surproduction de neurones lorsque les cellules quittent le cycle et se différencient (stades embryonnaires E16.5 → E20.5), conduisant à un phénotype macrocéphalique (Mairet-Coello et al., 2012). En particulier, est observé une augmentation du nombre de neurones générés dans toutes les couches corticales, avec un effet plus prononcé dans les couches 5 et 6 (les plus profondes, formées en premier), ce qui diffère des observations réalisées dans le cortex de souris embryonnaire K.O pour p27Kip1, présentant une surproduction de neurones uniquement dans les couches 2 à 5 (Goto et al., 2005). Ainsi, les auteurs de la première étude (Mairet-Coello et al., 2012) suggèrent que p57Kip2 et p27Kip1 pourraient réguler des populations progénitrices différentes, qui donneront naissance à des populations neuronales distinctes. De façon intéressante, ce phénomène d'augmentation transitoire de la prolifération puis de rebond neurogénique est également observé dans la région spinale en développement des souris $p57Kip2^{-/-}$ (Gui et al., 2007)

Dans le cortex murin, cette augmentation de la prolifération est observée dans la VZ et la SVZ, et est associée à une diminution de la durée de cycle des progéniteurs (aRGs et bIPs) déficients pour p57Kip2 à travers une réduction importante et significative de la durée de la phase G1 (Mairet-Coello et al., 2012). Ainsi, il semblerait que p57Kip2 ne soit pas requis pour le processus de différenciation neuronal (puisque les progéniteurs sont capables de donner

naissance à des neurones), mais soit nécessaire pour assurer la transition « au bon moment » d'un état prolifératif vers la différenciation, via la modulation des paramètres de cycle cellulaire des progéniteurs.

A l'inverse, la surexpression ponctuelle de p57Kip2 dans le tube neural spinal en développement entraîne un arrêt prématuré du cycle cellulaire des progéniteurs, donc une perturbation de la neurogenèse en défaveur de la prolifération. Cet arrêt du cycle cellulaire est entièrement dépendant de la capacité de p57Kip2 à interagir via son domaine N-terminal avec les couples cyclines - CDKs (Gui et al., 2007). Le même phénomène est observé dans le cortex de rat en développement, aussi bien *in vivo* que dans des progéniteurs cultivés *in vitro* (Tury et al., 2011). Ainsi, la capacité de modulation de la balance prolifération/différenciation de p57Kip2 semble reposer sur son activité de régulateur du cycle cellulaire.

Se pourrait-il que p57Kip2 module la balance prolifération/différenciation en agissant au niveau du mode de division des progéniteurs ?

Chapitre V : Résultats

Introduction

Au cours du développement du système nerveux central des vertébrés, la transition progressive des cellules souches neuroépithéliales (ou progéniteurs neuraux) d'un mode de division symétrique prolifératif (1 progéniteur produit 2 progéniteurs) vers un mode asymétrique neurogénique (1 progéniteur produit 1 progéniteur et 1 neurone) est un mécanisme clef, conciliant contrôle de l'équilibre entre prolifération / différenciation et génération de la diversité cellulaire. Les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-tendant la mise en place et l'exécution d'une division selon un mode asymétrique ont été extensivement étudiés dans nombres de types cellulaires et organismes, et ont permis d'identifier certains phénomènes permettant, à l'issue de cette division, d'obtenir deux cellules filles d'identités différentes. A l'inverse, les mécanismes sous-jacents à la transition d'un mode de division symétrique prolifératif vers asymétrique neurogénique au cours de cette période neurogénique restent aujourd'hui très peu explorés. De façon très intéressante, quelques études ont identifié certains gènes différentiellement exprimés entre ces deux types de progéniteurs (symétrique prolifératif VS asymétrique neurogénique), suggérant l'existence de programmes transcriptionnels contrôlant la transition entre ces modes de division.

Dans cette étude, nous avons identifié un nouveau rôle pour le gène CDKN1C (p57Kip2), un régulateur négatif de la durée du cycle cellulaire, dans le contrôle de cette transition d'un mode de division symétrique prolifératif vers asymétrique neurogénique. A l'échelle tissulaire, CDKN1C est exprimé de façon progressive au cours de la neurogenèse, dans une partie de la population des progéniteurs neuraux du tube neural spinal embryonnaire de poulet. La diminution d'expression de CDKN1C entraîne une perturbation de la neurogenèse liée à une sur-prolifération des progéniteurs, dont le temps de cycle cellulaire moyen (et plus spécifiquement la durée de phase G1) est diminué par rapport aux progéniteurs sauvages. A l'échelle cellulaire, la diminution d'expression de CDKN1C favorise l'utilisation du mode symétrique prolifératif par les progéniteurs neuraux. Contrecarrer la réduction de la durée de phase G1 observée en condition de diminution d'expression de CDKN1C restaure de façon quasi-totale les phénotypes observés aux échelles tissulaires et cellulaires, suggérant que le rôle de CDKN1C sur le mode de division s'exerce à travers le contrôle de la durée du cycle cellulaire. Enfin, l'analyse de la dynamique d'expression du gène Tis21, dont l'expression débute spécifiquement dans les progéniteurs se divisant de manière asymétrique, dans les populations CDKN1C-diminuée VS contrôle semble indiquer un rôle direct de CDKN1C sur le mode de division.

Ainsi, l'ensemble de nos résultats mettent en lumière un rôle nouveau pour CDKN1C dans le cadre de la production neuronale, à travers la régulation de la transition d'un mode de division symétrique prolifératif vers asymétrique neurogénique.

Manuscript in preparation

Identification of p57 as a driver of neurogenic division during neurogenesis

Baptiste Mida^{1,2}, **Nathalie Lehman**^{1,2}, **Fanny Culpier**¹, **Rosette Goïame**¹, **Morgane Thomas-Chollier**¹, **Evelyne Fischer**^{3*}, **Xavier Morin**^{4*}

1 : Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure (IBENS), CNRS, Inserm, Ecole Normale Supérieure, PSL Research University, 75005 Paris, France.

2 : Sorbonne University, Collège Doctoral, 75005 Paris, France.

3 : Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure (IBENS), CNRS, Inserm, Ecole Normale Supérieure, PSL Research University, 75005 Paris, France. Electronic address: evelyne.fischer@ens.fr

4 : Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure (IBENS), CNRS, Inserm, Ecole Normale Supérieure, PSL Research University, 75005 Paris, France. Electronic address: xavier.morin@ens.fr

* : co-last authors ; co-corresponding authors

Keywords: neurogenesis, cell cycle, asymmetric cell division, Cdkn1c, single cell transcriptomics

ABSTRACT

During vertebrate neurogenesis, a progressive transition from symmetric proliferative to asymmetric neurogenic progenitor divisions is critical to balance growth and differentiation. We used bioinformatics analyses of scRNAseq data sets from mouse and chick embryonic neural tube to characterize the molecular mechanisms that govern this transition. Here we show that Cdkn1c, a key cell cycle regulator which is classically associated with neuronal cell cycle exit, plays an earlier role during neurogenesis by favoring a shift towards neurogenic mode of division. Cdkn1c expression progressively increases in neural progenitors, and its knock down leads to a reduction of neuron production, following a shortening of cell cycle mainly attributed to a reduction in G1 duration. Clonal analysis of pairs of sister cells indicate that reducing Cdkn1C expression in progenitors delays neurogenesis by favoring a symmetric proliferative mode of division. Combined CyclinD1 and Cdkn1c knockdowns restores the cell cycle defects and a wild-type distribution of modes of division, indicating that Cdkn1c acts via the regulation of cell cycle parameters. We propose a sequential role for Cdkn1c in neuron production, with its progressive expression in progenitors first promoting neurogenic division patterns via cell-cycle lengthening, before mediating cell cycle exit in daughter cells.

INTRODUCTION

The vertebrate central nervous system (CNS) is a complex assembly of thousands of cell types, which are organized in an exquisite manner to form functional neural circuits. This amazing diversity develops through the sequential production of neuronal and glial cells from a limited pool of neuroepithelial stem cells (also called neural progenitors) (Noctor et al., 2001; Taverna et al., 2014). Precise coordination between growth and differentiation during the neurogenic period is paramount to produce the correct amount of brain cells “at the right place at the right time” and ensure the formation of neural circuits. To achieve this complex organization, both the number of times progenitors enter a cell cycle and the proportion of progenitors that exit cell cycle at each round of division are crucial. A tight regulation of the proliferative capacity of the progenitor itself (the number of times it divides) and a molecular coordination between cell cycle exit and neuronal fate determination in daughter cells are required to simultaneously produce neurons early during neurogenesis, and maintain a pool of cycling progenitors that will generate later born neurons and eventually glial cells. To initiate neuron production, after an initial phase of amplification via proliferative symmetrical divisions during which a precursor produces two progenitors. the progenitor pool switches to a "neurogenic" mode of division in which asymmetric divisions allow the simultaneous maintenance of a progenitor and production of a committed progeny (Taverna et al., 2014).

Asymmetric cell division is a fundamental mechanism to generate cell diversity. In the strict definition of an asymmetric division, the asymmetry is intrinsic to the mother cell. The unequal segregation of cell fate determinants of various nature (proteins, mRNA, organelles) at the time of mitosis will trigger different programs in the two daughter cells, which in turn lead to the acquisition of differential cell fates (Morin and Bellaïche, 2011; Peyre and Morin, 2012; Sunchu and Cabernard, 2020) . The cell biology of asymmetric divisions (eg. the cellular means to effectively produce two daughters with different identities during an asymmetric mitosis) has been extensively studied during the last decades. Yet, in vertebrate CNS the cellular and molecular mechanisms that control whether a stem or progenitor cell will perform/enter a proliferative or neurogenic mode of division still remain largely elusive. Clonal analyses suggest that progenitors that have undergone a neurogenic division do not normally reenter a proliferative state, suggesting an irreversible switch in competence (Gao et al., 2014; Noctor

et al., 2004, 2001). In addition, several genes, including transcription factors and cell cycle regulators, appear to be differentially expressed between proliferative and neurogenic progenitors (Aprea et al., 2013; Arai et al., 2011; Haubensak et al., 2004a; Iacopetti et al., 1999; Murielle Saade et al., 2013). As an example, *Tis21/BTG2/PC3* transcription is initiated during the switch from proliferation to neurogenesis from the forebrain (Iacopetti et al., 1999) to the spinal cord, in both the mouse (Haubensak et al., 2004b) and chick model (Molina et al., 2022). These two observations suggest that the two types of progenitors correspond to two distinct and successive stages in the neural developmental program, and that changes in gene expression should underlie this progression. Nevertheless, in the developing CNS, the transcriptional regulation program and upstream controllers of the switch between modes of division remains largely unraveled.

In recent years, transcriptomic analyses have shifted from bulk analyses of cell populations (eg. differential analyses of two cell populations) to single cell analyses of a large number of cells, which allows to define more precisely sequential events or heterogeneity in cell types inside a population. Several groups have defined scRNAseq datasets from progenitors and neurons obtained from human and diverse vertebrate species (mouse, chick and zebrafish) (Delile et al., 2019a; Liao et al., 2023; Moreau et al., 2021; Rayon et al., 2021; Scott et al., 2021; Telley et al., 2016, 2019) (Andersen et al., 2023; Li et al., 2023). These studies have validated known pathways and identified new regulators of neurogenesis, and they also capture successive stages and cell types in a developmental sequence. However, so far, they have not revealed the mechanistic aspects of the choice between symmetric and asymmetric modes of divisions. One possible reason is that the subtle program driving this progression is masked by confounding factors (patterning, diversity of progenitors, cell cycle parameters) and does not emerge without customized pipelines tailored to answer this specific biological question.

Here we thought to identify markers/actors of the transition from proliferative to neurogenic modes of division through the analyses of single cell RNA sequencing (scRNAseq) data from embryonic chick and mouse (Delile et al., 2019) spinal neural tube. Among the candidates, we identified several genes involved in cell cycle regulation. Interestingly, a link between cell cycle dynamics and neurogenesis has long been recognized (Calegari and Huttner, 2003; Fujita, 1962; Kicheva et al., 2014; Lange et al., 2009; Lukaszewicz and Anderson, 2011a; Pilaz et al.,

2009; Smith and Schoenwolf, 1987; Takahashi et al., 1995). However, the question of whether cell cycle machinery components are involved in the transition from proliferative to neurogenic modes of division as a function or independently of their role as cycle regulators remains open. *Cdkn1c* (encoding p57)(Matsuoka et al., 1995), a cell cycle regulator known to drive cell cycle exit(Lee et al., 1995) in the vertebrate CNS (Gui et al., 2007; Mairet-Coello et al., 2012; Tury et al., 2011) emerged from our transcriptomic analysis of cycling progenitors. We therefore postulated that *Cdkn1c* may also be acting earlier in the process of neuron production, as an actor in the switch towards neurogenic modes of division. Using a loss of function strategy in the chick embryonic neural tube, we demonstrated that a decrease in *Cdkn1c* expression in cycling progenitors impedes neurogenesis mainly through cell cycle dynamics modulation. Loss of *Tis21* expression in progenitors and clonal analysis of the fate of their daughter cells upon *Cdkn1c* knock-down suggests that the level of *Cdkn1c* activity in progenitors is involved in the switch from proliferative to neurogenic modes of division. Taken together, our results suggest that a progressive increase in *Cdkn1c* transcription regulates two successive steps in the production of neurons: intermediate levels induce a switch from proliferative to a neurogenic mode of division, while a higher expression would favor cell cycle exit and differentiation.

RESULTS

1) Transcriptional signature of symmetric to asymmetric transition.

We used single-cell transcriptomics (scRNAseq) to address the molecular program underpinning the switch from proliferative to neurogenic divisions. We aimed to identify critical differences between proliferative and neurogenic populations and events that drive the progressive transition from the proliferative to the neurogenic state.

We therefore chose to analyze scRNAseq data from embryonic spinal neural tubes, which rely only on direct neurogenesis and in which progenitors are morphologically more homogeneous compared to cortical progenitors (Taverna et al., 2014). To produce our scRNAseq data, we dissected the cervical neural tube region of chick embryos over a length of five somites, to limit heterogeneity linked to rostro-caudal patterning. Embryos were collected at HH18 (E2.75), a stage at which proliferative and neurogenic modes of division are expected to be roughly equally represented (Bonnet et al., 2018; M. Saade et al., 2013). Poor annotation of many genes' 3'UTRs in the chick genome strongly limited the amount of read alignment. We therefore developed a strategy based on combined bulk long-read and scRNAseq datasets from matched tissue to reannotate this genome and obtain a high quality read mapping (Lehmann et al, manuscript in preparation). In parallel, we reanalyzed a public dataset from (Delile et al., 2019), in which the authors sequenced at single cell level transcripts from the cervical and thoracic regions of developing mouse neural tube at 1-day intervals from E9.5 to E13.5, therefore spanning the whole neurogenic transition.

We restricted our analyses from the original datasets to central nervous system-related cells (1900 cells in chick and 25574 cells in mouse embryonic neural tubes) (Figure 1A), excluding neural crest and mesoderm derivatives (see Methods). In graphical representations (eg. UMAP or spring, Figure1A), these cells distribute as a continuum, without clear delimited clusters. We then developed a scoring system based on the levels of expression of a list of progenitor and neuron-specific genes in each cell (see Methods). This scoring system reveals a continuous gradient between progenitor and neuron populations, with the highest scores most separated on graphical representations (Figure 1A). This indicates that the progression from progenitor

to neuron is a strong differentiating factor in these populations and that the notion of progenitor or neuron is one of the strongest "default" criteria in an unsupervised analysis. Their appearance as a continuum, and the highest expression of *Tis21* in the intermediate region (Figure 1A) suggested that the latter hosts neurogenic progenitors. Then, we benefited from the ability of the scRNAseq technique to identify an ordered sequence of events that drives the progression between the two modes of division and used Monocle2 to classify progenitor cells along a pseudotemporal axis (Figure 1B). We identified gene clusters with transcriptomic profiles along this axis (Figure 1B), and focused on genes with profiles similar to the one of *Tis21*, that is genes whose expression begins at low level in progenitors, increases in an intermediate region which could correspond to neurogenic progenitors, and fade off (or not) in neurons (Figure 1A). In addition, we limited our analysis to cycling progenitors, identified by a scoring system based on the genes expressed during the G2/M and S phases (Kowalczyk et al., 2015).

In parallel to the pseudotime analysis, we proceeded to a pseudo bulk differential screen. Potential candidate genes were selected on the basis of their differential expression between *Tis21*-positive and *Tis21*-negative progenitors. In the mouse dataset, which contained a higher number of cells, this analysis was performed separately in the 13 subpopulations of progenitors (Delile et al., 2019) (Supplementary Figure 1). The most relevant candidates in the transition of modes of division should share a common "signature" along the dorsoventral axis. We therefore ranked candidates based on the number of domains in which their differential expression was observed (Supplementary Figure 1).

By combining all these criteria, we end up with a short list of candidate genes common to mouse and chick.

2) Identification of p57 as a candidate gene.

Cdkn1c (Cyclin-dependent Kinase inhibitor 1c) encoding p57KIP2 protein (Matsuoka et al., 1995) was one of the strong candidates to emerge from our analyses. It is differentially expressed between *Tis21*-positive and -negative progenitors, in both mouse and chick datasets. In pseudotime analyses as well as graphical representations (Spring representation) of the datasets (Figure 1C), its expression profile in progenitors is similar to that of *Tis21*, being expressed at low levels in the region which we interpret as "intermediate progenitor". However,

unlike *Tis21*, whose expression is restricted to progenitors, *Cdkn1c* is then expressed at higher levels in cells possibly corresponding to immature neurons, before fading off in more mature neurons. In addition to this expression profile, the role of *Cdkn1c* in the regulation of the cell cycle, a cellular process known to be involved in the rate of neurogenesis, has caught our attention. *Cdkn1c*, mostly known as an inhibitor of Cyclin/CDK (Cyclin dependent kinase) complexes responsible for G1-phase progression and G1- to S-phase transition, drives neural cell cycle exit through negative regulation of cell proliferation (Gui et al., 2007; Mairet-Coello et al., 2012; Tury et al., 2011). Its expression in the spinal cord is upregulated upon overexpression of the proneural gene *NeuroG2* that leads cells to quit the cell cycle (Gui et al., 2007). In accordance, *Cdkn1c* overexpression in mouse cortical progenitors promotes cell cycle exit and neuronal differentiation both *in vitro* and *in vivo* (Gui et al., 2007; Tury et al., 2011). On the other hand, previous reports have shown that the *Cdkn1c* transcript is upregulated in *Tis21*-positive progenitors in the mouse embryonic cortex (Arai et al., 2011) and our results show a similar upregulation in chick and mouse *Tis21*-positive neurogenic progenitors in the spinal cord. We therefore wondered whether *Cdkn1c*, in addition to driving cell cycle exit in newborn neuron precursors, might play an earlier role in neurogenesis through a shift towards a neurogenic mode of division in cycling progenitors. The progressive elevation of *Cdkn1c* levels in progenitors could first favor a transition from proliferative to neurogenic division, before higher levels of *Cdkn1c* in daughter cells trigger them to leave the cell cycle and differentiate.

To test this hypothesis, we first validated the expression profile of *Cdkn1c* mRNA by *in situ* hybridization in chick embryonic neural tube (Figure 1D) in the course of neurogenesis. At E2, before neurogenesis really starts, the neural tube is mostly composed of progenitors with very few neurons. At this stage, we did not detect any expression of *Cdkn1c*. In contrast, *Cdkn1c* was detected at E3 and E4, when neurogenesis is well underway (see expression of *HuC/D* in the mantle zone in lower panels of Figure 1D). *Cdkn1c* was expressed at low levels in a salt and pepper fashion in the ventricular zone, where the cell bodies of neural progenitors reside, and markedly increased in a domain immediately adjacent to the VZ enriched in nascent neurons on their way to the mantle zone. In contrast, the transcript was completely excluded from the mantle zone, where *HuC/D* positive mature neurons accumulate. This observation is consistent with the dynamics of the *in-silico* profile described above. In the absence of functional antibodies recognizing p57 protein by immunohistochemistry in the chick embryo, we could

not ascertain that the protein is present in cycling progenitors. We note, however, that in the mouse spinal cord at E11.5 (which corresponds approximately to E4 in chick embryo), a small number of cells expressing p57 protein has been showed to co-express the progenitor marker Pax6 and to incorporate BrdU in the ventricular zone (Gui et al., 2007). Similarly, some mouse PCNA and Tbr2 positive cortical progenitors coexpressed p57 protein (Mairet-Coello et al., 2012). These observations are consistent with our hypothesis that Cdkn1c is expressed at the protein level in neurogenic progenitors.

3) Downregulation of Cdkn1c impairs neurogenesis

We wished to investigate specifically the role of Cdkn1c as a potential player in the transition of division modes, which we believe is linked to its onset of expression at a low level in progenitors. To limit its progressive increase of expression in this population, we chose to use a loss-of function strategy based on the short hairpin RNA (shRNA) approach. Six shRNA against Cdkn1c were designed (see Methods), and their efficiency was tested by in situ hybridization 24 hours after in ovo electroporation (Supplementary Figure 2). Two out of them induced a modest reduction of *Cdkn1c* mRNA expression. While this knock-down efficiency is likely to delay the onset/increase of Cdkn1c expression in the progenitor population, we reasoned that it may not be strong enough to prevent cells to ultimately reach a level of Cdkn1c sufficient to trigger cell cycle exit.

As a first approach, we investigated at a tissue level the effect of Cdkn1c knock-down on the production of neurons. We electroporated at E2.25 (HH13-14) each of the six constructs carrying both a shRNA against Cdkn1c and a GFP reporter. At that stage, the neurogenic transition is already well under way in the ventral region of the neural tube, but has barely started in the dorsal region. We therefore reasoned that our functional analyses were more likely to affect the neurogenic switch in the dorsal region, and restricted our analyses to this zone. Embryos were harvested 24 or 48 hours after electroporation and neuron and progenitor populations were evaluated on transverse vibratome sections of the thoracic region of the neural tube by immunostaining of specific markers.

Unambiguous identification of cycling progenitors and postmitotic neurons is notoriously difficult in the chick spinal cord, as there are no reliable reagents that label these populations:

markers of neurons, such as HuC/D or β -tubulin (Tuji) are not detected during the first hours of neural differentiation; on the other hand, markers of progenitors usually either do not label all the phases of the cell cycle (eg. pRb, which labels a phosphorylated form of the Retinoblastoma (Rb) protein, is only detected once cells have crossed the restriction point during G1), or persist transiently in newborn neurons (eg. Sox2). With these limitations in mind, we used antibodies against HuC/D to label neurons, and either Sox2 or pRb antibodies to identify the progenitor population.

Importantly, the two shRNAs that had a notable effect on *Cdkn1c* expression (shRNA1 and shRNA4) led to a significant decrease in the number of HuC/D-positive neurons 48 hae (see Figure 2B and Supplementary Figure 2B), shRNA5 and shRNA6 led to a modest decrease in the number of HuC/D-positive neurons, whereas the two other shRNAs were indistinguishable from the controls (Supplementary Figure 2B). Accordingly, the progenitor population, identified with either Sox2 or pRb, increased 48h after *Cdkn1c* knock-down (Figure 2B and Supplementary Figure 2B). A switch towards proliferation was already observed 24 hours after shRNA electroporation, as illustrated by a modest but significant increase in the pRb+ progenitor population in shRNA1 condition (Figure 2A). Most of the following experiments were carried out using shRNA1 (called shRNA *Cdkn1c* thereafter) which showed the most efficient downregulation in *Cdkn1c* expression and the most significant dysregulation in the ratio of progenitor versus neuron populations in our functional studies. Furthermore, we observed no difference in the number of Caspase3-positive cells in the shRNA conditions compared with the control condition, meaning that the reduction in neuronal production observed in the shRNA conditions against *Cdkn1c* was not due to cell death in this population (data not shown).

In addition to the reduced production of neurons observed at E4, we also observed a decrease of the “undefined” population of cells expressing neither pRb nor HuC/D upon *Cdkn1c* knock-down (see Figure2B). This may reflect two different but non-exclusive phenomena: a reduction in the number of immature neurons – in agreement with the observed decrease in more mature HuC/D-positive neuron production - and a decrease in progenitors that are not yet expressing pRb, possibly through a modulation of cell cycle parameters.

4) *Cdkn1c* down-regulation shortens cell cycle length and G1 duration.

The observed increase in proliferation in Cdkn1c downregulation condition is consistent with data obtained in the mouse cortex using a knock-out strategy (Mairet-Coello et al., 2012). In this model, the transient increase in proliferation in the cortex (between E14.5 and E16.5) was linked to a shorter progenitor cell cycle duration mainly due to a reduction of the G1 phase length.

First, we monitored the total cell cycle duration in reduced Cdkn1c conditions by cumulative incorporation of EdU. One day after electroporation at E2, EdU was administrated in ovo every 6h in order to cover the entire cell cycle and label the whole population of cycling cells. Embryos were harvested at successive time points after EdU administration and labelled for EdU incorporation and pRb expression (Figure 3A and B). When Cdkn1c expression was reduced, the proportion of EdU-positive progenitors reached a plateau faster and in a sharper manner compared to the control population of progenitors (Figure 3A). This indicates that the duration of the cell cycle is shorter upon Cdkn1c knock-down than in control progenitors. Next, we wondered if this decrease in duration of the cell cycle could be related to a decrease in length of G1, as previously described in mouse embryos.

To measure the duration of the G1 phase, we have chosen a direct approach that differs from the indirect method described by (Nowakowski et al., 1989). This classical approach is based on the idea of a homogeneous, asynchronous population, with constant cycle duration parameters over the timing of measurements. These prerequisites are not met in the developing spinal cord, whose progenitor populations are inhomogeneous and whose cycle parameters vary over the course of study.

Instead, we used cumulative EdU labeling in a synchronized cohort of dividing progenitors (labelled via Flash Tag injection) to monitor G1 duration (see methods). Embryos were harvested at successive time points after FT and EdU administration and labelled for EdU incorporation and pRB expression (Figure 3D). Except for the first time point, the proportion of pRb⁺ progenitors having completed their G1 phase was higher in Cdkn1c-downregulation condition, compared to control population (Figure 3E). Furthermore, virtually all progenitors electroporated with shRNA reached S-phase 10h30 after FT injection, compared to only 65% of control progenitors at that time. This observation indicates faster G1-exit in Cdkn1c-downreg-

ulation conditions, with an average G1 duration estimated around 5h30 in the Cdkn1c-downregulated condition compared to >7h in control. Taken together, these results demonstrated a shorter cell cycle in Cdkn1c-downregulated condition at the population scale, which is, at least partially, related to a decrease in G1 duration.

5) Cdkn1c downregulation favors symmetric proliferative mode of division

We next asked whether the observed shortening of the G1 phase could modify the proliferation/differentiation balance observed at the population level via a change in the transition between symmetric proliferative and asymmetric neurogenic modes of division. We hypothesized that Cdkn1c downregulation would perturb this transition, by favoring the proliferative mode of division.

We developed a clonal analysis strategy to analyze pairs of sister cells whose mothers were downregulated for Cdkn1c (Figure 4A). By determining the fates of the daughter cells, we can retrospectively deduce the mode of division used by the mother progenitor cell.

To do so, we injected FT one day after electroporation to label a cohort of mother cells (GFP positive cells) that perform their division synchronously. We harvested the embryos 6 hours later, a time at which all cycling cells in a cohort have reached the restriction point/late G1 stage and at which pRb can therefore be used as a reliable progenitor marker (see Methods and Supplementary Figure 3). Two-cell clones selected on the basis of GFP expression and FT incorporation were categorized as PP, PN, or NN based on pRb positivity (P) or not (N) (Figure 4B).

Downregulation of Cdkn1c led to an increase in the number of PP clones at the expense of PN and NN clones (Figure 4C), suggesting a shift towards a proliferative mode of division in the Cdkn1c-downregulated condition compared to control.

Despite a clear change in the proportion of identities within pairs of cells, we cannot formally exclude that, rather than a switch in the mode of division in the mother cell, the switch in identity of the progeny results from reduced Cdkn1c activity in the daughter cells after mitosis.

In this scenario, a committed neurogenic progenitor would ultimately give birth to two progenitors, due to the failure of the daughter that should have become a neuron to exit the cell cycle and differentiate.

The lack of reliable markers of progenitors and neurons immediately after mitosis prevents us from distinguish easily between these possibilities. We therefore decided to monitor the expression of the neurogenic progenitor marker Tis21. We made the hypothesis that if Cdkn1c is acting at the progenitor level, its downregulation might alter the mechanisms regulating Tis21 expression during the switch from proliferative to neurogenic divisions and lead to a reduction of the number of Tis21-positive progenitors.

To address this question, we set up an experimental condition to monitor the level of expression of Tis21. We used a Crispr/Cas9-based strategy to introduce a 5xMyc-P2A-CherryNLS tag at the C-terminus of the Tis21 coding sequence via somatic homologous recombination in ovo (Petit Vargas et al., manuscript in preparation) (Supplementary Figure 4). This allows us to monitor the endogenous expression of Tis21 and overcome the absence of dedicated antibodies in our chick model. We electroporated the homologous recombination vector in combination with a plasmid expressing both the Cas9 and a Tis21 guide RNA in shRNA and control conditions. Embryos were harvested 24hours later and labelled with an anti-mCherry antibody to identify Tis21 positive cells, in combination with an anti-Sox2 antibody to label progenitor cells. Downregulation of Cdkn1c led to a drop of approximately 20% in this ratio (Figure 4E) (19,5 +/- 7,1% Tis21+ cells in control conditions compared to 14.1 +/- 7.2% Tis21+ cells in Cdkn1c shRNA condition). We note that this percentage corresponds approximately to the observed drop in PN and NN pairs in shRNA condition compared to control condition in our previous experiment.

Altogether, these results suggest that Cdkn1c upregulation in progenitors is involved in the transition from proliferative to neurogenic modes of division.

6) Cdkn1c regulates the symmetric to asymmetric transition mostly through cell cycle regulation.

In addition to its role as a cell cycle regulator, Cdkn1c also performs other functions, as illustrated by its role as a transcription co-factor or pro- or anti-apoptotic factor in different contexts (Creff and Besson, 2020). We next assessed whether the mechanisms of action of Cdkn1c in the symmetric to asymmetric transition is dependent or independent of its role in the regulation of cell cycle dynamics.

To address this question, we functionally challenged another regulator of cell cycle, CyclinD1, which has been described as the major target of Cdkn1c in the regulation of the duration of cell cycle in mouse embryonic neural tube (Gui et al., 2007). Cyclin D1 promotes proliferation in G1 by keeping progenitors cycling, and has therefore the complete opposite effects of Cdkn1c on G1 phase duration and cell cycle exit. Its loss of function by shRNA favors neurogenesis in mouse cortex, possibly through a lengthening of G1 phase (Lange et al., 2009) and reduces the number of cycling cells in the chick embryonic neural tube (Lacomme et al., 2012; Lukaszewicz and Anderson, 2011). We therefore hypothesized that a concomitant downregulation of CyclinD1 should rescue, at least partially, the phenotype observed with a Cdkn1c downregulation alone, if this phenotype is cell cycle-dependent.

Electroporation of a published shRNA targeting chick Cyclin D1 (Lukaszewicz and Anderson, 2011) led to its downregulation 24 hours after electroporation (Supplementary Figure 5). Then, we evaluated the number of cycling progenitors in a CyclinD1 knock-down conditions. We observed a reduced proportion of EdU positive cells in the shCyclinD1 electroporated progenitors, compared to the control condition (Figure 5A-B). Importantly, Cdkn1c shRNA had the opposite effect, and the double Cdkn1c/CyclinD1 knock-down was undistinguishable from control. This restoration of cell cycle parameters to control levels in the double knock-down embryos is consistent with Cdkn1c and CyclinD1 having opposing/opposite activities.

While CyclinD1 downregulation appeared to modulate cell cycle parameters, it did not affect the ratio of proliferating progenitors and neuron production 48hae. Strikingly, however, cyclinD1 downregulation fully rescued the Cdkn1c knockdown phenotype and restored the rate of neurogenesis to that of a control situation (Figure 5C) two days after electroporation. Fate

analyses in pairs of sister cells confirmed this observation: while CcnD1 Knock-Down alone did not modify the distribution of PP, PN and NN pairs compared to the control situation, the anti-neurogenic effect of Cdkn1c knock-down was completely recovered in double knock-down experiments (Figure 5D). These results demonstrated that reducing CyclinD1 expression counteracts efficiently the pro-proliferative phenotype observed in Cdkn1c downregulation, both at a population scale and at the single progenitor level, suggesting that most of this phenotype was regulated through an effect on the cell cycle dynamics.

Our results contribute to elucidate the cellular mechanisms of a new role of Cdkn1c in neuron production and therefore in the regulation of the proliferation versus differentiation balance during neurogenesis.

DISCUSSION

In this report, we propose a reinterpretation of the role for Cdkn1c, whose functions during embryonic neurogenesis have so far been mainly attributed to a “binary” regulation of cell cycle exit or maintenance. We validated Cdkn1c as an intrinsic regulator of the symmetric to asymmetric transition via its low-level expression in cycling mother progenitors, which promotes asymmetric daughter cell fate through a change in division pattern. Furthermore, we provide experimental arguments that this transition from a proliferative to a neurogenic progenitor status is linked to a modulation of cell cycle length which, in turn, may interact with the transcriptional program of the progenitor.

While several studies suggest that the transition between modes of division is regulated at the transcriptional level (Aprea et al., 2013; Arai et al., 2011; Pinto et al., 2008), the core players of this transition have not yet been identified. We analyzed scRNAseq data from embryonic spinal cord at the time of the neurogenic transitions. We restricted our analysis to cycling progenitors and ordered them along the sequence of proliferative to neurogenic modes of division using a pseudotime reconstitution. Similarities with the transcriptomic profile of the neurogenic marker Tis21 led to the identification of candidate markers or actors in the transition in modes of division. We confirm previous results of comparative transcriptomic screens designed to identify differentially expressed genes between Tis-positive and Tis-negative progenitors in mouse cortex (Arai et al., 2011; Pinto et al., 2008), including a set of cell cycle regulators. While reinforcing the key role of this cellular process in neuron production during development, these observations also pave the way for a role for these factors at multiple stages of this process.

To become a neuron, a neural cell must definitively exit the cell cycle and differentiate to acquire its final identity/fate. Cell cycle regulators are key players in this process and close ties between them and regulators of cell fate (proneural genes and differentiation factors) have been described both *in vitro* and *in vivo*. As an example, exposure to differentiation cues is accompanied by a decrease in cyclin D and an increase in CDK inhibitors, forcing differentiation and terminal exit from cell cycle (Blomen and Boonstra, 2007; Hörster et al., 2017). However, numerous studies have also demonstrated a lengthening of the cell cycle in progenitors during neurogenesis both in cortex and spinal cord, in a large number of species (macaque, mouse,

rat, chick) (Calegari and Huttner, 2003; Fujita 1962; Kicheva et al., 2014; Lange et al., 2009; Lukaszewicz and Anderson, 2011; Pilaz et al., 2009; Smith and Schoenwolf, 1987; Takahashi et al., 1995). Among the different parameters of the cycle, a change in the duration of G1 phase in the mother cell, in absolute or relative terms in relation to the duration of the cycle, is concomitant with a modulation of the capacity of the daughter cells to self-renew or differentiate (Calegari and Huttner, 2003; Lange et al., 2009; Pilaz et al., 2009). Consistent with this idea, Tis21 positive progenitors display a longer G1 phase (absolute or relative to the duration of the cell cycle) compared to Tis21 negative progenitors in mouse cortical progenitors (Calegari et al., 2005; Calegari and Huttner, 2003; Lange et al., 2009), and a lengthening of the G1 phase is observed during the transition from aRG to fate restricted progenitors (BiP) (Arai et al., 2011). Finally, a lengthening of the G1 phase in two consecutive cycles has been described in the chick spinal cord, the daughter progenitors having a longer G1 than their mother (Molina et al., 2022). Overall, this relative G1 lengthening parallels the patterned dynamics of neuron production along the anterior-posterior axis (cortex VS medulla), and the dorso-ventral axis in spinal cord.

These observations are consistent with the “cell cycle length hypothesis” that proposes that an increase in G1 duration would favor the accumulation of pro-differentiating factors and promote a switch towards neurogenesis, while a short G1 may not, promoting self-renewal (Calegari and Huttner, 2003). Hence, cell cycle regulators would be involved in a more complex scenario than a binary decision to quit or remain in the cycle. Accordingly, gain and loss of function experiments specifically targeting G1 regulators have shown that reducing the length of G1 phase leads to an increase in the progenitor pool and inhibition of neuronal differentiation, while lengthening G1 phase promotes the opposite effect (Calegari and Huttner, 2003; Lange et al., 2009; Pilaz et al., 2009). In the chick spinal cord, targeting the activity of *cdc25B*, which regulates the duration of the G2 phase, also modulates the mode of division of progenitors. An intriguing hypothesis is that this operates over two cell cycles: G2 shortening in “grandmother” cells might affect the G1 length and mode of division of “mother” cells, and finally the fate of the daughter cells (Bonnet et al., 2018; Molina et al., 2022).

Functional explorations of the role of G1 length on the mode of division have mostly focused on Cyclin/CDK complexes. Intriguingly, both gain and loss of function phenotypes of *Cdkn1c*

have been essentially attributed to a post mitotic role in daughter cells, primarily through its function in regulating cell cycle exit, despite its effect on G1 duration (Gui et al., 2007; Mairet-Coello et al., 2012; Tury et al., 2011): overexpression of Cdkn1c experiments showed an increase in neuron production; conversely, its loss of function phenotypes in the mouse embryonic spinal cord have been described as cell cycle re-entry of nascent neurons (Gui et al., 2007). However, our analysis indicates a differential expression between proliferative and neurogenic progenitors, raising the possibility that it might already play a role in the switch towards neurogenic mode of division. Our study proposes to reinterpret the role of p57 in the mechanisms of the proliferative division to neurogenic transition. Using cellular resolution analyses of pairs of cells by clonal analyses, we were able to infer the fate of daughter cells to the division mode of the progenitor and we showed that reducing its expression favors a proliferative mode of division and eventually impedes neurogenesis. In addition, we have clarified the cellular mechanisms of Cdkn1c in this phenotype and proposed that Cdkn1c also regulates the switch to a neurogenic division mode mainly through an elongation of the G1 phase of the cell cycle. We also directly measured Cdkn1c knock-down effects on the expression of the widely recognized marker of asymmetric progenitors, Tis21. Tis21 has been used in descriptive studies attempting to characterize morphological differences between symmetric (Tis21-negative) and asymmetric (Tis21+) progenitors (Fish et al., 2006; Haubensak et al., 2004b; Kosodo et al., 2011; Marthiens and French-Constant, 2009); it was also used as a reporter of this switch in functional studies addressing upstream signals in the chick spinal cord (Le Dréau et al., 2014; M. Saade et al., 2013), and in transcriptome and epigenome studies during mouse corticogenesis. Taking advantage of the peculiar expression profile of Tis21, we used a somatic recombination strategy set up in the laboratory to monitor the endogenous expression of this marker. We have shown that in Cdkn1c knock-down condition the number of Tis21 progenitors is decreased. Altogether, these two approaches suggest that Cdkn1c knock-down favors proliferative divisions and impairs neurogenic divisions, reinforcing our in-silico results in favor of a role for Cdkn1c before mitosis in the switch of modes of division.

Taken together, our study adds a new player in the complex panorama linking cycle dynamics and progenitor cell behavior. It reinforces the view that a faster or slower passage through the G1 of a progenitor could be instructive for its symmetric or asymmetric mitotic behavior, and therefore dictate the fate of its daughters.

Whereas our rescue experiments demonstrated that the role of Cdkn1c in regulating the mode of division is mostly acting through cell cycle regulation, how this is translated in a symmetric or asymmetric mode of division remains to be elucidated. In this context, it will be interesting to explore whether and how Cdkn1c controls the asymmetric distribution of fate determinants that have been identified over the last years (Peyre and Morin, 2012; Saade et al., 2017; Tozer et al., 2017; Tsunekawa et al., 2012).

Materials & Methods

A Transcriptomic analysis

Production of scRNA-seq data

Sample preparation of chick cervical progenitors for single-cell RNA sequencing.

Three chick embryos at 66 hours of embryonic development were collected and dissected in ice-cold 1X PBS, transferred into ice-cold L15 medium for further dissection to retain only the cervical spinal region (spanning 5 somites starting from somite n°8). To generate single-cell suspension solution dissection products were then transferred in 250µL of 37°C pre-heated papain/L15 solution (Worthington, REF: LS003126 – Stock solution = 41,6mg/mL in 100mL; Working solution = 50µL of stock solution diluted in 1,5mL of L15 medium) and incubated at 37°C for 15 minutes. Papain was then replaced with ice-cold L15 medium, and clusters of cells were disaggregated through gentle up-and-down pipetting. Cells were then centrifuged at 300g for 2 minutes at 4°C. Supernatant was removed, and 500µL of new ice-cold L15 medium was added. Another round of up-and-down pipetting was performed, and cells were then applied on 30µm filters to eliminate clumps of poorly-dissociated cells. Filtered cells were then centrifuged for 4 minutes at 300g, and supernatant was replaced with 1000µL of 1X PBS containing 0.04% BSA. Cells were then centrifuged for 4 minutes at 300g, 900µL of supernatant was removed and cells were then re-suspended in remaining 100µL of solution. Quality control was assayed by counting live vs dead cells using Trypan blue. Samples with >90% viability were then used for sequencing. After viability assessment, cell concentration of samples was adjusted to 1000cells/µL.

Single cell transcriptomes generation, cDNA synthesis and library construction. Single-cell suspensions of 4000 cells were loaded into the 10x Genomics Single Cell 3' Chip, and cDNA synthesis and library construction were performed as per the manufacturer's protocol (10x Genomics; PN-120233).

Nucleic acid sequencing protocol. Libraries for the samples were multiplexed so that the number of reads matched one lane per sample, and sequenced on an Illumina HiSeq 4000 using 100 bp paired-end runs.

[Mouse single-cell transcriptomic dataset.](#) (Delile et al., 2019) produced a single-cell atlas dataset containing 41 025 cells gathered on 12 cervicothoracic samples (7 females – 5 males) from mouse embryos at 5 successive time-points (E9.5 / E10.5 / E11.5 / E12.5 / E13.5). 2 replicates were produced for the E9.5 / E10.5 / E11.5 timepoints, and 3 replicates for the E12.5 and E13.5 timepoints. The unfiltered count matrix provided by the authors can be downloaded from:

<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/files/E-MTAB-7320/E-MTAB-7320.processed.1.zip>.

[Pre-processing of scRNA-seq data](#)

Demultiplexing, barcode processing and UMI counting, mapping, feature assignment and transcripts quantification were performed using Eoulsan (Lehmann et al., 2021).

[Chick single-cell transcriptomes.](#) Single-cell RNA-seq and Illumina sequencing were performed at the Ecole normale supérieure GenomiqueENS core facility (Paris, France). Cellular suspension (5,000 cells) was loaded on a 10x Chromium instrument, using the manufacturer's instructions (Single Cell 3' v3 protocol, 10x Genomics). cDNA synthesis and library construction were performed as per the manufacturer's protocol (10x Genomics). The library was sequenced on a NextSeq 500 device (Illumina) using paired-end (PE) 26/57, generating 533 million reads.

[Pre-processing of chick scRNA-seq data.](#) Primary analyses (demultiplexing, UMI processing, mapping, feature assignment and gene quantification) were performed with Eoulsan 2 (Lehmann et al., 2021). We used as annotation file the NCBI chick reference genome GCF_000002315.5_GRCg6a_genomic.fna and a corrected GTF annotation ref_GRCg6a_top_level.corrected.gtf. In this corrected annotation, the mitochondrial genes were manually tagged as “exons” in the GTF file (in the original GTF file, they were tagged as “CDS”, thus preventing them to be included in the downstream analyses).

[Mouse single-cell transcriptomics dataset.](#) A public single-cell atlas dataset containing 41 025 cells gathered on 12 cervicothoracic samples (7 females – 5 males) from mouse embryos at 5 successive time-points (E9.5 / E10.5 / E11.5 / E12.5 / E13.5) was used. Two replicates were available for the E9.5 / E10.5 / E11.5 timepoints, and 3 replicates for the E12.5 and

E13.5 timepoints ([Delile et al., 2019](#)). The unfiltered count matrix provided by the authors was downloaded from ArrayExpress accession number E-MTAB-7320.

Biological analyses of scRNA-seq data

Data cleaning and preparation. Generated single-cell RNA-seq data of chick cervical spinal progenitors and mouse public single-cell datasets were submitted to cleaning steps before proceeding with analyses. Filtering was performed to remove unwanted cells: cells presenting UMI counts below the 0.5th percentile and above the 99.9th percentile, more than 8% (mouse) and 20% (chick) UMI counts associated with mitochondrial genes and more than 0.3% UMI counts associated with hemoglobin genes (same value for both cases). This led us to filtered mouse datasets (39 433 cells) and chick datasets (2479 cells) . With regard to gene filtering, we kept genes that are expressed at least once in at least 3 cells. All filtering analyses were performed using Seurat v3.

Normalization and dimension reduction. Data were log-normalized with Seurat v3 function “NormalizeData”, and confounding factors such as cell cycle phases and gender were then regressed out using the function “Scale-Data” (Lehmann, 2021). To preserve differences between proliferating and non-proliferating cells, we separated cells in two groups: “cycling” (G2/M and S) and “non-cycling” (G1/G0). Dimension reduction was then performed on scaled data, and 2D representation of the dataset (PCA & UMAP plots) were obtained. After consulting the percentage of variance explained by each dimension, we chose to keep the first 30 components in both cases.

Cell classification. First, using the expression of known cell population markers, we removed all cells that were neither progenitors or neurons such as cells of the mesoderm (expressing *Foxc1/2*, *Twist1/2*, *Meox1/2*, *Myog10*) and neural crest (expressing *Sox10*) as performed in ([Delile et al., 2019](#)). At this stage, 25 574 mouse cells and 1433 chick cells remained. To extract specifically SYM and ASYM-dividing progenitor populations, we first filtered out neurons by setting-up a self-defined progenitor (P) and neuron (N) signature scores, using the Seurat function “AddModule-Score”. Scores were based on several known and newly-identified markers (originating from differential analysis performed in the first dataset exploration). Detailed list of used marker genes is provided below.

(Mouse Progenitor genes = Sox2, Notch1, Rrm2, Hmgb2, Cenpa, Ube2c, Hes5, Fabp7; Mouse Neuron genes = Tubb3, Stmn2, Nova1, Snrpn, Pcsk1n, Meg3, Rtn1, Stmn3, Mllt11, Mapt, Ina; Chick Progenitor genes = Sox2, Notch1, Rrm2, Hmgb2, Cenpa, Ube2c, Hes5; Chick Neuron genes = Tubb3, Stmn2, Stmn3, Nova1, Rtn1, Mapt)

Extraction of the cell population of interest (mouse data only). Due to the high diversity of cells in the mouse dataset, we proceed with the following steps to extract neurogenic progenitors. Regarding the chick dataset, we didn't proceed with this extraction step, since the number of cells was significantly lower and more homogeneous.

We applied a k-mean clustering (with $k = 5$) and then selected the 3 clusters with the highest P and lowest N scores to extract the populations of interest. We ultimately kept 7441 mouse cells.

Clustering and differential expression. In order to identify sub-populations of cells within the population of interest, we then performed graph-based clustering using the Louvain algorithm as implemented in Seurat v3. Regarding the mouse data, clustering, coupled with differential expression results (obtained using a negative binomial test) were not sufficient to bring out the two SYM and ASYM progenitor populations, as cells were still mainly differentiated by the patterning factors of the dorso-ventral axis. In order to find other variation sources, we designed a “denoising” strategy based on two approaches, as described below.

Pseudotime analysis (mouse data only). The first approach consists in a pseudotime analysis performed on the previously separated progenitor and neuron populations. In order to identify genes whose expression varies over time, we relied on the “DifferentialGeneTest” function of the trajectory-inference dedicated tool Monocle 2, which led to hierarchical clustering of genes along a pseudotime axis. Partitioning around medoids algorithm (PAM) was then applied to cluster cells based on similar gene expression profiles along the pseudotime. We then focused on the Btg2/Tis21-containing cluster to look for differentially-expressed genes.

Signature extraction through isolation of dorso-ventral domains (mouse data only).

The second approach consists in an analysis based on the discretized expression of Btg2/Tis21. We first isolated the 13 subpopulations of progenitors along the dorso-ventral axis of the embryonic neural tube, as performed in (Delile et al., 2019). Then, for each of these subpopulations, cells were classified in 2 groups: cells expressing Btg2 (group1) and cells negative for Btg2 expression (group 0). We next performed differential expression analysis using a negative binomial test between each of these groups. Finally, we gathered all the subpopulations analyses and looked for genes that are most shared between the corresponding groups. Finally, we compared the genes identified through the two different strategies.

Data visualization

Data was visualized in the SPRING server.

SPRING Server: https://kleintools.hms.harvard.edu/tools/springViewer_1_6_dev.html?client_datasets/NeuralProgenitors2/NeuralProgenitor

B Experimental Model

Fertilized eggs of JA57 chicken were purchased from EARL Morizeau (8 rue du Moulin, 28190 Dangers, France). Eggs were incubated at 38°C in a Sanyo MIR-253 incubator for the appropriate amount of time.

Cryostat sections

For cryostat sections, chick embryos were collected at E2.25 (HH st13-14), E3 (HH st18) and E4 (HH st22) (Hamburger and Hamilton, 1992) in ice-cold 1X PBS, then fixed over-night in 4% formaldehyde/1X PBS at 4°C. The following day, embryos were washed 3 times for 5 minutes in 1X PBS at room temperature (RT). Embryos were equilibrated at 4°C in 1X PBS/15% sucrose (until samples sink to the bottom of the tube), then equilibrated at 42°C in 1X PBS/15% sucrose/7,5% gelatin solution, embedded in plastic dishes containing 1mL of 1X PBS/15% sucrose/7,5% gelatin solution and flash frozen in 100% Ethanol at -50°C on dry ice, before storage at -80°C. Prior to cryostat sectioning, samples were equilibrated for 1 hour at -25°C. 20µM

cryostat sections were obtained using a Leica CM3050 S Cryostat and manually mounted on SuperFrost Plus microscope slides, before storage at -20°C.

In Situ Hybridization

For in Situ Hybridization, gelatin-mounted cryosections were first equilibrated at room temperature for 15 minutes, and de-gelatinized by washing slides in 37°C 1X PBS 3 times for 5 minutes. All following steps were carried at RT unless mentioned otherwise. Slides were bathed for 20 minutes in RIPA buffer (150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Na deoxycholate, 0.1% SDS, 1mM EDTA, 50mM Tris pH 8.0), postfixed in 4% paraformaldehyde/1X PBS for 10 minutes, and washed with 1X PBS 3 times for 5 minutes. Slides were then bathed in Triethanolamine solution (100mM triethanolamine, acetic acid 0.25% pH 8.0) for 15 minutes and washed with 1X PBS 3 times for 5 minutes. Subsequently, slides were pre-hybridized during 1 hour in 69°C pre-heated hybridization solution (50% formamide, 5X SSC, 5X Denhardt's, 500 µg/mL herring sperm DNA, 250 µg/mL yeast RNA) and hybridized overnight at 69°C with the same hybridization solution in presence of according heat-denatured (95°C for 5 minutes) DIG-labelled RNA probes. The following day, slides were transferred in post-hybridization solution (50% formamide; 2X SSC; 0.1% Tween20) at 69°C for 1 hour, then washed in 69°C pre-heated 2X SSC solution for 30 minutes, and finally in 0.2X SSC solution at RT for 5 minutes. Slides were washed with buffer 1 (100mM maleic acid, pH 7.5, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20) during 20 minutes at RT, blocked for 30 minutes in buffer 2 (buffer 1/10% FCS), followed by overnight incubation at 4°C with 250µL of the anti-DIG antibody (Merck #11093274910 - diluted 1:2000) and other necessary primary antibodies (if immunostaining needed) in buffer 2. Before overnight incubation, slides were covered with a coverslip to limit loss of solution. The following day, coverslips were gently removed and slides were washed with buffer 1, 3 times for 5 minutes, and equilibrated for 30 minutes by bathing in buffer 3 (100mM Tris pH 9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂). In Situ Hybridization signal was visualized through a colour reaction by bathing slides in BM-Purple (Merck # 11442074001). The colour reaction was allowed to develop in the dark at room temperature during the appropriate amount of time and was stopped by bathing slides in 4% paraformaldehyde/1X PBS for 10 minutes. Sections were finally washed with 1X PBS 3 times for 5 minutes before either mounting with coverslip using Aquatex or the subsequent immunostaining protocol if required (see section Vibratome / Cryostat sections and Immunostaining).

All of RNA-probes were synthesized using a DIG RNA labelling kit (Merck #11277073910) following manufacturer's protocol. Antisense probes were prepared from the following linearized plasmids: cHes5.1 (previously described in (Baek et al., 2018a)), cCDKN1C (a gift from Matthew Towers, described in Pickering et al., 2019), and cCCND1 5' (a gift from Fabienne Pituello, previously described in (Lobjois et al., 2004)).

In ovo electroporation and plasmid

Electroporations were performed at HH13-14 by applying 5 pulses of 25V for 50ms, with 100ms in between pulses. Electroporations were performed using a square wave electroporator (Nepa Gene, CUY21SC) and a pair of 5 mm Gold plated electrodes (BTX Genetrode model 512) separated by a 4 mm interval.

shRNA sequences against the chick version of CDKN1C (cCDKN1C) were determined using si-Direct: <http://sidirect2.rnai.jp/>. Target sequences for cCDKN1C are as follow:

cCDKN1C shRNA 1: 5' cggcaccgtgcccgcgttcta 3';

cCDKN1C shRNA 2: 5' cacgacccgcatcacagattt 3';

cCDKN1C shRNA 3: 5' agcgccgtctgcaggagctta 3';

cCDKN1C shRNA 4: 5' tgagccgggagaaccgcgccg 3';

cCDKN1C shRNA 5: 5'cgacccgcatcacagatttct 3'

cCDKN1C shRNA 6: 5' ctcaataaacaacaaacaaaaa 3'

Target sequences were cloned into the first hairpin of the pTol2-H2B-EGFP-miRNA plasmid (Peyre et al., 2011) using the following method (Das et al., 2006). 100ng of both General oligonucleotides (First hairpin primer 5': 5'-ggcggggctagctggagaagatgccttccggagaggtgctgctgagcg-3' and First hairpin primer 3': 5'-gggtggacgcgtaagaggggaagaaagcttctaacccgctattcaccaccattaggca-3') were used together with 10ng of both target-specific oligonucleotides (Target forward sequence: 5'-gagaggtgctgctgagcgTARGETSEQUENCEtagtgaagccacagatgta-3' and Target reverse sequence: 5'-attcaccaccattaggcaTARGETSEQUENCEtacatctgtggcttact-3') in a one-step PCR reaction to generate a product containing the miR30 like hairpin and the chick miRNA flanking sequences. Obtained PCR products and pTol2-H2B-EGFP plasmid were submitted to NheI/MluI double enzymatic digestion, and purified digested products were then ligated to create CDKN1C shRNA plasmids.

Other plasmids used in this study are: cCCND1 siRNA plasmid: described in (Lukaszewicz and Anderson, 2011), kindly gifted by Fabienne Pituello. A plasmid coding for a combination of a shRNA against Luciferase and a GFP reporter was used as a control (described in (Peyre et al., 2011)). An empty pCAGGS plasmid, used to equilibrate DNA concentrations when needed. All plasmids were used at 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ except when otherwise mentioned.

Somatic knock-in of a 5xMyc-P2A-mCherryNLS reporter at the C-terminus of the Tis21 locus was achieved via CRISPR-Cas9-based homologous recombination. The targeting vector contains 1kb 5' and 3' arms of homology flanking the stop codon of Tis21 coding sequence. Details of the construct and cloning steps are available upon request. gRNA target sequences were cloned via duplex oligo cloning in the BbsI sequences of pX330 ((Cong et al., 2013); Addgene #42230), designed to express a chimeric gRNA under control of the human U6 promoter and a humanized spCas9 protein under the CBh promoter. The Tis21 gRNA targets the cttggcagtg-taaggacaag sequence located a dozen bases downstream of the Tis21 stop codon in the anti-sense direction. A gRNA that does not target any sequence in the chick genome was used as a control (GCACTGCTACGATCTACACC; (Gandhi et al., 2017)); the homologous recombination and gRNA vectors were each used at 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. An electroporation reporter (pCAGGS-H2B-EGFP) was added to the electroporation mix at 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Supplementary Figure 5).

Vibratome sections

For vibratome sections, chick embryos were collected at desired stages and roughly dissected (to remove membranes) in ice-cold 1X PBS, fixed for 1 hour in ice-cold 4% formaldehyde/1X PBS, and rinsed 3 times for 5 minutes in 1X PBS at room temperature (RT). Chick embryos were then finely dissected in 1X PBS and subsequently embedded in 4% agarose (4g of agarose in 100mL of water, boiled in microwave and cooled at 50°C) until agarose became solid. Thereafter, 100 μm vibratome sections were realised using a ThermoScientific HM 650 V Microtome and collected in 6-well plates filled with ice-cold 1X PBS.

Immunostaining

Sections were permeabilized in 1X PBS-0,3% Triton for 30 minutes at RT, and then incubated with the primary antibodies diluted in the blocking solution (1X PBS-0,1% Triton / 10% Foetal Calf Serum (FCS)) at 4°C over-night with gentle agitation. The following day, sections were washed 3 times for 5 minutes in 1X PBS at RT, incubated 4 hours in the dark and at RT with

the appropriate secondary antibodies (and DAPI if needed) diluted in 1X PBS-0,1% Triton, washed again 3 times for 5 minutes at RT with 1X PBS and mounted with Vectashield (containing or not DAPI, depending on experiment – Vector Laboratories H-1000-10 & H-1200-10).

All immunostainings on slide-mounted cryosections were performed during and after the end of in situ hybridization revelation protocol. Slides were incubated with primary antibodies during corresponding previously described step (see Cryostat sections and In Situ Hybridization). After ISH signal revelation, slides were incubated 4 hours in the dark and at RT with 250 μ L of appropriate secondary antibodies (and DAPI, if needed) diluted in 1X PBS-0,1% Triton, washed again 3 times for 5 minutes at RT with 1X PBS and mounted with Aquatex.

Primary antibodies used are: chick anti-GFP (GFP-1020 – 1:2000) from Aves Labs; goat anti-Sox2 (clone Y-17 – 1:1000) from Santa Cruz; rabbit anti-pRb (Ser807/811 – 1:1000) from Cell Signaling; mouse anti c-myc tag (Clone 9E10 - 1:100) from Sigma-Aldrich; anti DsRed (Polyclonal - 1: 400) from Takara Bio; mouse anti-HuC/D (clone 16A11 – 1:50) from Life Technologies. Secondary antibodies coupled to Alexa Fluor 488, Cy3 or Alexa Fluor 649 were obtained from Jackson laboratories and used at a 1:500 dilutions.

EdU labelling

Proliferating progenitors in the neural tube were labelled with 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) via *in ovo* incorporation. Before EdU injection, membranes surrounding the embryos were slightly opened using forceps. For 1h pulse experiments, 100 μ L of a 500 μ M solution of EdU diluted in 1X PBS was deposited in the previously opened space. For cumulative EdU labelling, embryos were incubated with EdU for the appropriate amount of time before collection. In this context, 100 μ L of a 500 μ M solution of EdU diluted in 1X PBS was deposited every 6 hours in the previously opened space after initial injection. After collection, embryos were subsequently processed following the vibratome sections protocol. Revelation of EdU incorporated in progenitors was carried out on vibratome sections after the permeabilization step, using the Click-iT EdU imaging kit according to manufacturer's protocol (Invitrogen).

FlashTag preparation and injection

CellTrace Far Red (Life Technologies, #C34564 - (Baek et al., 2018a)) 1mM stock solution was prepared by adding 20 μ L of DMSO to a CellTrace Far red dye stock vial. A working solution of 100 μ M was subsequently prepared by diluting 1 μ L of stock solution in 9 μ L of 37°C pre-heated 1X PBS, and injected directly into E3 chick neural tubes. The eggs were resealed with parafilm and embryos were incubated at 38 °C for the appropriate time until dissection.

Image Acquisition

Transversal sections of chick embryo neural tubes after ISH and/or immunofluorescence were obtained either on a confocal microscope (model SP5; Leica) using 40 \times and 63 \times (Plan Neofluar NA 1.3 oil immersion) objectives and Leica LAS software, or on an inverted microscope (Nikon TiEclipse) equipped with a Yokogawa CSU-WI spinning disk confocal head, a Borealis system (Andor Technologies) and an sCMOS Camera (Orca Flash4LT, Hamamatsu) using a 40 \times objective (CFI Plan APO LBDA, NA 0.45, Nikon) or a 100 \times oil immersion objective (APO VC, NA 1.4, Nikon) and micromanager software (Edelstein et al, 2010). For image processing, data analysis and quantifications, we used the Fiji software to adjust brightness and contrast

Image Quantifications

In the ventral motor neuron domain of the neural tube, progenitors differentiate earlier than in any other region of the NT. Thus, to reason on a more homogeneous progenitor population, we restricted all our analysis to the dorsal two thirds of the NT. All cell counting in this study were performed manually.

Status of proliferation/differentiation balance at tissue level.

HH13-14 chick embryos were electroporated with specific shRNAs (described below for each figure) and status of the proliferation/differentiation balance was analysed one or two days after electroporation.

For conditions analysed using a combination of GFP, phospho-Rb and HuCD primary antibodies, three ratios were determined. Progenitor ratio was obtained by dividing the number of shRNA transfected (GFP-positive) and pRb-positive/HuC/D-negative cells by the total number of transfected cells (GFP-positive). Neuron ratio was obtained by counting the number of

shRNA transfected (GFP) HuC/D-positive cells over the total number of transfected cells (GFP positive); and Undetermined ratio was obtained by dividing the number of shRNA transfected (GFP positive) pRb & HuC/D double negative cells by the total number of transfected cells (GFP positive).

For conditions using a combination of GFP, Sox2 and HuC/D primary antibodies, two ratios were determined. Progenitor ratio was obtained by dividing the number of shRNA transfected (GFP-positive) and Sox2-positive/HuCD negative cells by the total number of transfected cells (GFP-positive). Neuron ratio was obtained by counting the number of shRNA transfected (GFP) HuCD-positive cells over the total number of transfected cells (GFP positive). Sox2 and HuCD detection is almost perfectly complementary in the neural tube at E4, and only rare double Sox2/HuCD cells are found. As these double-positive cells correspond to HuCD positive neurons that have not yet entirely lost the Sox2 signal, they are included in the HuCD population, and not counted in the Sox2 positive population.

Figure 1: 24h post-electroporation: A minimum of 320 cells, collected from 3 to 4 embryos were analysed for each timepoint, from 1 to 2 different experiments. 48h post-electroporation: A minimum of 1619 cells, collected from 3 to 10 embryos were analysed for each timepoint, from 1 to 4 different experiments.

Figure 2: Phospho-Rb conditions: A minimum of 253 cells, collected from 3 to 4 embryos were analysed for each timepoint, from 1 to 2 different experiments. Sox2 conditions: A minimum of 711 cells, collected from 5 to 6 embryos were analysed for each timepoint, from 2 different experiments.

Figure 5: A minimum of 606 cells, collected from 5 to 6 embryos were analysed for each timepoint, from 2 different experiments.

Cumulative EdU incorporation in cCdkn1c and control KD progenitors

Chick embryos were electroporated at E2 with either Control shRNA or cCdkn1c shRNA 1 and EdU injections were performed *in ovo* starting at E3 and then every 6 hours to cover the whole cell cycle.

At each measured timepoint (1h, 4h, 7h, 10h, 12h, 14 and 17h after the first EdU injection), we quantified the number of EdU-positive electroporated progenitors (triple positive for EdU,

pRb and GFP) over the total population of electroporated progenitor cells (pRb and GFP positive) (Figure 3B). Cycling progenitor graphs were then constructed by plotting the obtained average values for each timepoint. The numbers of embryos, sections and cells quantified for each timepoint in each condition is detailed below.

cCDKN1C shRNA 1 condition: A minimum of 730 cells, collected from 3 to 5 embryos were analysed for each timepoint, from 1 to 2 different experiments.

Control shRNA condition: A minimum of 689 cells, collected from 2 to 5 embryos were analysed for each timepoint, from 1 to 2 different experiments.

Quantification of progenitors in S phase at a given time point (1h EdU pulse).

Control shRNA vs single cCDKN1C shRNA 1 vs single cCCND1 shRNA vs double cCDKN1C + cCCND1 shRNAs were electroporated in HH13-14 chick embryos. One or two days after shRNAs electroporation (and a reporter of electroporation (GFP) for cCCND1 shRNA alone), we injected EdU *in ovo* one hour before collecting the embryos, then labelled transverse sections for EDU incorporation. We then quantified the proportion of progenitors in S-phase in the shRNA conditions (GFP/EdU/pRb-positive cells) over the global population of electroporated progenitor. The numbers of embryos, sections and cells quantified for each timepoint in each condition is detailed below. Post-EP = post-Electroporation. For the CDKN1C shRNA 1, values at 24h post-EP were re-used from cumulative cell cycle values obtained previously.

24h post-electroporation: For each condition, a minimum of 730 cells collected from 3 to 6 embryos were analysed; 48h post-electroporation: For each condition, a minimum of 1594 cells collected from 3 to 6 embryos were analysed

G1 analysis of neural progenitors at cell level.

We used the FlashTag (FT) technique, based on the ability of the cell-permeant dye CellTrace Far Red (Life Technologies, #C34564) to fluorescently label intracellular proteins. Previous experiments in the embryonic chick have shown that upon direct injection in the neural tube, FT dyes preferentially enter progenitor cells undergoing mitosis near the apical surface and that this incorporation only occurs during a 15-30 minutes' time window (Baek et al., 2018b). Since FT fluorescence is preserved in daughter cells after mitosis, this dye offers a convenient means to synchronously label a cohort of cells dividing at the time of injection and follow their progeny.

Using a combination of FT injection and cumulative EdU incorporation appears as an excellent tool to monitor precisely the average length of the G1 phase. Daughter cells from FT positive progenitors enter G0/G1 phase just after mitosis, and will start incorporating EdU only when entering in S phase. For each cell in a FT cohort, the time window between FT injection and the beginning of EdU incorporation corresponds to the duration of the G1 phase. One day after electroporation, FT and EdU were injected simultaneously and embryos were collected at different time points after injection to identify the time at which all cells in the FT cohort have exited G1 and entered S-phase. For time points over 6 hours, an additional EdU injection was performed after 6 hours to cumulatively label the whole population of cycling cells.

We quantified the number of electroporated (GFP+) progenitors (pRb+) having incorporated EdU and FT (GFP/pRb/EdU/FT quadruple positive) relative to the number of FT electroporated progenitors (GFP/pRb/FT triple positive). At each time point, the percentage of quadruple positive cells represents the proportion of progenitors having completed their G1 phase. A minimum of 220 cells, collected from 2 to 4 embryos were analysed for each timepoint, from 1 to 2 different experiments

Clonal analysis of sister cell identities and mode of division

We first determined the time point after mitosis at which pRb becomes a reliable progenitor marker by monitoring the time window after which all progenitors in a synchronized cohort of cells undergoing mitosis reach the restriction point/late G1 stage, as determined by pRb immunoreactivity. Using FT to label a cohort of cells that perform their division synchronously, we counted the number of FT cells that were also positive for pRb at E2.25 and E3 at different time points. The plateau of FT-pRb positive cells, which corresponds to the time required for all progenitors to complete their early G1 phase, was already reached 45 minutes after mitosis at E2.25, while it was only reached between 4h30 and 6 hours after division at E3. Accordingly, the distribution of pRb immunoreactivity within pairs of FT-positive sister cells was also constant 6 hours after mitosis at E3. We therefore choose to perform clonal analysis in embryos harvested 6 hours after FT injection, and used pRb immunostaining to identify progenitor identity. A minimum of 320 cells, collected from 3 to 4 embryos were analysed for each timepoint, from 1 experiment

Chick embryos were electroporated at E2 with the relevant shRNAs. One day later FlashTag was injected in the neural tubes in order to follow the progeny of isochronic dividing neural progenitors

Cell identity of transfected GFP positive cells was determined as follows: cells positive for pRb and FlashTag were classified as progenitors and cells positive for FlashTag and negative for pRb as neurons. A similar intensity of both the GFP and FT signals within pairs of cells, as well as their proximity within the tissue were used as criteria to ascertain sisterhood. Using these criteria to identify pairs of sister cells, the mode of division used by their mother cell was determined as follows: symmetric if the two daughter cells were attributed the progenitor identity (PP); asymmetric if one of the daughters was a progenitor and the other daughter a neuron (PN); and terminal) if the two daughter cells had a neuronal identity (NN).

Statistical analyses

The number of embryos and analysed cells or sections are indicated above. All data processing and statistical analyses were performed using Excel and GraphPad Prism software and are indicated in Legend to figure.

Contact for Reagent and Resource Sharing

As Lead Contact, Xavier Morin (Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure) is responsible for all reagent and resource requests. Please contact Xavier Morin at xavier.morin@bio.ens.psl.eu with requests and enquiries.

Key Ressources Table – STAR METHODS

REAGENT OR RESSOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Chick anti-GFP	Aves Labs	Cat#GFP-1020 RRID : AB_10000240
Goat anti-Sox2 (clone Y-17)	Santa Cruz	Cat#Sc-17320 RRID : AB_2286684
Rabbit anti-pRb (Ser807/811)	Cell Signaling	Cat# 8516S RRID : AB_331472
Mouse anti-HuC/D (clone 16A11)	ThermoFisher Scientific	Cat#A-21271 RRID : AB_221448
Mouse anti c-myc tag	Sigma-Aldrich	Cat# MABE5282 RRID : N/A
Polyclonal anti-DsRed	Takara Bio	Cat#632496 RRID : N/A
Experimental Models : Organisms/Strains		
Chick fertilized eggs	EARL Morizeau	JA57
Recombinant DNA		
PTol2-H2B-EGP	Peyre et al, 2011	N/A
PTol2-H2B-EGP Luciferase	Peyre et al, 2011	N/A
pGFP-cCDKN1C shRNA1	This paper	N/A
pGFP-cCDKN1C shRNA2	This paper	N/A
pGFP-cCDKN1C shRNA3	This paper	N/A
pGFP-cCDKN1C shRNA4	This paper	N/A
pGFP-cCDKN1C shRNA5	This paper	N/A
pGFP-cCDKN1C shRNA6	This paper	N/A
cCCND1 siRNA	(Lukaszewicz and Anderson, 2011b)	N/A
pCAGGS	Niwa et al, 1991	N/A
pCX-H2B-EGFP	Gift from K. Hadjantonakis	N/A

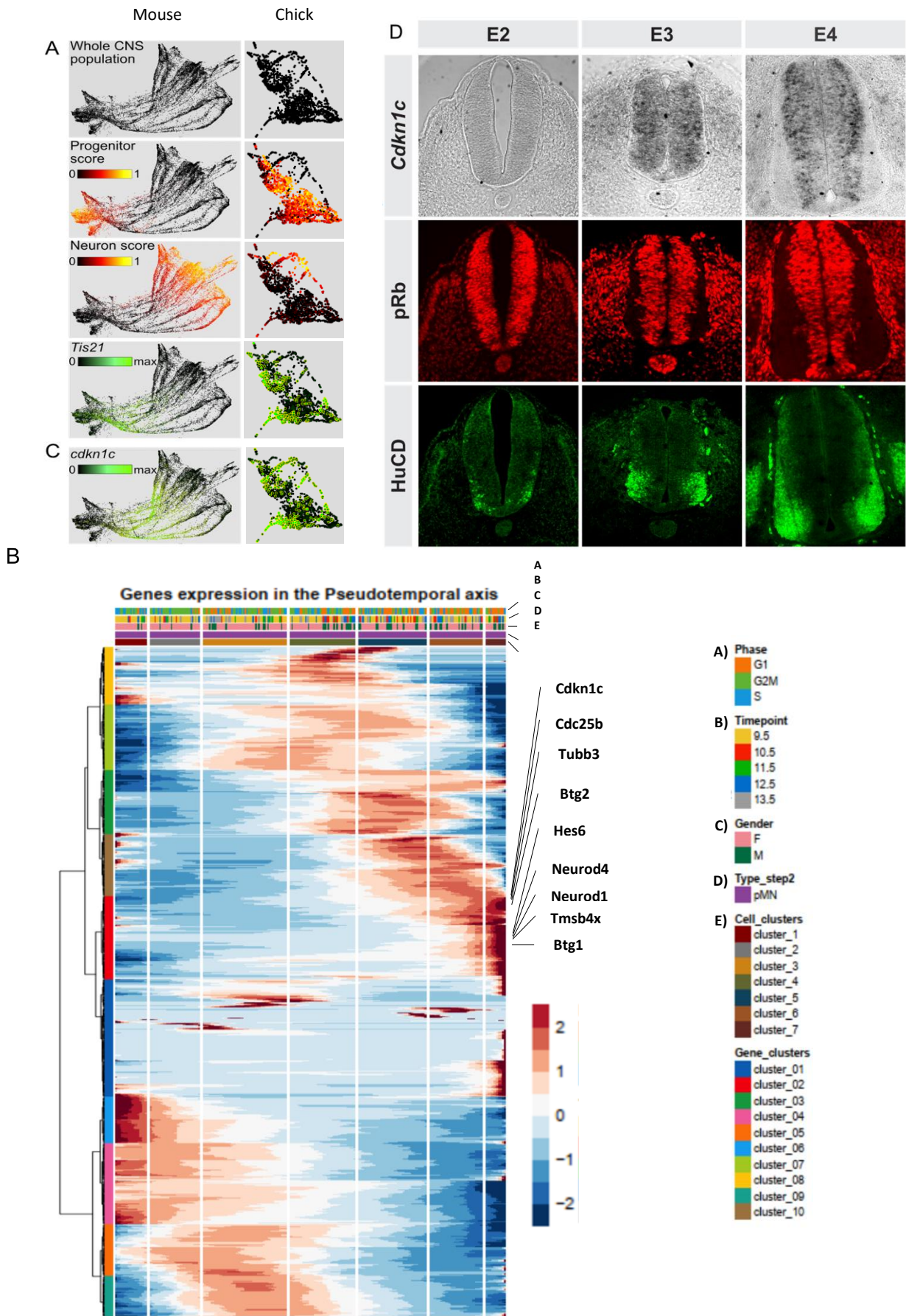
Oligonucleotides		
General oligonucleotide: First hairpin primer 5' 5'-ggcgggtagctggagaagatgccttccgga- gaggtgctgctgagcg-3'	Eurofins Ge- nomics	N/A
General oligonucleotide: First hairpin primer 3' 5'-gggtggacgcgtaagaggggaagaaagcttctaaccgctattcac- caccactaggca-3'	Eurofins Ge- nomics	N/A
Target forward sequence cCDKN1C shRNA1 5' gagaggtgctgctgagcgaggcaccgtgcccgcttctatagtaa- gccacagatgta 3'	Eurofins Ge- nomics	N/A
Target reverse sequence cCDKN1C shRNA1 5' attcaccaccactaggcacggcaccgtgcccgcttctatacatctgtggcttact 3'	Eurofins Ge- nomics	N/A
Target forward sequence cCDKN1C shRNA2 5' gagaggtgctgctgagcgtagcaccgcatcacagatttagtaagccacagatgta 3'	Eurofins Ge- nomics	N/A
Target reverse sequence cCDKN1C shRNA2 5' attcaccaccactaggcacagcaccgcatcacagatttatacatctgtggcttact 3'	Eurofins Ge- nomics	N/A
Target forward sequence cCDKN1C shRNA3 5' gagaggtgctgctgagcggcgccgtctgcaggagcttatacatctgtggcttact 3'	Eurofins Ge- nomics	N/A
Target reverse sequence cCDKN1C shRNA3 5' attcaccaccactaggcaagcggcgtctgcaggagcttatacatctgtggcttact 3'	Eurofins Ge- nomics	N/A
Target forward sequence cCDKN1C shRNA4 5'gagaggtgctgctgagcgtagcgggagaaccgcccgtagtaagccacagatgta 3'	Eurofins Ge- nomics	N/A
Target reverse sequence cCDKN1C shRNA4 5'attcaccaccactaggcatgagcgggagaaccgcccgtacatctgtggcttact 3'	Eurofins Ge- nomics	N/A
Target forward sequence cCDKN1C shRNA5 5'-gagaggtgctgctgagcgtagcaccgcatcacagatttcttagtaagccacagatgta- 3'	Eurofins Ge- nomics	N/A
Target reverse sequence cCDKN1C shRNA5 5'-attcaccaccactaggcacgaccgcatcacagatttctatacatctgtggcttact-3'	Eurofins Ge- nomics	N/A
Target forward sequence cCDKN1C shRNA6 5'-gagaggtgctgctgagcgctcaataaacaacaaaaaataagtaa- gccacagatgta-3'	Eurofins Ge- nomics	N/A

Target reverse sequence cCDKN1C shRNA6 5'-attcaccaccactaggcactcaataaacaacaaaaa tacatctgtggcttctcact- 3'	Eurofins Ge- nomics	N/A
Softwares		
ImageJ	(Schneider et al., 2012)	http://imagej.net/Wel-come RRID: SCR_003070
Graphpad Prism	Graphpad	http://www.graphpad.com/ RRID: SCR_002798
Microsoft Excel	Microsoft	RRID: SCR_016137
MicroManager	(Edelstein et al., 2010)	https://micro-man- ager.org/ RRID: SCR_000415
Affinity Publisher	Affinity	N/A

Acknowledgements

We thank our colleagues Samuel Tozer for discussions and critical reading of the manuscript, and Benjamin Bunel for help during the setting up of the manuscript. We thank Fabienne Pituello and Matthew Towers for plasmids. Work in X.Morin's laboratory was supported by the Fondation pour la Recherche Medicale (FRM EQU202003010547), the Labex MEMO LIFE, the Agence Nationale pour la Recherche (SYMASYM ANR-18-CE16-0021-01), the Fondation Cino del Duca. B. Mida was supported by doctoral grants from the French Ministry of Higher Education and Research (MESR) and the Labex MEMO LIFE. This work has received support under the program « Investissements d'Avenir » launched by the French Government and implemented by the ANR, with the reference ANR-10-LABX-54 MEMO LIFE. The authors declare no competing financial interests.

Mida et al., Figure 1



Mida et al., Figure 1

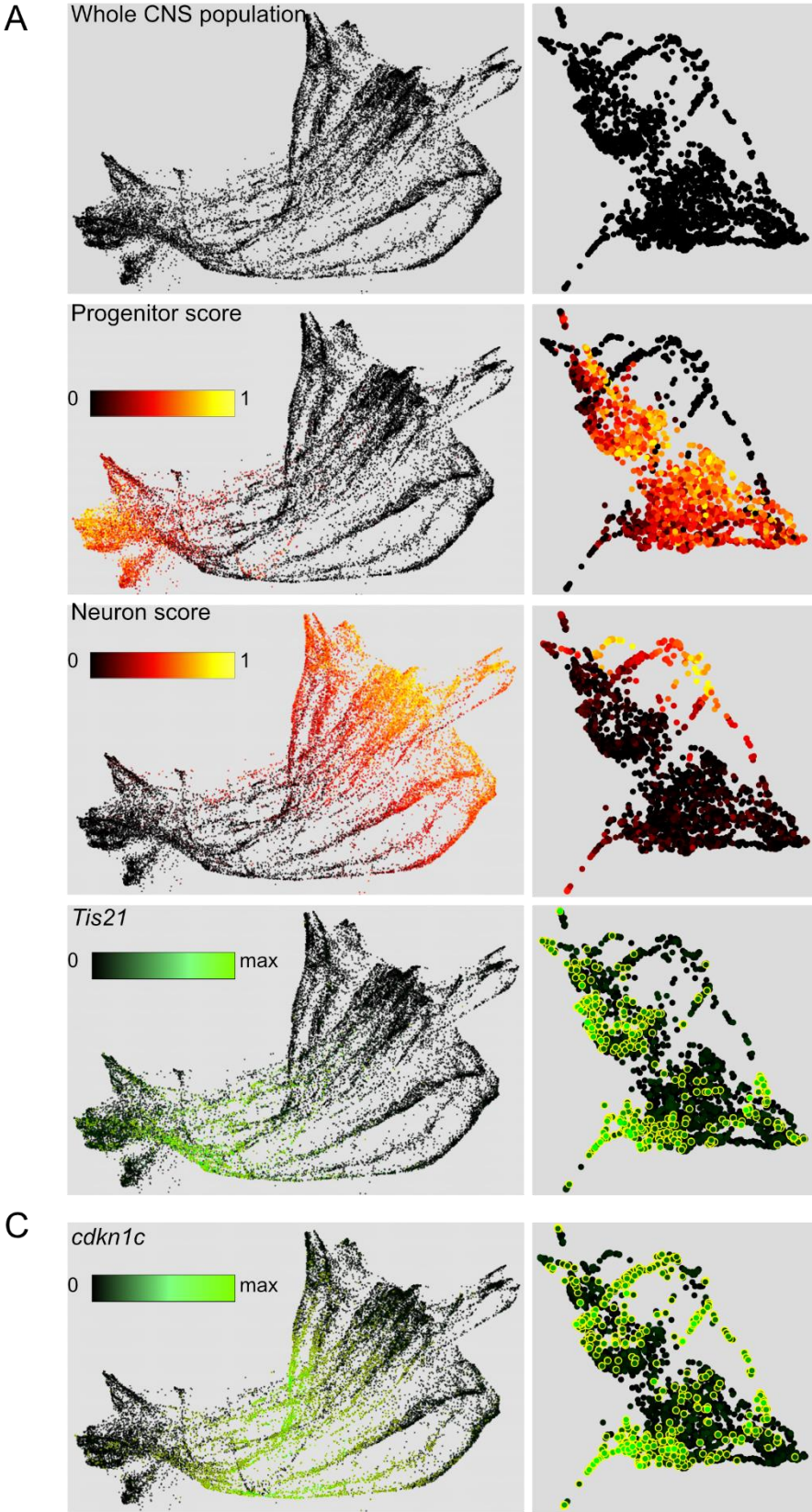


Figure 1 : scRNAseq data analyses from embryonic neural tube led to the identification of CDKN1C as a potential regulator of the transition of modes of division.

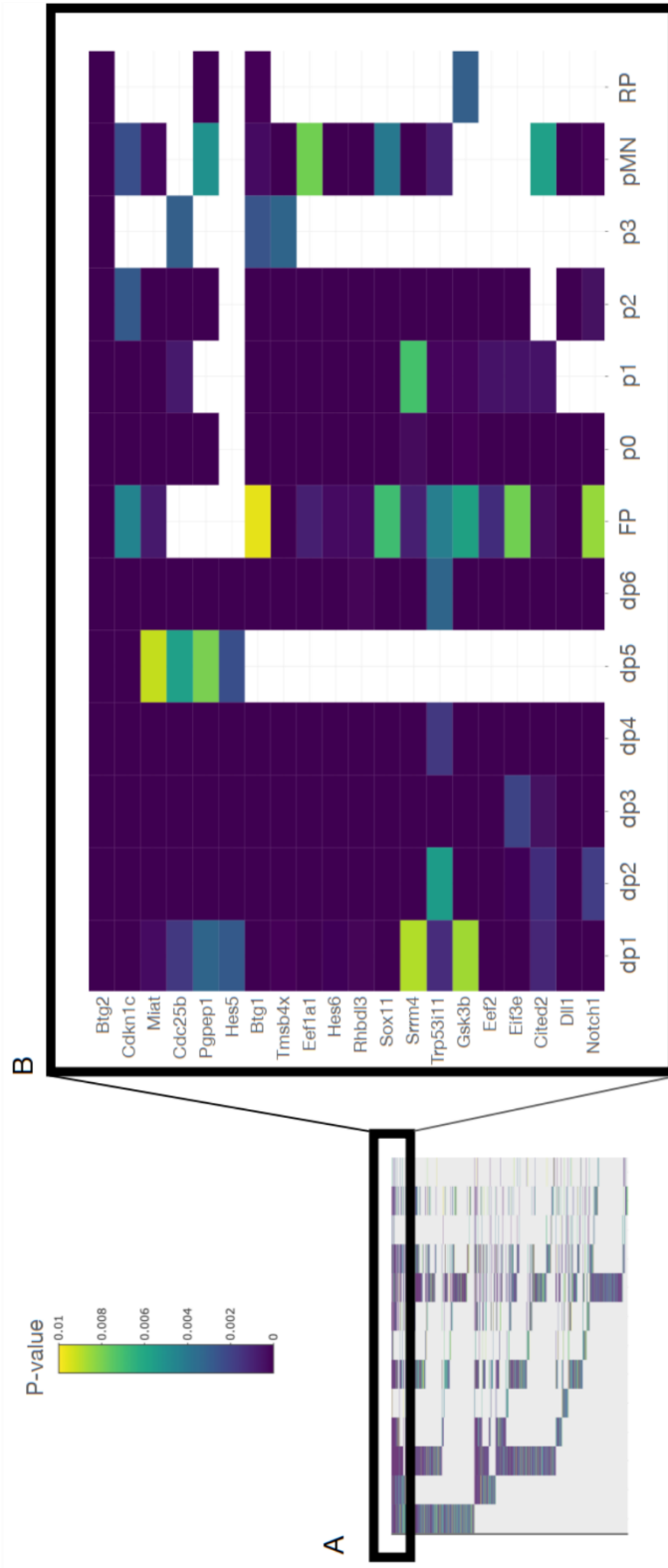
A Scoring system to define progenitor and neuron populations. Spring Graphical representations of neural cells showing a continuum, without clear delimited clusters. Cells with high expression of progenitor score genes are located at the top of the representation and cells with high expression of neuron score genes at the bottom part in mouse and chick single-cell RNA-seq datasets. (Higher magnification of items A and C page 39)

B Gene expression along the pseudotime axis. Heatmap of the 1088 genes whose expression have been identified as variable along the pseudo time axis. Vertical legend (gene cluster) represent the genes with similar pattern. Horizontal legends represent i) the cell cycle phase, ii) cell subtypes, iii) clustering on the cells (Cell_clusters). The blue/red color gradient represent the value of the Z-scores. Tis21/Btg2 and Cdkn1c are both found in the cluster 02 (red).

C mRNA CDKN1C expression in chick embryonic neural tube. Spring graphical representation of the cells expressing CDKN1C. Its expression starts in at low level in cells expressing high values of progenitor score while it is expressed at high level in cells located just above the neuron population (i.e; expressing the neuron score at high level).

D mRNA expression of Cdkn1c increases during neurogenesis in chick embryonic neural tube. A In situ hybridization of Cdkn1C on cryosections of thoracic region of chick embryo at sequential days during development (from left to right: E2, E3, and E4 respectively, immunostained with pRb (B) (red) and HuCD (magenta) (C). D: In situ hybridization of cdkn1C at E3 showed an overlap with pRb immunofluorescence (red) in the ventricular zone, while cells with high expression are excluded from this zone. Scale bars: 50µm

Mida et al., Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 1: Heatmap of the most shared genes between BTG2 positive populations.

Colors represent the p values. A) We found 1294 differentially expressed genes in BTG2 positive populations, after extracting genes that are shared in at least 2 subpopulations. B) Top 20 genes, (Vertical legend) extracted from zooming in A. Horizontal legends represent the subdomains in mouse embryonic neural tube.

Mida et al., Figure 2

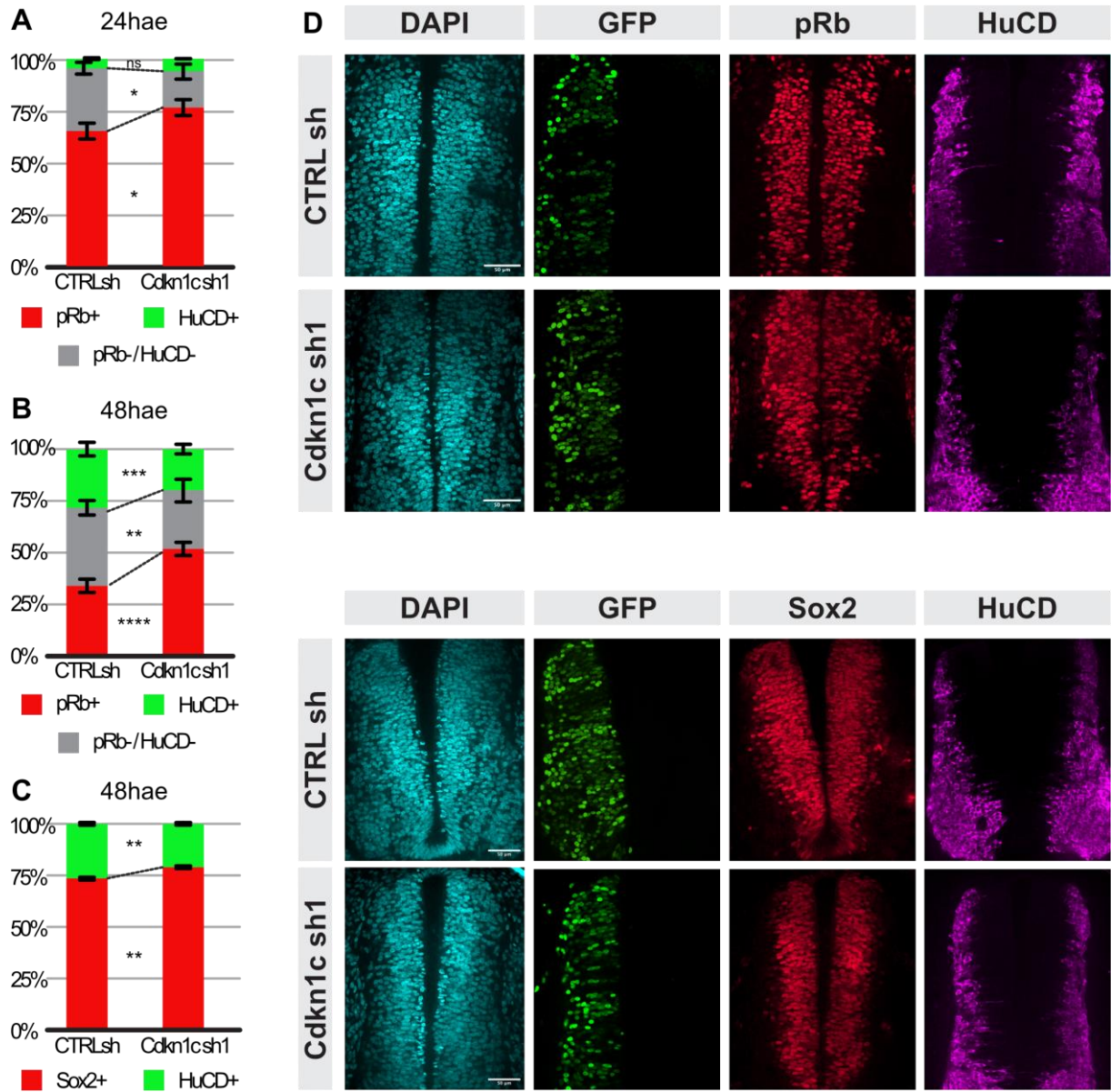


Figure 2: Downregulation of CDKN1C impairs neurogenesis while favoring proliferation.

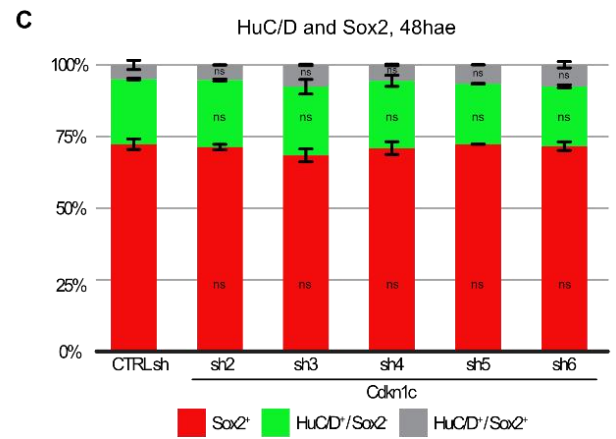
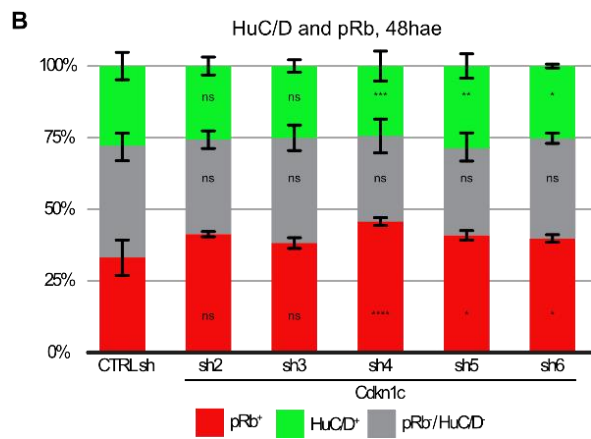
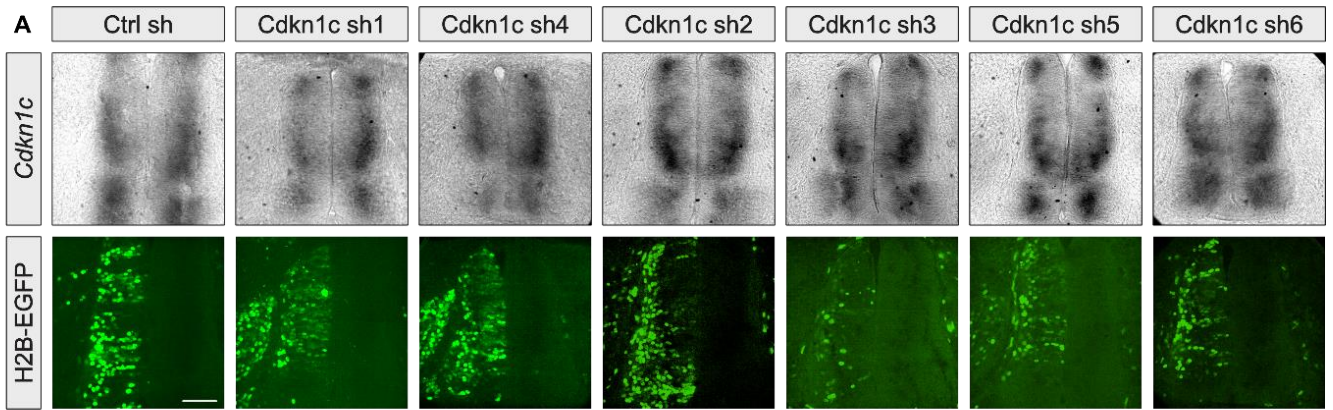
A Distribution of the pRb positive progenitors (red), HuC/D positive neurons (green) and undefined cells (double pRb/HuCD negative, gray) in shRNA or control conditions at E3 24 hours after electroporation (hae). The undefined population corresponds to progenitors before the restriction point (and therefore negative for pRb) or to immature neurons not yet expressing HuCD. Mann-Whitney test; n.s. $p > 0.05$; * $p = 0.0286$.

B Distribution of the pRb positive progenitors (red), HuC/D positive neurons (green) and undefined cells (double pRb/ HuCD negative, gray) in shRNA or control conditions at E4 48 hours after electroporation (hae). Mann-Whitney test; ** $p = 0.0015$; *** $p = 0.0008$; **** $p < 0.0001$.

C Distribution of the Sox2+ positive cells (red) and HuC/D positive neurons (green) in shRNA or control conditions at E4 48 hours after electroporation (hae). Rare double positive cells (Sox2+, HuCD+) were observed. They are included in the HuCD positive neuronal population. Mann-Whitney test; ** $p = 0.0043$.

D: Transverse sections of the chick neural tube (thoracic level) at E4 (HH st22) stained with HuCD antibody (magenta) to label neurons and either pRb (upper panel; red) or Sox2 (lower panel; red) in shRNA or control conditions. Scale bar: 50 μ m.

Mida et al., Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 2

A mRNA expression of Cdkn1c in chick embryonic neural tube after electroporation of each of the six shRNA. In situ hybridization on cryosections of thoracic region of chick embryo coupled to GFP immunofluorescence. Upper panel: Efficient downregulation of CDKN1C mRNA was observed in shRNA 1 and to a lesser extent shRNA 4 conditions, while comparable mRNA expression to the control condition was observed with the other shRNAs (compare left versus right hemitube). Lower panel: Corresponding level of electroporation for each embryo (GFP immunofluorescence). Scale bar: 50 μ m

B Distribution of the pRb positive progenitors (red), HuC/D positive neurons (green) and undefined cells (double pRb/ HuCD negative, gray) in shRNA 2, 3, 4, 5, 6 or control conditions at E4 48 hours after electroporation (hae). Mann-Whitney test; n.s. $p > 0.05$; **** $p < 0.0001$; *** $p = 0.0008$; ** $p = 0.0071$; * $p = 0.0365$

C Distribution of the Sox2+ positive cells (red) and HuC/D positive neurons (green) in shRNA 2, 3, 4, 5, 6 or control conditions at E4 48 hours after electroporation (hae). Mann-Whitney test; n.s. $p > 0.05$

Hae: hours after electroporation

Mida et al., Figure 3

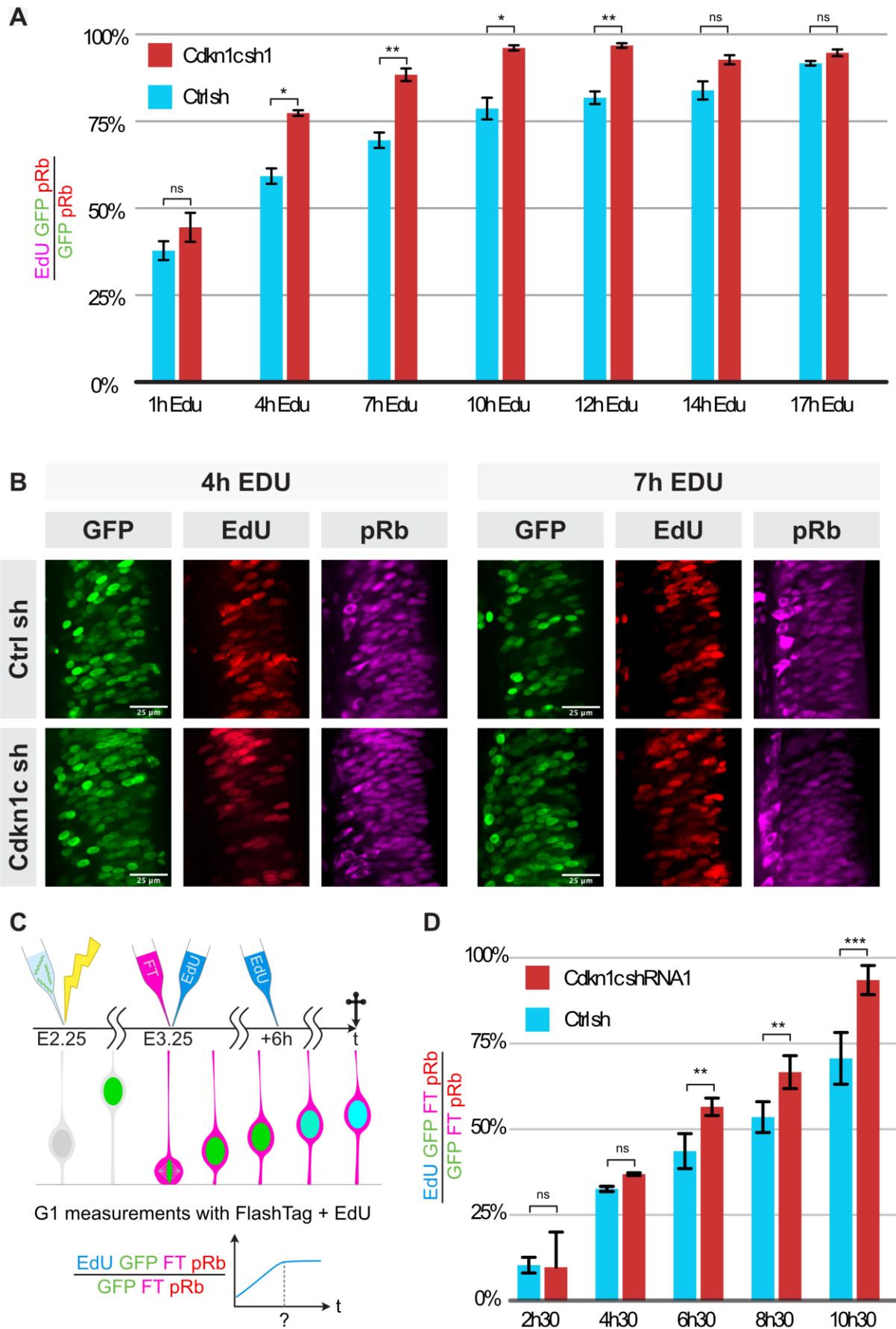


Figure 3 CDKN1 knock-down shortens cell cycle duration.

A Distribution of the electroporated progenitors in S phase in the electroporated progenitor population in shRNA 1 and control conditions. The columns represent the percentages of (EdU/pRb/GFP triple positive cells) (in XXX) in the electroporated progenitor (GFP/pRb double positive cells) population (in YYYYY) at each time point. Mann-Whitney test; n.s. $p > 0.05$ after 1h EdU, after 14hr and after 17hr EdU; ** $p=0.0043$ after 7hr and $p=0.0075$ after 12hr; * $p=0.0159$ after 4hr and 10hr.

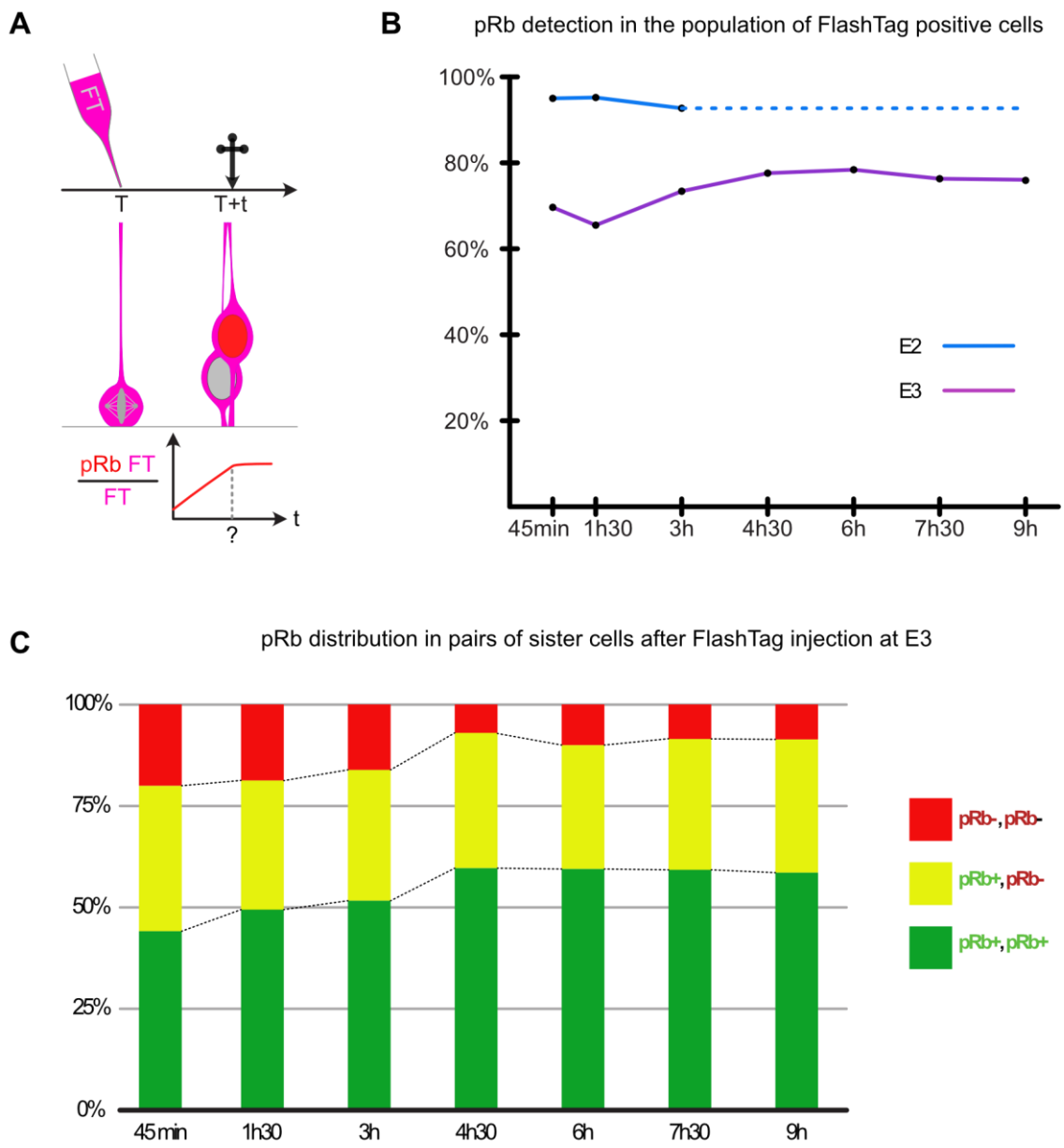
B EdU incorporation (red) in representative transverse sections of the chick neural tube (thoracic level) at two time points (left +4h, right +7h) after EdU administration started at E3 (HH st22), stained with pRb antibody (magenta) to label progenitors, and GFP antibody to identify electroporated cells. Scale bar: 25 μm .

C Schematic representation of the experimental strategy to measure G1 length. Embryos were electroporated with shRNA1 or control plasmids at E2.25 (HH13-14). One day later, FT injection in the neural tube and EdU administration in ovo were performed simultaneously. Embryos were harvested at consecutive time point every 2 hours between 2:30 and 10:30. For later time points, a second EdU injection was performed 6hrs after the first one. EdU, 5-ethynyl-20-deoxyuridine; FT, FlashTag

D Dynamics of EdU incorporation in a FlashTag-positive cohort of electroporated progenitors. The columns represent the percentages of EdU-positivity in FlashTag/pRb/GFP triple positive cells in shRNA and control population at each time point. EdU, 5-ethynyl-20-deoxyuridine; FT, FlashTag. Mann-Whitney test; n.s. $p > 0.05$ after 2h30 and 4h30 after EdU; ** $p=0.0023$ after 6hr30 and $p=0.0013$ after 8hr30; *** $p=0.0043$ after 10hr30.

Mida et al., Supplementary Figure 3

Time course of pRb saturation in a cohort of FlashTag labelled cells at E2 and E3



Supplementary Figure 3: pRb is a reliable marker of progenitor cells 6 hours after mitosis

A Schematic representation of analysis of pRb expression in pairs of sisters. Embryos are injected with FT at E2.25 or E3 to label a synchronous cohort of mitotic progenitors. They are collected at different timepoints after injection to determine at which time point pRb positivity will reach a plateau, corresponding to the time when all progenitors can be unambiguously identified using pRb as a marker.

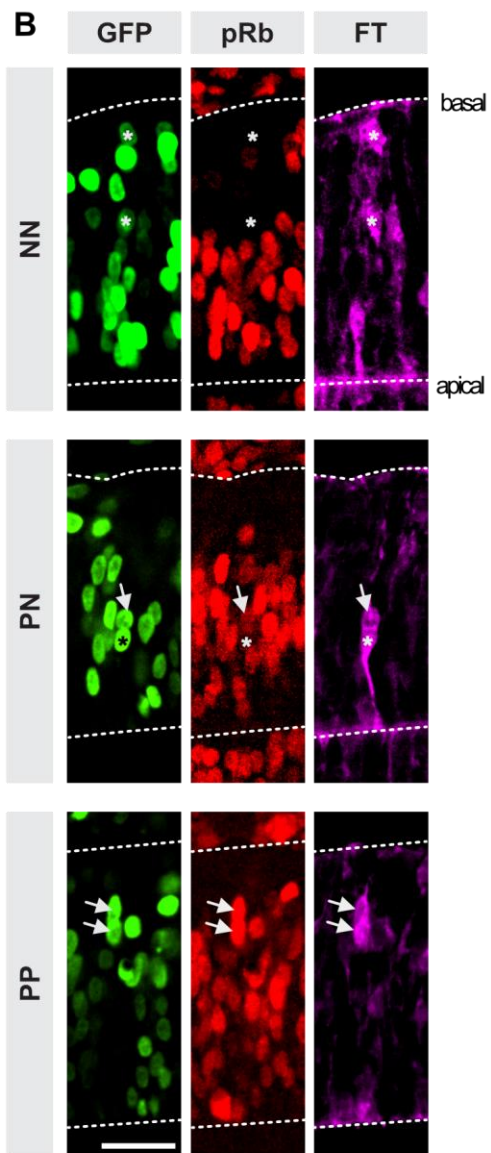
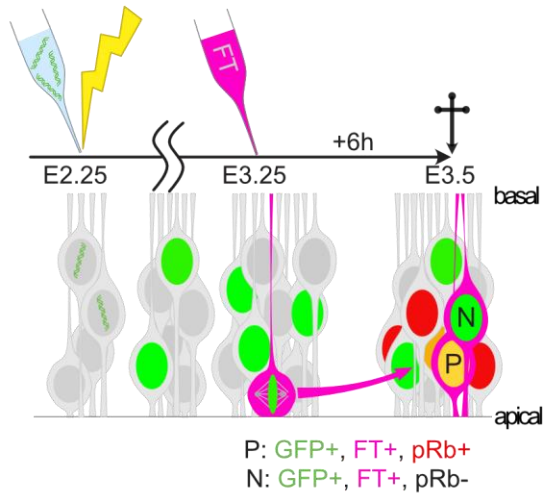
B Time course of pRb expression after FlashTag injection. FlashTag injection was performed at HH13-14 (E2.25) and HH17-18 (E3) and embryos were harvested at the indicated timepoints after injection. Embryos were harvested at consecutive time points and thoracic vibratome sections were immunostained with pRb antibody to evaluate pRb status in FlashTag positive cells. Note that almost all cells were co-labelled shortly after mitosis at E2.25, while a plateau was reached between 4h30 and 6h at E3.

C Distribution of pRb expression in pairs of sister cells at consecutive time points after FlashTag injection. The columns represent the pRb status in sister cells at different time point after FlashTag injection. The proportion of pairs with two pRb positive cells (green), one pRb-positive cell (yellow) or zero pRb positive cell (red) is stable after 4h30, indicating that after that time point, pRb status becomes a reliable indicator for fate analyses in FT-labelled pairs of sister cells.

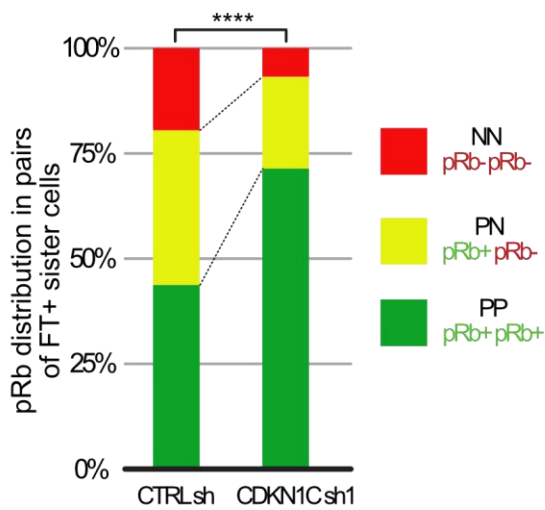
FT: FlashTag

Mida et al., Figure 4

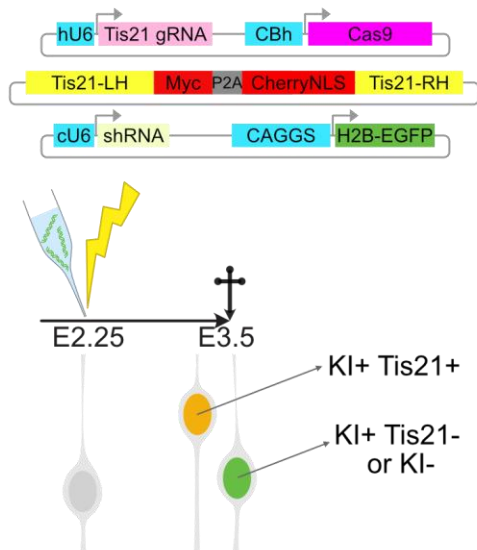
A Experimental scheme for clonal analyses



C Identity of FT+ sister cells at E3 +6h



D



E Tis21-expressing KI cells in the electroporated population

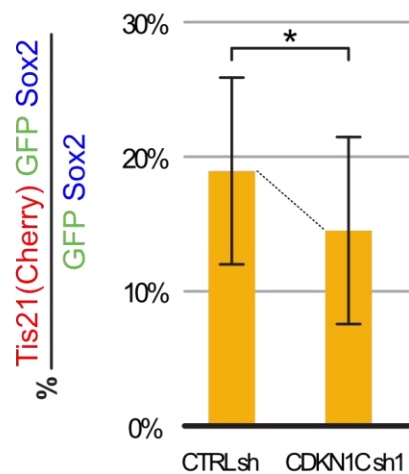


Figure 4: CDKN1C knock-down favors proliferative symmetric modes of division.

A Schematic representation of analysis of pRb expression in pairs of sister's cells. Embryos are coelectroporated at HH13-14 with shRNA or control plasmids also expressing a H2B-EGFP reporter. Embryos are injected with FlashTag 24 hours after electroporation to label a synchronous cohort of mitotic progenitors and collected six hours later. Anti-pRb and anti-GFP Immunofluorescence on thoracic vibratome sections to determine the progenitor status of FlashTag-positive electroporated sister cells.

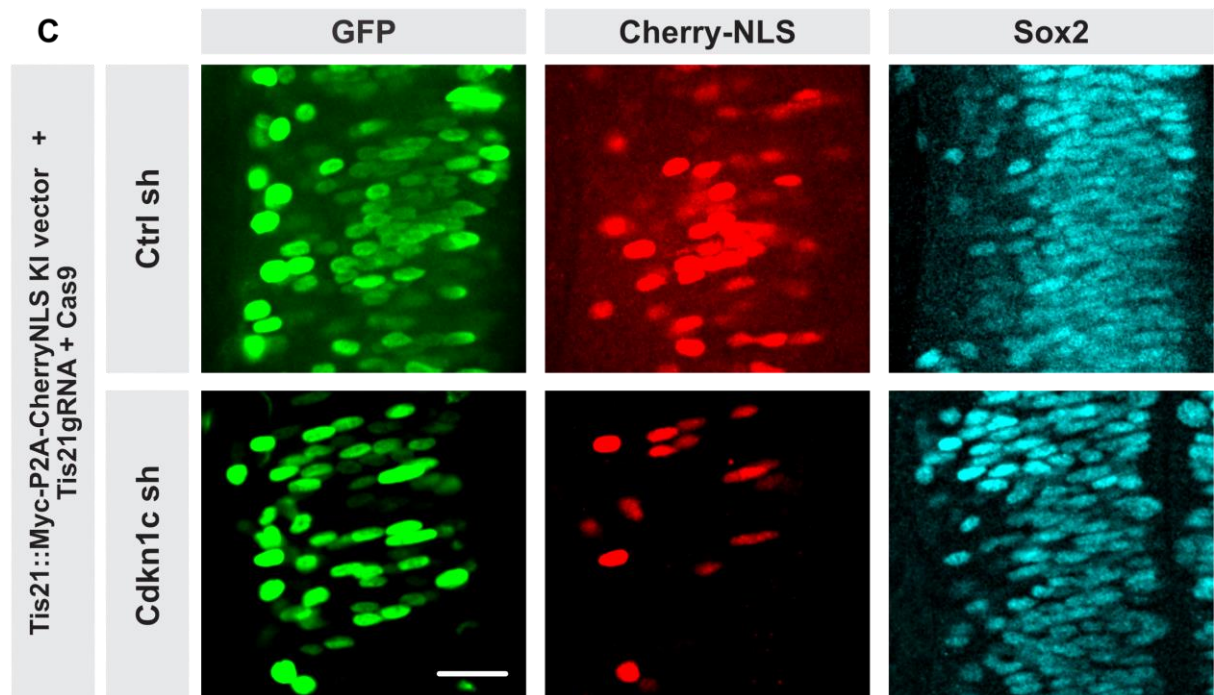
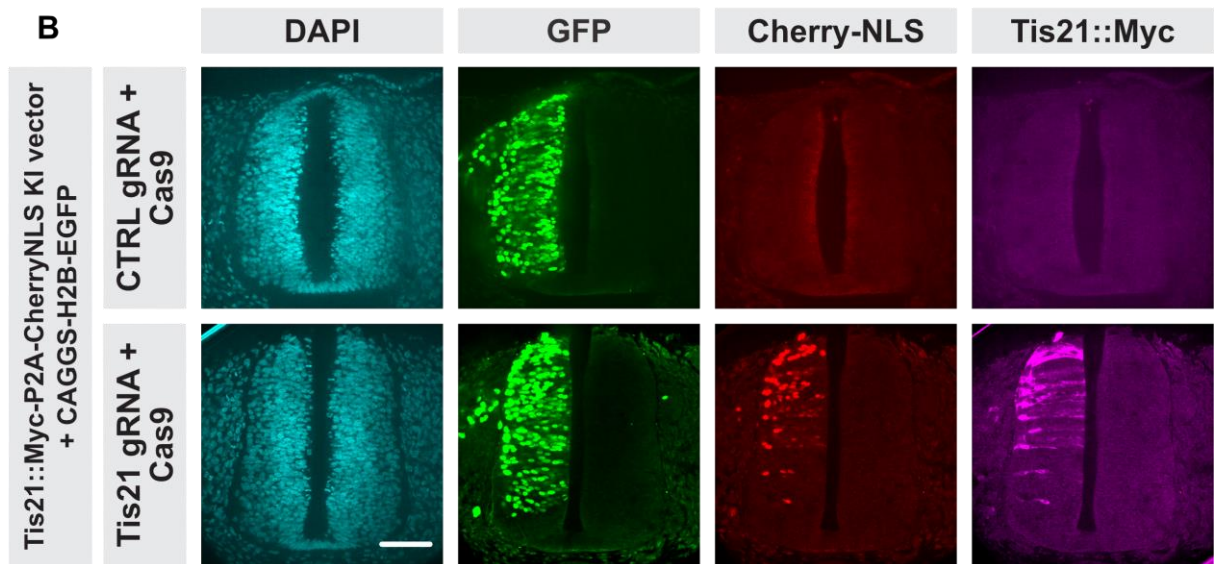
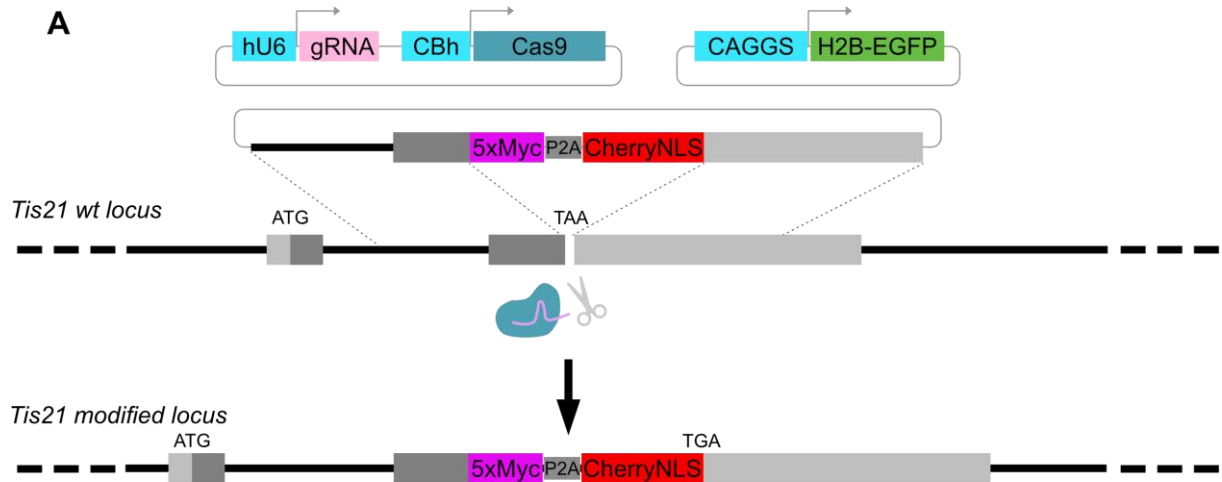
B Representative two cell clone examples in transverse neural tube sections. From the top to bottom panels: NN, PN and PP pairs. Arrows show pRb-positive (red) progenitors and asterisks show pRb-negative neurons in FlashTag-positive (magenta) pairs of GFP-positive (green) sister cells. Scale bar: 25 μ m

C Diagram indicating the percentage of P-P, P-N, and N-N clones for control and shRNA transfected embryos. P-P, P-N, and N-N stand for divisions producing two progenitors, one progenitor and one neuron, or two neurons, respectively. The distribution of P-P, P-N and N-N clones between control and shRNA was compared using a Chi2 test, **** $p < 0.0001$

D Schematic representation of Tis 21 expression analysis in CDKN1C knock-down and control conditions. Crispr/Cas9 homologous recombination strategy is used to insert a fluorescent reporter (mCherry) and Myc-tags at the Tis21 locus. Knock-in vectors are electroporated at HH13-14 in combination with Cdkn1c shRNA or control plasmids. Embryos are harvested 30 hours later and anti-Sox2 and anti-Cherry immunofluorescence is performed on thoracic vibratome sections. Note that the rate of Tis/Cherry positive cells reflects the proportion of Tis21+ progenitors in the neural tube multiplied by the rate (or efficiency) of KI events in the electroporated population (see methods).

E Diagram indicating the percentage of Tis21 (Cherry) positive cells in Sox2-positive electroporated cells (GFP+) in Cdkn1c and control shRNA conditions. The distribution between control and shRNA was compared using a Mann-Whitney test, * $p = 0.0173$. $n = 6$ embryos from $N = 2$ experiments were analyzed; 4322 cells were counted for the Control shRNA condition, and 4508 cells were counted for Cdkn1c shRNA.

Mida et al., Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 4: Tis21-KI by CRISPR/Cas9-based homologous recombination

A Principle of the CRISPR/Cas9-based somatic KI strategy. Somatic knock-in of a 5xMyc-P2A-CherryNLS reporter at the endogenous Tis21 locus is achieved via in ovo electroporation of a plasmid coding for the Cas9 protein and a guide RNA targeting the region of the stop codon of Tis21, and a homologous recombination vector including 1kb long arms of homology. An electroporation reporter (CAGGS-H2B-EGFP) is added to the plasmid mix.

B Validation of the efficiency and specificity of the Tis21 gRNA. Transverse vibratome sections through the neural tube of E3 embryos 24 hours after electroporation show strong and specific Cherry and Myc signals in embryos having received a guide RNA targeting the C-terminus of Tis21 coding sequence, and no signal when a control gRNA was used. Scale bar: 50µm

C Reduction of Tis21 expression upon Cdkn1c knock-down. Representative images of transverse vibratome sections of embryos electroporated with control or cdkn1c shRNA vectors together with the Tis21 knock-in mix of plasmids (related to Figure 4E). Scale bar: 20µm

Mida et al., Figure 5

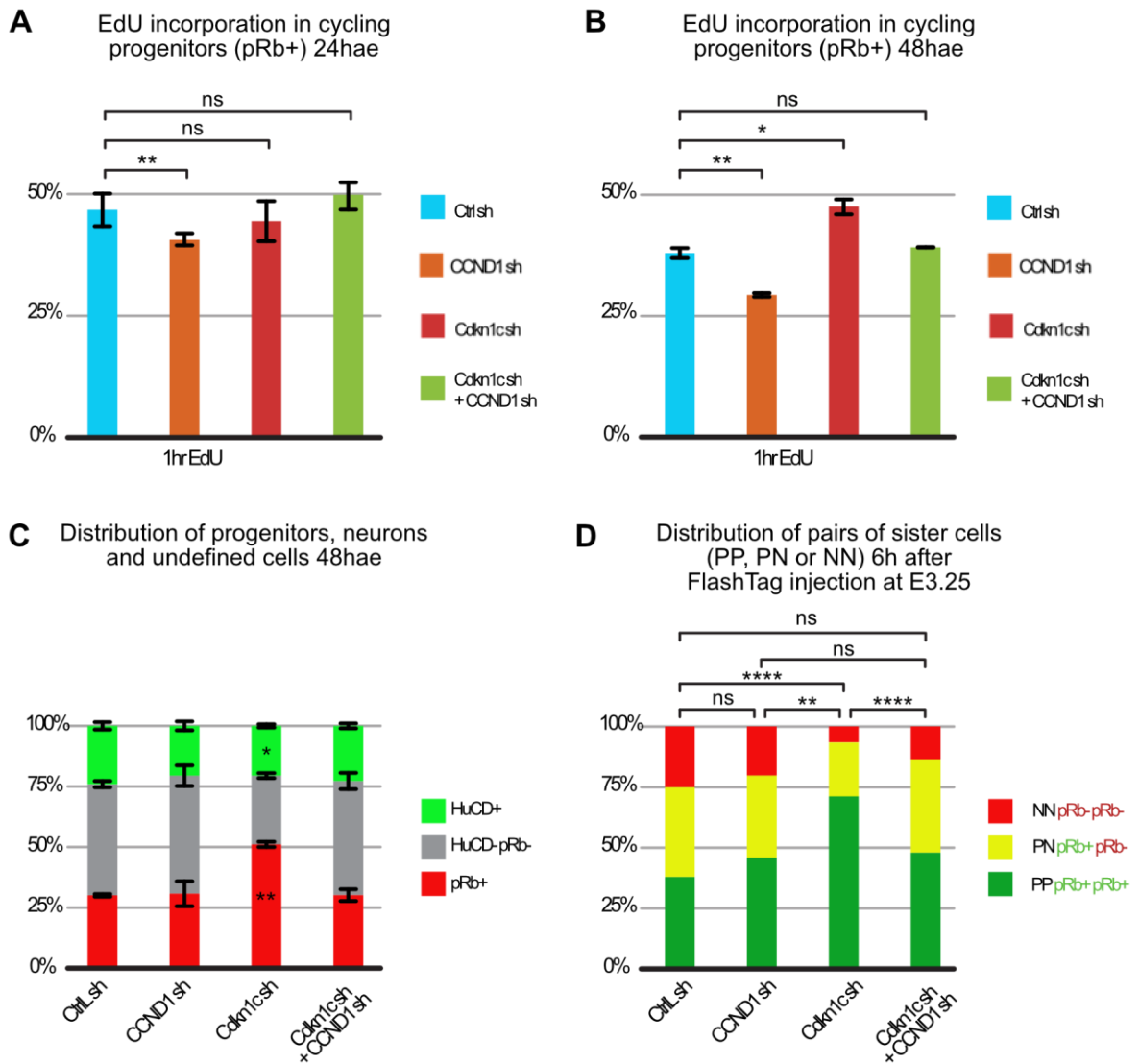


Figure 5: Double Ccnd1 and Cdkn1c shRNAs electroporation rescues the defective neuron production observed in single Cdkn1c shRNA condition.

A Diagram indicating the proportion of EdU positive progenitors after a 1hr pulse of EdU at E3. The columns represent the percentages of EdU-positive cells in electroporated progenitors (pRb/GFP double positive) in control, single Ccnd1, single Cdkn1c and double Ccnd1/Cdkn1c shRNA conditions. Mann-Whitney test: ns, $p > 0.05$; ** $p = 0.0043$

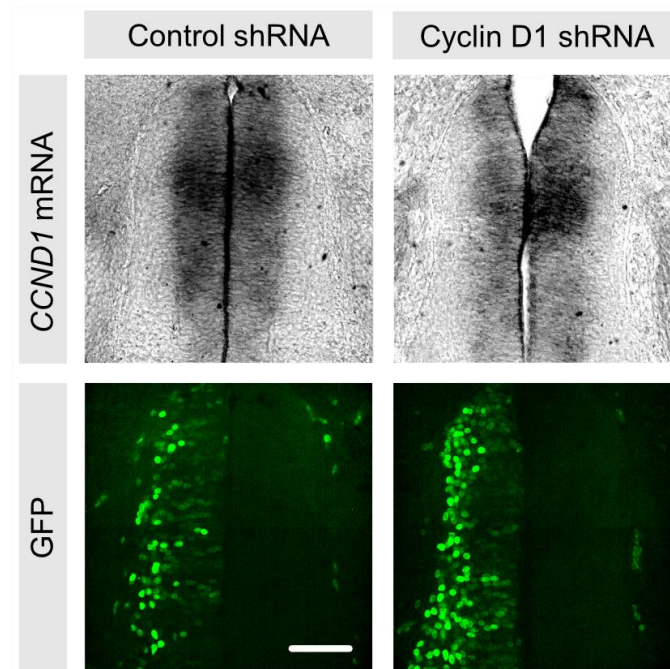
B Diagram indicating the proportion of EdU positive progenitors after a 1hr pulse of EdU at E4. The columns represent the percentages of EdU-positive cells in electroporated progenitors (pRb/GFP double positive) in control, single Ccnd1, single Cdkn1c and double Ccnd1/Cdkn1c shRNA conditions. Mann-Whitney test ns, $p > 0.05$; ** $p = 0.0043$; * $p = 0.0357$

C Distribution of the progenitor (pRb positive cells, red), neurons (HuCD positive cells green) and undefined cells (double pRn/HuCD negative, gray) at E4 in control, single Ccnd1, single Cdkn1c and double Ccnd1/Cdkn1c shRNA conditions. Mann-Whitney test: ns, $p > 0.05$; ** $p = 0.0043$; * $p = 0.0303$

D Diagram indicating the percentage of P-P, P-N, and N-N clones in control, single Ccnd1, single Cdkn1c and double Ccnd1/Cdkn1c shRNA conditions. P-P, P-N, and N-N stand for divisions producing two progenitors, one progenitor and one neuron, or two neurons, respectively. The distribution of P-P, P-N and N-N clones between control and shRNA was compared using a Chi2 test, ns, $p > 0.05$; **** $p < 0.0001$; ** ; $p = 0,0011$

Hae: hours after electroporation

Mida et al., Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 5: Decreased mRNA CCND1C expression in chick embryonic neural tube one day after shCnd1 electroporation.

In situ hybridization of Ccnd1 probe on transverse cryosection of chick embryonic neural tube followed by anti-GFP immunostaining to reveal electroporated cells. Scale bar: 50 μ m

REFERENCES

- Andersen, J., Thom, N., Shadrach, J.L., Chen, X., Onesto, M.M., Amin, N.D., Yoon, S.-J., Li, L., Greenleaf, W.J., Müller, F., Paşca, A.M., Kaltschmidt, J.A., Paşca, S.P., 2023. Single-cell transcriptomic landscape of the developing human spinal cord. *Nat. Neurosci.* 26, 902–914. <https://doi.org/10.1038/s41593-023-01311-w>
- Aprea, J., Prenninger, S., Dori, M., Ghosh, T., Monasor, L.S., Wessendorf, E., Zocher, S., Massalini, S., Alexopoulou, D., Lesche, M., Dahl, A., Groszer, M., Hiller, M., Calegari, F., 2013. Transcriptome sequencing during mouse brain development identifies long non-coding RNAs functionally involved in neurogenic commitment. *EMBO J.* 32, 3145–3160. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.245>
- 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>
- Baek, C., Freem, L., Goïame, R., Sang, H., Morin, X., Tozer, S., 2018a. Mib1 prevents Notch Cis-inhibition to defer differentiation and preserve neuroepithelial integrity during neural delamination. *PLoS Biol.* 16, e2004162. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004162>
- Blomen, V.A., Boonstra, J., 2007. Cell fate determination during G1 phase progression. *Cell Mol Life Sci.* <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7271-z>.
- 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* 3;7:e32937. <https://doi.org/10.7554/eLife.32937>.
- 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* 13;25(28):6533–8. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0778-05.2005>.
- Calegari, F., Huttner, W.B., 2003. An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. *J Cell Sci* 15;116(Pt 24):4947-55. <https://doi.org/10.1242/jcs.00825>.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., Zhang, F., 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Creff, J., Besson, A., 2020. Functional Versatility of the CDK Inhibitor p57Kip2. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 584590. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.584590>
- Das, R.M., Van Hateren, N.J., Howell, G.R., Farrell, E.R., Bangs, F.K., Porteous, V.C., Manning, E.M., McGrew, M.J., Ohyama, K., Sacco, M.A., Halley, P.A., Sang, H.M., Storey, K.G.,

- Placzek, M., Tickle, C., Nair, V.K., Wilson, S.A., 2006. A robust system for RNA interference in the chicken using a modified microRNA operon. *Dev. Biol.* 294, 554–563. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.02.020>
- Delile, J., Rayon, T., Melchionda, M., Edwards, A., Briscoe, J., Sagner, A., 2019a. Single cell transcriptomics reveals spatial and temporal dynamics of gene expression in the developing mouse spinal cord. *Development* dev.173807. <https://doi.org/10.1242/dev.173807>
- Edelstein, A., Amodaj, N., Hoover, K., Vale, R., Stuurman, N., 2010. Computer control of microscopes using μ Manager. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Chapter 14, Unit14.20. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1420s92>
- Fish, J.L., Kosodo, Y., Enard, W., Pääbo, S., Huttner, W.B., 2006. Aspm specifically maintains symmetric proliferative divisions of neuroepithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 10438–10443. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604066103>
- Fujita, S., 1962. Kinetics of cellular proliferation. *Exp Cell Res.*
- Gandhi, S., Piacentino, M.L., Vieceli, F.M., Bronner, M.E., 2017. Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing for loss-of-function in the early chick embryo. *Dev. Biol.* 432, 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.08.036>
- Gao, P., Postiglione, M.P., Krieger, T.G., Hernandez, L., Wang, C., Han, Z., Streicher, C., Papusheva, E., Insolera, R., Chugh, K., Kodish, O., Huang, K., Simons, B.D., Luo, L., Hippenmeyer, S., Shi, S.-H., 2014. Deterministic Progenitor Behavior and Unitary Production of Neurons in the Neocortex. *Cell* 159, 775–788. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.027>
- Gui, H., Li, S., Matisse, M.P., 2007. A cell-autonomous requirement for Cip/Kip Cyclin-kinase inhibitors in regulating the timing of neuronal cell cycle exit but not differentiation in the developing spinal cord. *Dev. Biol.* 301, 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.10.035>
- Hamburger, V., Hamilton, H.L., 1992. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 195, 231–272. <https://doi.org/10.1002/aja.1001950404>
- Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W., Huttner, W.B., 2004a. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: A major site of neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 3196–3201. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308600100>
- Hörster, H., Garthe, A., Walker, T.L., Ichwan, M., Steiner, B., Khan, M.A., Lie, D.C., Nicola, Z., Ramirez-Rodriguez, G., Kempermann, G., 2017. p27kip1 Is Required for Functionally Relevant Adult Hippocampal Neurogenesis in Mice. *Stem Cells Dayt. Ohio* 35, 787–799. <https://doi.org/10.1002/stem.2536>

- Iacopetti, P., Michelini, M., Stuckmann, I., Oback, B., Aaku-Saraste, E., Huttner, W.B., 1999. Expression of the antiproliferative gene TIS21 at the onset of neurogenesis identifies single neuroepithelial cells that switch from proliferative to neuron-generating division. *Proc Natl Acad Sci U S A* 13;96(8):4639-44. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.8.4639>.
- 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>
- Kosodo, Y., Suetsugu, T., Suda, M., Mimori-Kiyosue, Y., Toida, K., Baba, S.A., Kimura, A., Matsuzaki, F., 2011. Regulation of interkinetic nuclear migration by cell cycle-coupled active and passive mechanisms in the developing brain. *EMBO J.* 30, 1690–1704. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.81>
- Kowalczyk, M.S., Tirosh, I., Heckl, D., Rao, T.N., Dixit, A., Haas, B.J., Schneider, R.K., Wagers, A.J., Ebert, B.L., Regev, A., 2015. Single-cell RNA-seq reveals changes in cell cycle and differentiation programs upon aging of hematopoietic stem cells. *Genome Res.* 25, 1860–1872. <https://doi.org/10.1101/gr.192237.115>
- Lacomme, M., Liaubet, L., Pituello, F., Bel-Vialar, S., 2012. NEUROG2 Drives Cell Cycle Exit of Neuronal Precursors by Specifically Repressing a Subset of Cyclins Acting at the G1 and S Phases of the Cell Cycle. *Mol. Cell. Biol.* 32, 2596–2607. <https://doi.org/10.1128/MCB.06745-11>
- 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* 4;5(3):320-31. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.026>.
- 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. *J. Cell Biol.* 204, 591–605. <https://doi.org/10.1083/jcb.201307031>
- Lee, M.H., Reynisdóttir, I., Massagué, J., 1995. Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* 15;9(6):639-49. <https://doi.org/10.1101/gad.9.6.639>.
- Lehmann, N., Perrin, S., Wallon, C., Bauquet, X., Deshaies, V., Firmo, C., Du, R., Berthelier, C., Hernandez, C., Michaud, C., Thieffry, D., Crom, S.L., Thomas-Chollier, M., Jourdain, L., 2021. Eoulsan 2: an efficient workflow manager for reproducible bulk, long-read and single-cell transcriptomics analyses. <https://doi.org/10.1101/2021.10.13.464219>
- Li, X., Andrusivova, Z., Czarnewski, P., Langseth, C.M., Andersson, A., Liu, Y., Gyllborg, D., Braun, E., Larsson, L., Hu, L., Alekseenko, Z., Lee, H., Avenel, C., Kallner, H.K., Åkesson, E., Adameyko, I., Nilsson, M., Linnarsson, S., Lundeberg, J., Sundström, E., 2023. Profil-

- ing spatiotemporal gene expression of the developing human spinal cord and implications for ependymoma origin. *Nat. Neurosci.* 26, 891–901. <https://doi.org/10.1038/s41593-023-01312-9>
- Liau, E.S., Jin, S., Chen, Y.-C., Liu, W.-S., Calon, M., Nedelec, S., Nie, Q., Chen, J.-A., 2023. Single-cell transcriptomic analysis reveals diversity within mammalian spinal motor neurons. *Nat. Commun.* 14, 46. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35574-x>
- 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. *Dev. Biol.* 273, 195–209. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.05.031>
- Lukaszewicz, A.I., Anderson, D.J., 2011a. 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>
- 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>
- Marthiens, V., French-Constant, C., 2009. Adherens junction domains are split by asymmetric division of embryonic neural stem cells. *EMBO Rep.* 10, 515–520. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.36>
- Matsuoka, S., Edwards, M.C., Bai, C., Parker, S., Zhang, P., Baldini, A., Harper, J.W., Elledge, S.J., 1995. p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev.* 9, 650–662. <https://doi.org/10.1101/gad.9.6.650>
- 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>
- Moreau, M.X., Saillour, Y., Cwetsch, A.W., Pierani, A., Causeret, F., 2021. Single-cell transcriptomics of the early developing mouse cerebral cortex disentangle the spatial and temporal components of neuronal fate acquisition. *Development* 148, dev197962. <https://doi.org/10.1242/dev.197962>
- Morin, X., Bellaïche, Y., 2011. Mitotic Spindle Orientation in Asymmetric and Symmetric Cell Divisions during Animal Development. *Dev. Cell* 21, 102–119. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.012>
- Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Dammerman, R.S., Kriegstein, A.R., 2001. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409, 714–720. <https://doi.org/10.1038/35055553>

- Noctor, S.C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L., Kriegstein, A.R., 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat. Neurosci.* 7, 136–144. <https://doi.org/10.1038/nn1172>
- Nowakowski, R.S., Lewin, S.B., Miller, M.W., 1989. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J. Neurocytol.* 18, 311–318. <https://doi.org/10.1007/BF01190834>
- Peyre, E., Jaouen, F., Saadaoui, M., Haren, L., Merdes, A., Durbec, P., Morin, X., 2011. A lateral belt of cortical LGN and NuMA guides mitotic spindle movements and planar division in neuroepithelial cells. *J. Cell Biol.* 193, 141–154. <https://doi.org/10.1083/jcb.201101039>
- Peyre, E., Morin, X., 2012. An oblique view on the role of spindle orientation in vertebrate neurogenesis. *Dev. Growth Differ.* 54, 287–305. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2012.01350.x>
- Pickering, J., Chinnaiya, K., Towers, M., 2019. An autoregulatory cell cycle timer integrates growth and specification in chick wing digit development. *eLife* 8, e47625. <https://doi.org/10.7554/eLife.47625>
- 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.* 106, 21924–21929. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909894106>
- Pinto, L., Mader, M.T., Irmeler, M., Gentilini, M., Santoni, F., Drechsel, D., Blum, R., Stahl, R., Bulfone, A., Malatesta, P., Beckers, J., Götz, M., 2008. Prospective isolation of functionally distinct radial glial subtypes—Lineage and transcriptome analysis. *Mol. Cell. Neurosci.* 38, 15–42. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.01.012>
- Rayon, T., Maizels, R.J., Barrington, C., Briscoe, J., 2021. Single-cell transcriptome profiling of the human developing spinal cord reveals a conserved genetic programme with human-specific features. *Dev. Camb. Engl.* 148, dev199711. <https://doi.org/10.1242/dev.199711>
- Saade, M., Gonzalez-Gobartt, E., Escalona, R., Usieto, S., Martí, E., 2017. Shh-mediated centrosomal recruitment of PKA promotes symmetric proliferative neuroepithelial cell division. *Nat. Cell Biol.* 19, 493–503. <https://doi.org/10.1038/ncb3512>
- 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 Rep* 15;4(3):492-503. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.038>
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>

- Scott, K., O'Rourke, R., Winkler, C.C., Kearns, C.A., Appel, B., 2021. Temporal single-cell transcriptomes of zebrafish spinal cord pMN progenitors reveal distinct neuronal and glial progenitor populations. *Dev. Biol.* 479, 37–50. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2021.07.010>
- Smith, J.L., Schoenwolf, G.C., 1987. Cell cycle and neuroepithelial cell shape during bending of the chick neural plate. *Anat Rec* Jun;218(2):196-206. <https://doi.org/10.1002/ar.1092180215>.
- Sunchu, B., Cabernard, C., 2020. Principles and mechanisms of asymmetric cell division. *Development* 147, dev167650. <https://doi.org/10.1242/dev.167650>
- Takahashi, T., Nowakowski, R.S., VS, C., Jr, 1995. The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. *J Neurosci.* <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-09-06046.1995>.
- 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>
- Telley, L., Govindan, S., Prados, J., Stevant, I., Nef, S., Dermitzakis, E., Dayer, A., Jabaudon, D., 2016. Sequential transcriptional waves direct the differentiation of newborn neurons in the mouse neocortex. *Science* 351, 1443–1446. <https://doi.org/10.1126/science.aad8361>
- 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>
- Tsunekawa, Y., Britto, J.M., Takahashi, M., Polleux, F., Tan, S.-S., Osumi, N., 2012. Cyclin D2 in the basal process of neural progenitors is linked to non-equivalent cell fates: Cyclin D2 inheritance is associated with asymmetric cell fate. *EMBO J.* 31, 1879–1892. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.43>
- Tury, A., Mairet-Coello, G., DiCicco-Bloom, E., 2011. The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p57Kip2 Regulates Cell Cycle Exit, Differentiation, and Migration of Embryonic Cerebral Cortical Precursors. *Cereb. Cortex* 21, 1840–1856. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq254>

Chapitre VI : Perspectives

Mes travaux, présentés dans ce manuscrit, décrivent l'identification de CDKN1C/p57Kip2 comme un régulateur potentiel de la transition d'un MDD symétrique prolifératif vers asymétrique neurogénique dans les progéniteurs neuraux. A l'échelle transcriptomique, la production de données transcriptomiques dans l'embryon de poulet et la ré analyse de données transcriptomiques de tubes neuraux (Delile et al., 2019b) ont permis de révéler une expression progressive de CDKN1C dans la population progénitrice au cours de la neurogenèse, similaire à celle de Tis21. Ensuite, nos expériences de validation fonctionnelle, en particulier à l'échelle cellulaire, ont permis de montrer un rôle potentiel de CDKN1C/p57Kip2 sur la régulation des modes de division utilisés par les progéniteurs. Ainsi, CDKN1C/p57Kip2 interviendrait dans la production de neurones à travers deux mécanismes : 1) à fort niveau d'expression, en encourageant la sortie de cycle cellulaire des progéniteurs et leur différenciation, et 2) à niveau plus faible, sur le changement des modes de division des progéniteurs, de symétrique prolifératif vers asymétrique neurogénique.

Cependant, nous souhaiterions compléter ce travail en étudiant l'expression de CDKN1C et de sa protéine p57Kip2 à l'échelle cellulaire dans les progéniteurs. De plus nous souhaiterions répondre à la question suivante : CDKN1C est-il suffisant pour changer les modes de divisions ? J'aborderai successivement les stratégies expérimentales envisagées et/ou déjà en cours dans le laboratoire pour y répondre. Nous souhaiterions étendre l'étude de l'expression de Tis21 aux différentes expériences de diminution d'expression réalisées au cours de mes travaux de thèse, en particulier celles de double diminution CDKN1C/CCND1, ce qui conforterait nos résultats d'analyse clonales dans ces conditions également.

Partie A – Expression de CDKN1C/p57 dans les progéniteurs

A travers nos analyses transcriptomiques, nous observons au cours de la neurogenèse une expression progressive de CDKN1C dans des cellules progénitrices exprimant le gène marqueur Tis21. Nous avons également observé par HIS une expression progressive de CDKN1C au cours de la neurogenèse. Dès E3, lorsque les premiers neurones sont produits dans la région dorsale du tube neural de poulet, son ARNm est exprimé à faible niveau dans la zone ventriculaire selon un patron d'expression « poivre et sel », suggérant une expression dans des progéniteurs à faible niveau. Nous envisageons de compléter cette analyse par une technique d'HIS plus sensible, permettant une résolution du signal à l'échelle cellulaire, couplée à des

immunomarquages fluorescents pour des marqueurs de progéniteurs. Dans ce cadre, la technique de smFISH (single molecule Fluorescent ISH), qui permet une évaluation de la quantité d'ARNm à l'échelle de la cellule unique devrait permettre d'apporter des éléments de réponse à cette question.

Dans le but de compléter et valider notre hypothèse d'une expression progressive de CDKN1C dans les progéniteurs, nous souhaitons également étendre notre approche et étudier l'expression de la protéine p57Kip2 à l'échelle cellulaire dans notre modèle, afin de s'affranchir d'une discordance entre expression de l'ARNm et protéine liée à une régulation post-traductionnelle. Dans d'autres contextes, il a été montré une concordance entre les patrons d'expression de l'ARNm et de la protéine à l'échelle tissulaire, mais pas cellulaire (tube neural murin - Gui et al., 2007). Ainsi, les données de la littérature provenant d'études sur la souris suggèrent que la régulation post-transcriptionnelle de p57Kip2 est moins importante que pour les autres membres de la famille Cip/Kip. Cependant, l'absence d'anticorps fonctionnels dirigé contre la protéine p57Kip2 chez le poulet rend cette analyse plus difficile.

Au sein du laboratoire, nous avons développé dans le tube neural spinal de poulet une stratégie de recombinaison homologue somatique basée sur le système CRISPR/Cas9. Cette technique permet d'insérer un rapporteur fluorescent ou un tag moléculaire (HA, Flag, Myc) dans la séquence génomique d'un gène d'intérêt. Une fois inséré, l'expression de ce rapporteur ou du tag, similaire à celle du gène endogène, permet notamment d'identifier les cellules exprimant la protéine d'intérêt, lors d'analyses en live (rapporteur fluorescent) ou sur tissu fixé (rapporteur fluorescent et tags moléculaires). Pour mettre en place cette stratégie, il est nécessaire d'obtenir la séquence codante du gène d'intérêt, afin de dessiner des matrices de recombinaison homologues permettant l'insertion de rapporteur et/ou tag. On utilise typiquement pour cette recombinaison des matrices sous forme de plasmide (ADN double brin circulaire) basées sur des bras d'homologie assez longs (de 500pb à 1Kb chacun), et le couple Cas9 / RNA guide est également porté par un plasmide.

Cette stratégie, déjà effective pour d'autres loci (voir par exemple dans la Figure Supplémentaire 4 du manuscrit les résultats d'un Knock-in somatique au locus Tis21), s'avère plus compliquée pour CDKN1C. En effet, la séquence génomique de CDKN1C est extrêmement riche en nucléotides guanines (G) et cytosines (C), ce qui rend son extraction par PCR ou sa synthèse compliquée. Pour preuve, nous avons dû modifier la séquence nucléotidique (afin de diminuer la quantité de G/ C) de la séquence codante de CDKN1C pour faciliter sa synthèse et produire le vecteur de surexpression (cf. ci-dessous). Ceci produit cependant certaines difficultés pour construire des matrices de recombinaison homologue dans le cadre d'une stratégie de Knock-In.

Nous avons décidé de développer une stratégie alternative basée elle aussi sur le système CRISPR/Cas9. Ici, la matrice de recombinaison classique est remplacée par un petit oligonucléotide simple-brin d'environ 200 paires de bases, présentant 1) des extrémités homologues aux séquences retrouvées autour des sites de coupure choisis (gRNA spécifique) de la Cas9 au locus CDKN1C, et 2) la séquence d'un tag moléculaire HA en son centre. Ainsi, la recombinaison homologue post-coupure par la protéine Cas9 entraîne l'insertion de ce tag HA dans la séquence nucléotidique de CDKN1C. L'expression de la protéine p57Kip2 peut ensuite être détectée via l'utilisation d'un anticorps dirigé contre le tag HA. Cette stratégie a déjà été utilisée avec succès, par exemple, chez le poisson-zèbre (Ranawakage et al., 2021),

mais également dans le laboratoire avec l'insertion de la séquence d'un tag HA dans la séquence nucléotidique du gène Pax7 ou de tags GFP11 au locus ACTB. Cette stratégie fonctionne, mais nous avons néanmoins observé qu'elle est globalement moins efficace que la version « tout plasmide » décrite plus haut : lorsque la matrice oligonucléotidique est introduite avec un plasmide portant les séquences de Cas9 et du RNA guide, le temps nécessaire à la synthèse du complexe Cas9/gRNA associé à une possible dégradation rapide de la matrice simple brin pourrait limiter l'efficacité du processus ; et dans une approche différente, basée sur l'introduction simultanée d'un complexe ribonucléoprotéique Cas9/gRNA synthétisé in vitro et de la matrice oligonucléotidique portant le tag, nous avons observé que la qualité d'électroporation est généralement assez faible. La protéine Cas9 étant légèrement chargée positivement, alors que l'ARN et l'ADN sont négatifs, la méthode d'électroporation in ovo basée sur un transport des constituants le long du champ électrique est sans doute suboptimale pour délivrer tous les composants dans la même moitié du tube neural.

Concernant Cdkn1c, de premières expériences basées sur l'électroporation d'un couple ribonucléoprotéique Cas9/gRNA et de l'oligonucléotide ont déjà été réalisées. Elles n'ont malheureusement pas été couronnées de succès, sans doute en partie pour les raisons évoquées ci-dessus, potentiellement associées à d'autres facteurs liés au locus cdkn1c lui-même ou à la qualité des guide ARN choisis. Dans un premier temps, nous envisageons de remplacer le couple ribonucléoprotéique Cas9/gRNA par un vecteur codant pour la protéine Cas9. Si cette stratégie ne nous donne pas satisfaction, nous optimiserons les conditions de PCR pour extraire la séquence génomique endogène et les régions proches en amont et aval de CDKN1C, et pouvoir développer une approche basée sur un vecteur de recombinaison homologue conventionnel.

Partie B – Analyse clonale du destin des cellules filles en condition de surexpression « contrôlée » de CDKN1C

La diminution de l'expression de CDKN1C entraîne à l'échelle cellulaire un bouleversement des modes de division vers le mode symétrique prolifératif. Ainsi, nous émettons l'hypothèse qu'une augmentation de l'expression de CDKN1C pourrait avoir l'effet inverse et encourager l'utilisation du mode asymétrique prolifératif.

Des expériences de surexpression « classique » de CDKN1C ont déjà été réalisées dans la région spinale de l'embryon de poulet (Gui et al., 2007) ainsi que dans des cultures de progéniteurs corticaux issus de cerveaux de rats (Tury et al., 2011) et ont montré une sortie du cycle cellulaire des progéniteurs neuraux. Dans ce contexte, nous faisons l'hypothèse que l'expression massive de CDKN1C pousse rapidement et directement les progéniteurs vers la sortie de cycle, ce que nous ne souhaitons absolument pas reproduire.

Pour tester notre hypothèse, nous développons actuellement une stratégie expérimentale permettant une surexpression plus « mesurée » de CDKN1C qui mimerait dans des progéniteurs au stade prolifératif les niveaux observés dans les progéniteurs neurogéniques. Notre objectif est de restreindre la durée de surexpression de CDKN1C à la cellule mère avant la division. Pour ceci, il nous faut surexprimer CDKN1C pendant une durée courte, n'excédant pas la durée de la phase G1 et S de la cellule mère progénitrice, afin de nous assurer d'une absence d'expression de la construction dans les cellules filles post division.

Notre stratégie repose donc sur une surexpression de CDKN1C sous le contrôle d'un promoteur TRE et d'une construction Tet-OFF, qui donc peut éteindre cette surexpression par administration de doxycycline dans les embryons. Notre objectif est d'exprimer modérément CDKN1C dans des progéniteurs, puis d'éteindre cette expression artificielle avant que ces derniers ne se divisent. Ensuite nous évaluerons l'identité des cellules filles issues de ces divisions, et déduirons rétrospectivement le mode de division utilisé par les cellules mères.

Pratiquement, cette stratégie se repose sur une construction contenant :

- 1) La version aviaire de la séquence codante de CDKN1C (modifiée pour pouvoir être synthétisée), fusionnée avec plusieurs tags moléculaires Myc permettant la détection de la protéine par immunomarquage.
- 2) Un rapporteur H2B-Venus pour détecter les cellules exprimant la protéine p57Kip2 artificielle. Ce rapporteur est séparé de la séquence CDKN1C par une séquence p2a, permettant une expression séparée des deux protéines depuis le même vecteur. Ceci permet notamment de pouvoir suivre les cellules « pulsées » pour CDKN1C même après l'arrêt du système, grâce à la stabilité de la protéine H2B-Venus.
- 3) Un promoteur TRE, qui par co-électroporation avec une construction Tet-OFF est actif par défaut, mais dont l'expression est éteinte par l'administration de Doxycycline (**Figure 29**).

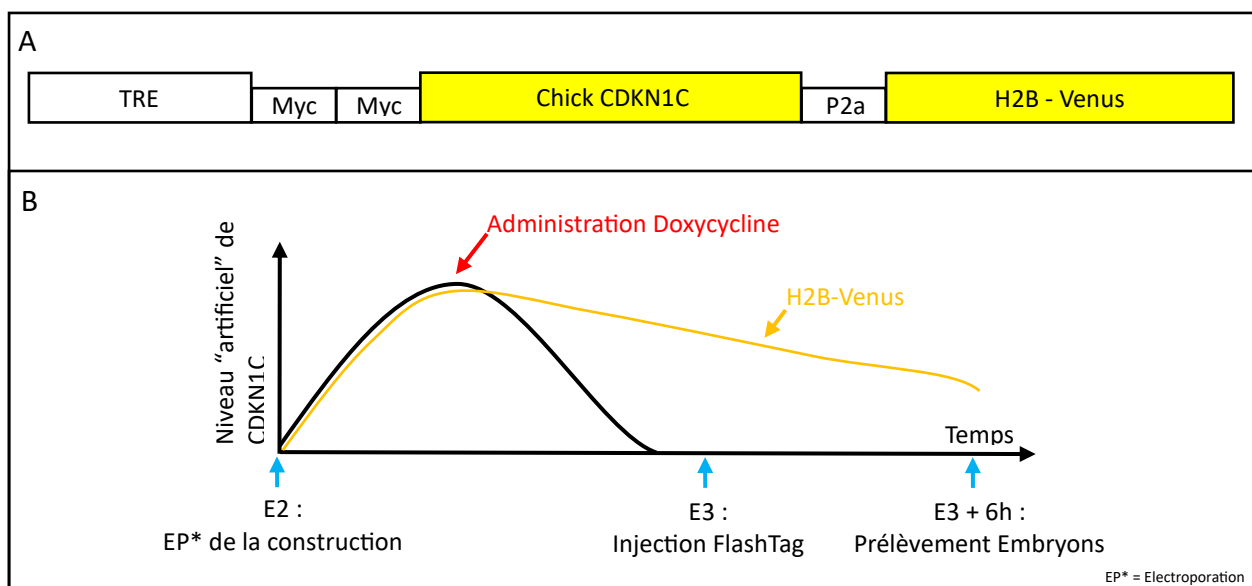


Figure 29 : Stratégie de surexpression contrôlée de CDKN1C et analyse clonale du destin des cellules filles. A : représentation schématique de la construction utilisée pour cette approche expérimentale. B : représentation schématique de l'approche envisagée pour étudier l'identité de paires de cellules filles issues de cellules mères « pulsées » pour l'expression de CDKN1C.

Ainsi, les embryons seront électroporés au stade E2, puis la Doxycycline sera administrée, afin d'arrêter l'expression artificielle de CDKN1C avant le stade E3. A ce stade, nous injecterons le FlashTag dans les embryons, puis attendrons 6 heures avant de collecter les embryons (**Figure 1**). Un immunomarquage dirigé contre pRb permettra ensuite de déterminer l'identité des cellules filles (progéniteur VS neurone) dans les cellules H2B-Venus-positives/Tag-Myc-négatives. Nous espérons aussi mettre en lumière un éventuel changement du mode de division dans cette condition de surexpression contrôlée de CDKN1C, en faveur des divisions neurogéniques cette-fois.

Actuellement, la construction est disponible et des premières expériences sont en cours pour déterminer les timings d'administration et les concentrations de Doxycycline à utiliser.

Partie C – CDKN1C et modes de division : Evaluation de l'expression de Tis21

Nous avons complété notre approche du rôle de CDKN1C sur la régulation des modes de division en analyse clonale par l'étude de l'expression de Tis21 dans les cellules dans lesquelles l'expression de CDKN1C a été diminuée. Nous avons fait le pari que CDKN1C se situe en amont de Tis21 dans les progéniteurs se divisant de façon asymétrique. La diminution de CDKN1C devrait donc limiter l'expression de Tis21 dans les progéniteurs. Pour étudier l'expression endogène de ce gène, nous avons utilisé une stratégie de Knock-In somatique d'un rapporteur fluorescent et de Tag Myc au locus Tis21. Nos premiers résultats ont montré une tendance à la baisse du nombre de cellules exprimant ce gène dans une population de progéniteurs (marqués par Sox2) dans la condition CDKN1C shRNA par rapport au contrôle. Nous compléterons ces expériences en marquant les progéniteurs cette fois-ci avec pRb afin de ne pas tenir compte des neurones immatures exprimant Tis21.

Cette même approche sera mise en place dans le cadre des expériences de sauvetage. Ceci pourrait ajouter un argument supplémentaire aux modifications des fréquences des modes de division observées avec les analyses clonales de paires de cellules filles. Brièvement, nous nous attendons à retrouver une proportion de progéniteurs exprimant Tis21 similaires dans les conditions CDKN1C + CCND1 shRNA et contrôle. Ceci conforterait un rôle pré-mitotique de CDKN1C dans la régulation des modes de division.

Ainsi, la combinaison de ces deux résultats, obtenus par 1) une approche d'analyse clonale de paires de cellules filles, dont les identités sont déterminées quelques heures après la mitose et 2) la dynamique d'expression de Tis21, un marqueur dont l'expression débute lors du cycle cellulaire précédent la première division neurogénique, permettra de suggérer fortement un rôle de CDKN1C dans la régulation de la transition des modes de division lors de la neurogenèse.

Pour conclure, nos travaux identifient un nouveau rôle de p57Kip2 dans la production de neurones à travers un effet sur le MDD des progéniteurs neuronaux. Également, nos analyses transcriptomiques ont permis l'identification d'autres gènes candidats, dont la validation fonctionnelle permettra de mettre en avant (ou non) un rôle de ces gènes dans la régulation des MDD. Je reviendrai sur ces autres gènes candidats dans le chapitre Discussion.

Chapitre VII : Discussion

Dans cette étude, nous avons identifié plusieurs gènes candidats à la régulation de la transition d'un MDD symétrique prolifératif vers asymétrique neurogénique au cours de la neurogenèse embryonnaire des vertébrés. Ces candidats ont émergé de l'analyse de données transcriptomiques de tubes neuraux spinaux embryonnaires de poulet et de la ré-analyse de données transcriptomiques de souris (Delile et al., 2019a).

Nous avons focalisé notre attention sur le gène CDKN1C, dont l'expression progressive au cours de la neurogenèse embryonnaire, et similaire à celle de Tis21, nous a conduit à émettre l'hypothèse d'un rôle séquentiel de ce gène en fonction de son niveau d'expression : à faibles niveaux, il jouerait un rôle sur la transition d'un mode de division symétrique prolifératif vers asymétrique neurogénique ; et à plus fort niveau, il favoriserait une sortie de cycle et la différenciation.

A l'échelle cellulaire, nous observons que la diminution de l'expression de CDKN1C entraîne un changement des proportions des modes de division utilisés par les progéniteurs neuraux en faveur du mode symétrique prolifératif. Ainsi, nos résultats revisitent le rôle de CDKN1C/p57Kip2 dans la production neuronale, et mettent en lumière un rôle jusque-là méconnu sur le contrôle de la transition des MDD.

Dans les prochains paragraphes, je reviendrai sur les résultats de nos analyses transcriptomiques pour discuter de l'émergence de CDKN1C en tant que gène candidat, son expression progressive, ainsi que de potentiels mécanismes de régulation de son expression. J'aborderai également de manière succincte les autres gènes candidats identifiés. Dans un second temps, je reviendrai sur le rôle de CDKN1C dans la transition neurogénique, premièrement à l'échelle tissulaire, puis au niveau cellulaire. Finalement, j'aborderai plus en détails le rôle de CDKN1C dans la régulation des modes de divisions.

Partie A : Analyses transcriptomiques

A.1 – Emergence de CDKN1C en tant que gène candidat

A.1.1 – Analyses transcriptomiques : la combinaison de plusieurs approches

L'identification du programme transcriptionnel impliqué dans la régulation de la transition d'un MDD symétrique prolifératif vers asymétrique neurogénique par analyse de données sc-RNA seq a nécessité plusieurs approches. En effet les analyses non supervisées sur les données produites par Delile et collaborateurs et sur nos propres données n'ont pas permis, en première intention, de faire émerger une signature transcriptionnelle différente entre populations progénitrices distinguées selon leur MDD (symétrique prolifératif vs asymétrique neurogénique). Certains facteurs confondants (tels que le cycle cellulaire, le patterning dorso-ventral de la moelle épinière ou encore la différence de sexe entre embryons) exerçaient un poids très fort, empêchant l'émergence de cette signature

Nous avons donc développé des approches supervisées, la première reposant sur l'attribution d'un score Progéniteurs (P) et Neurones (N) à chaque cellule, basé sur l'expression de plusieurs marqueurs spécifiques de ces populations. Cette même approche visant à séparer les P et N a également été utilisée par Delile et collaborateurs, mais l'identification de ces populations ne reposait que sur un seul gène marqueur par population (Sox2 – progéniteurs / Tubb3 - neurones). Ainsi, notre score intégrant de multiples marqueurs permet une meilleure caractérisation et observation de l'évolution d'un état de progéniteur vers un état de neurones. Par ailleurs, cette approche nous a permis, en ne conservant que les cellules avec les scores P les plus élevés et N les plus faibles, de faire émerger pour la première fois un cluster de cellules Tis21-positives (**Figure 29**). Malgré cela, notre approche restait imparfaite car les cellules étaient toujours principalement séparées selon le facteur patterning.

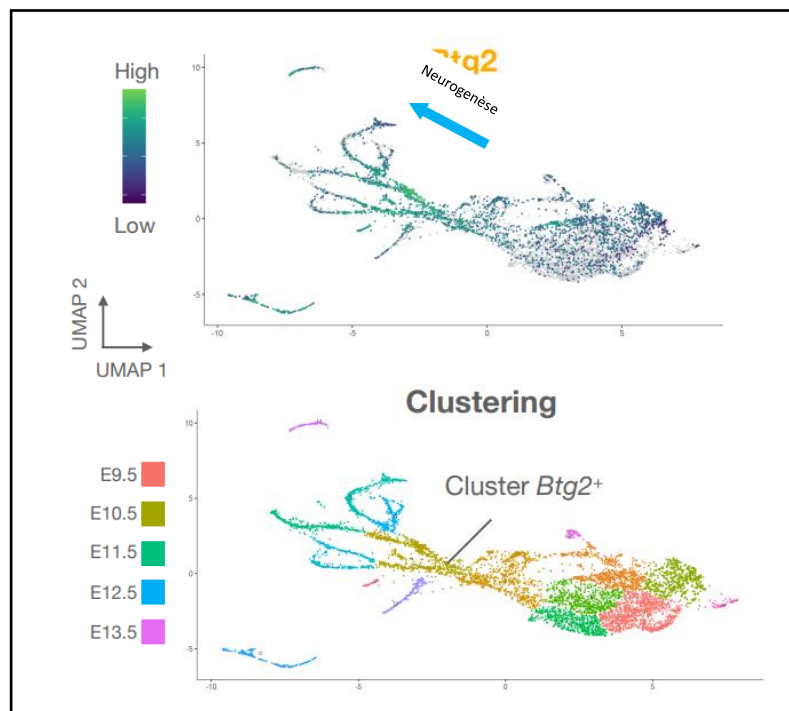


Figure 30 : Représentations UMAP des données de Delile et collaborateurs, filtrées selon notre score Progéniteurs (P) VS Neurones (N). Après filtrage des cellules avec les scores N les plus élevées, 7441 cellules ont été conservées. L'axe de progression de la neurogenèse est indiqué par la flèche bleue sur le graphe du haut. Le graphe du bas permet d'apprécier l'émergence d'un cluster de cellules positives pour l'expression de Tis21. – Adapté de Lehmann., 2021

Nous avons par la suite complété cette première approche par deux autres, mises en place de façon parallèle.

La première consistait en une approche classiquement utilisée pour faire émerger des séquences/trajectoires développementales : une analyse pseudo-temporelle de l'expression génique. Après analyse, les gènes présentant des profils d'expression pseudo-temporels similaires sont regroupés, ce qui nous a permis d'identifier des gènes dont les profils sont similaires à celui de notre gène marqueur de transition Tis21.

La seconde approche a consisté en une stratégie de « pseudo-bulk ». En effet, nous nous sommes appuyés, dans nos données produites chez le poulet mais également dans les données réanalysées de souris, sur l'expression de Tis21 pour discriminer deux populations : Tis21-positif (progéniteur neurogénique) VS Tis21-négatif (progéniteur prolifératif). En plus, dans les données de Delile et collaborateurs qui comprennent de nombreuses cellules, nous avons réalisé cette séparation Tis21-positif VS négatif dans les 13 domaines de patterning du tube neural, puis nous avons comparé les gènes fréquemment observés différemment entre ces deux populations. L'absence d'émergence claire d'une signature transcriptionnelle selon le MDD nous a forcé à utiliser cette stratégie, avec néanmoins la résolution du single-cell. Cette approche a un défaut : la relativement faible profondeur de séquençage par cellule obtenue avec des analyses de scRNAseq utilisant la méthode 10x Genomics, et le fait que Tis21 est globalement un gène faiblement exprimé, même à son pic d'expression, implique que Tis21 ne sera pas forcément détecté par cette approche dans toutes les cellules qui l'expriment, et qu'elles seront donc classées dans la population Tis21-négative, ce qui amoindrit la sensibilité de cette analyse.

Enfin, nous avons comparé les résultats obtenus à l'aide de nos deux stratégies afin d'émettre une première liste de gènes candidats, basée sur une expression différentielle entre populations Tis21-positif VS négatif et une expression similaire à celle de Tis21 au cours du pseudo-temps. Au sein de cette liste a émergé notre gène d'intérêt : CDKN1C

A.1.2 – Expression progressive de CDKN1C

Au sein de nos données transcriptomiques réanalysées, l'expression de CDKN1C est régulée à la hausse dans les cellules Tis21-positives et dans de nombreux domaines du tube neural. De plus, son profil d'expression pseudo-temporel ressemble assez fortement à celui de Tis21 (**Figure 32**). De façon très intéressante, nous observons une expression progressive de ce gène, avec une faible expression dans les progéniteurs prolifératifs qui augmente progressivement et atteint son maximum dans des jeunes neurones en train de quitter le cycle, avant de diminuer puis de s'éteindre dans les neurones matures. A travers nos expériences d'HIS, nous observons également une expression progressive de CDKN1C dans une partie de la population progénitrice à l'échelle tissulaire, et une absence d'expression dans les neurones matures. Ainsi à l'échelle tissulaire, nos résultats d'HIS sont en accord avec nos observations transcriptomiques. A l'échelle cellulaire, il est pour le moment difficile de conclure quant à l'existence de progéniteurs présentant des niveaux d'expression différents de CDKN1C, en raison des limitations de sensibilité de la technique d'HIS, bien que nos observations suggèrent un tel phénomène.

Une autre étude a caractérisé l'évolution de l'expression de l'ARNm de CDKN1C au cours de la neurogenèse embryonnaire, mais dans le cortex de rat (Tury et al., 2011). Tury et collaborateurs ont mesuré, sur des cortex entiers dissociés entre les stades E12.5 et E20.5 le niveau d'expression de CDKN1C par qRT-PCR. Ils ont montré des variations de l'expression de l'ARNm de CDKN1C entre les différents stades analysés (**Figure 31**). Le niveau d'expression de CDKN1C est à son maximum à E12.5, puis évolue en dents de scie au cours des stades ultérieurs. Ainsi, leurs résultats contrastent fortement avec les nôtres, mais plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette différence.

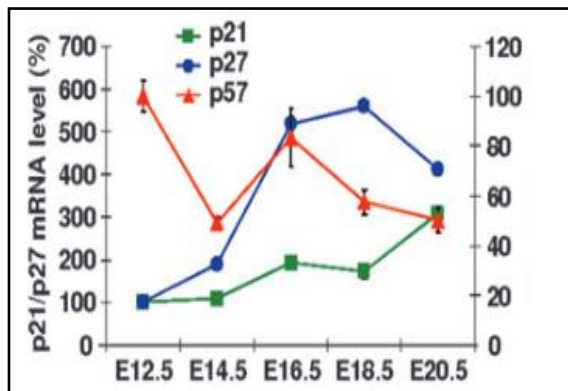


Figure 31 : Patrons d'expression de CDKN1C/p57Kip2 au cours de la neurogenèse embryonnaire corticale. Patrons temporels de l'expression des différents gènes de la famille Cip/Kip dans le cortex du rat en développement, obtenus par Q-RT-PCR. p21 = CDKN1A, p27 = CDKN1B, p57 = CDKN1C - Adapté de Tury et al., 2011

La première est liée à la stratégie expérimentale utilisée pour évaluer le niveau d'expression de CDKN1C. Cette étude a été réalisée sur des cortex entiers dissociés, sur un ensemble de populations cellulaires extrêmement hétérogène (progéniteurs, neurones matures et immatures, exprimant CDKN1C à des niveaux différents dans notre analyse). Ainsi, les auteurs se placent dans des conditions très différentes des nôtres. Par exemple, leur analyse comprend notamment des neurones, dans lesquels nous observons une absence d'expression de CDKN1C aux échelles transcriptomiques et de l'ARNm. De par l'écart très important entre les populations étudiées, et le niveau de résolution de la technique (bulk VS single-cell) il devient donc très difficile de comparer nos résultats et ceux obtenus par Tury et collaborateurs.

Une autre hypothèse serait d'envisager l'existence d'une régulation différentielle de l'expression de CDKN1C entre les régions corticales et spinales. Ceci pourrait être évalué par la production ou ré-analyse d'un jeu de données scRNA-seq provenant de cortex (murin ou de poulet) en développement, et d'observer l'évolution de l'expression de CDKN1C dans la population des progéniteurs.

Dans le cortex murin en développement, Mairet-Coello et collaborateurs ont caractérisé la dynamique d'expression de la protéine p57Kip2. Ils observent une expression de p57Kip2 dans le cortex murin dès le stade E11.5, dans des cellules à la périphérie du cortex (neurones) et dans des cellules progénitrices (PCNA-positives) peuplant la zone ventriculaire (Mairet-Coello et al., 2012). Cette expression de la protéine augmente considérablement à E14.5, avec près de 40% de cellules progénitrices (PCNA-positives) exprimant p57Kip2, répartis entre la VZ (environ 60% des cellules) et la SVZ (environ 40% des cellules). Une analyse plus fine, utilisant les marqueurs Pax6 (aRGs) et Tbr2 (progéniteurs basaux) révèlent que ces deux populations de progéniteurs expriment la protéine p57Kip2, avec une fréquence d'expression plus importante dans les progéniteurs basaux. Ainsi, dans le cortex et au niveau protéique, p57Kip2 est 1) exprimé dans des cellules progénitrices et 2) son expression augmente au cours du temps, au

moins entre les stades E11.5 et E14.5. Ces résultats viennent donc conforter nos observations d'une expression progressive via nos analyses transcriptomiques et de l'ARNm.

Dans notre modèle, l'absence d'anticorps fonctionnel dirigé contre la version aviaire de la protéine p57Kip2 ne permet pas une étude classique par immunofluorescence de la dynamique d'expression au cours de la neurogenèse. Nos stratégies alternatives (voir chapitre Perspectives) devraient apporter des éléments de réponse à cette question.

A.1.3 – Quels mécanismes pourraient réguler l'expression progressive de CDKN1C ?

P57Kip2 joue un rôle crucial dans de nombreux organes au cours du développement, notamment dans le contrôle spatio-temporel de la prolifération. A ce titre, son expression est fortement contrôlée. Ainsi, une question se pose : dans le contexte d'une expression progressive de CDKN1C au cours de la neurogenèse, quels mécanismes de régulation contribuent à la mise en place de cette expression ?

Parmi les nombreux mécanismes connus de régulation de l'expression de CDKN1C, un rôle de la voie de signalisation Notch a été mis en évidence dans les populations progénitrices de divers organes au cours du développement embryonnaire, notamment dans les cryptes intestinales (Riccio et al., 2008), le cristallin (Jia et al., 2007), les cellules souches musculaires (Zalc et al., 2014) ou encore le pancréas (Georgia et al., 2006).

Dans l'exemple du pancréas en développement, les auteurs observent au stade E10.5 deux populations de progéniteurs pancréatiques : l'une positive pour le FT Hes1 (effecteur de la voie Notch, impliqué dans le maintien d'un état progéniteur) et négative pour la protéine p57Kip2, et l'autre positive pour p57Kip2 et négative pour Hes1. A travers la suite de leurs travaux, les auteurs révèlent via la méthode de criblage simple-hybride dans la levure un rôle répresseur direct de Hes1 sur la transcription de CDKN1C, expliquant l'exclusion mutuelle de p57Kip2 dans les cellules Hes1-positives, et de Hes1 dans les cellules p57Kip2-positives. De façon très intéressante, les auteurs disent observer le même phénomène d'exclusion mutuelle Hes1-p57Kip2 dans le tube neural murin en développement, mais ne présentent pas ces données dans leur article.

Dans les données transcriptomiques de Delile et collaborateurs, nous observons une expression du gène Hes1 dans les progéniteurs prolifératifs, qui précède celle de CDKN1C (**Figure 32**). Nous pouvons donc imaginer un rôle répresseur de ce facteur sur CDKN1C aussi dans notre contexte. Si ceci est exact, une nouvelle question se pose : par quels mécanismes s'opèrent la levée de répression de Hes1 sur CDKN1C ?

Une potentielle réponse est apportée par d'autres travaux conduits cette fois-ci dans un contexte de neurogenèse embryonnaire. Au cours de leurs études réalisées sur des cultures de progéniteurs neurales extraits de cortex télencéphaliques dorsaux murins au stade E13.5, Gratton et collaborateurs étudient la relation entre Hes1 et un autre membre de la même famille, Hes6, qui possède des activités pro-neurogéniques (Gratton et al., 2003). Dans leur système de culture, les auteurs montrent un rôle répresseur de Hes6 sur l'activité de Hes1, et ce à travers deux mécanismes : le premier est une inhibition de l'interaction entre Hes1 et son partenaire de répression transcriptionnelle Gro/TLE (Groucho/Transducin-Like Enhancer of split) par une

interaction directe Hes1 - Hes6, le second est la promotion de la dégradation protéolytique de Hes1.

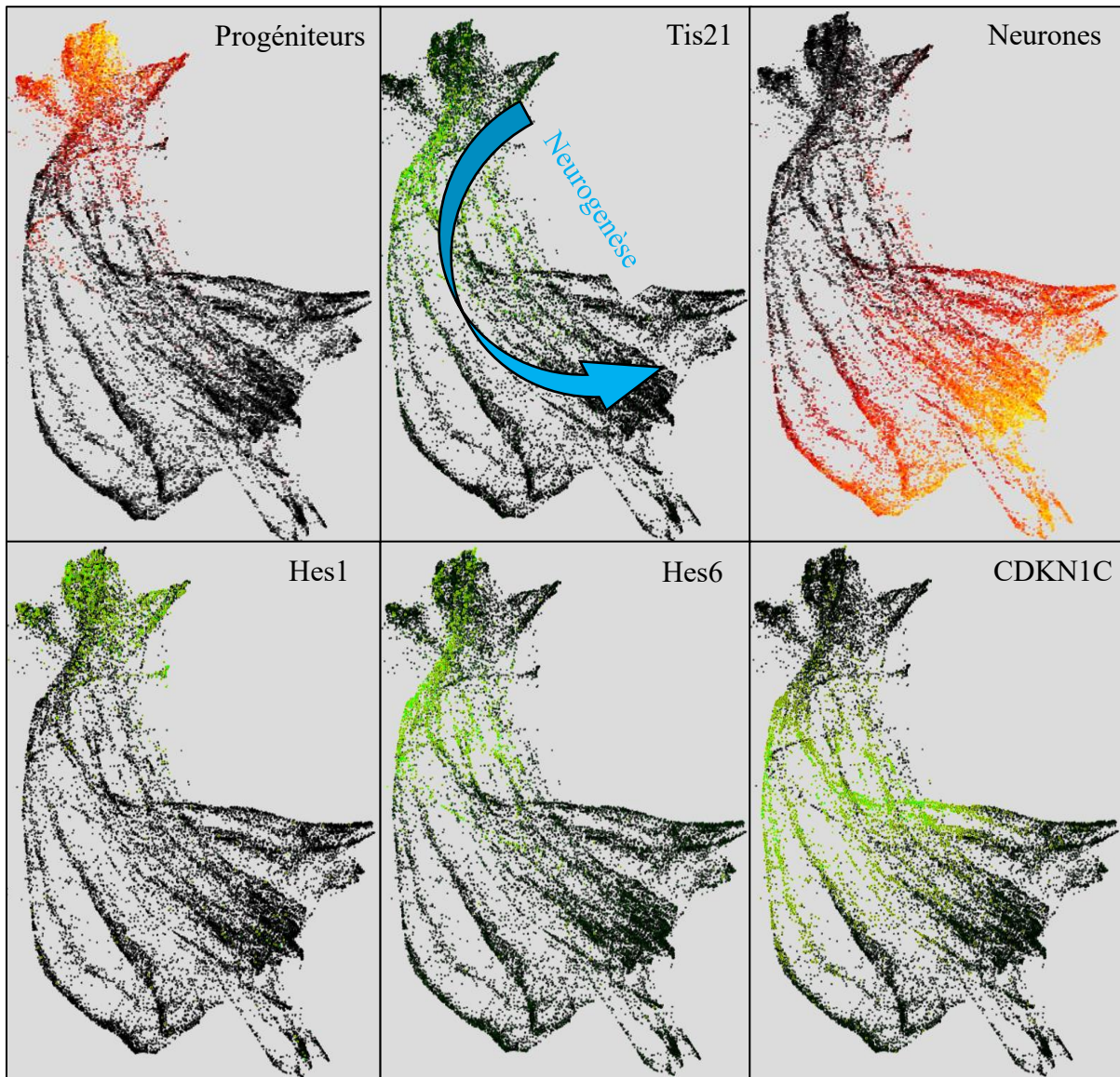


Figure 32 : Profils d'expression des différents gènes potentiellement impliqués dans la régulation de l'expression progressive de CDKN1C au cours de la neurogenèse embryonnaire. (Haut) Représentation SPRING du jeu de données transcriptomiques produit par Delile et collaborateurs. Le jeu de données a été préalablement filtré pour ne conserver que les progéniteurs neuraux et les neurones. Les cellules sont ordonnées selon un axe pseudo-temporel construit grâce au score Progéniteur (P) VS Neurones (N) mentionné dans la section A.1. Le panneau du milieu représente le profil d'expression du gène marqueur Tis21. (Bas) Représentations SPRING des profils d'expression des différents gènes impliqués dans la potentielle cascade de régulation Hes1-Hes6-CDKN1C.

Au cours de la neurogenèse embryonnaire, quelques études réalisées sur des embryons de Xénope suggèrent que l'expression de Hes6 serait sous le contrôle de facteurs bHLH proneuraux, notamment des familles Neurogénine et NeuroD (Koyano-Nakagawa et al., 2000; Murai et al., 2011). Ainsi, dans notre contexte émerge la possible existence d'une séquence de régulation, à travers laquelle l'expression de CDKN1C serait, dans les progéniteurs prolifératifs, réprimée par l'action directe de Hes1. Avec le début de la neurogenèse, les facteurs proneuraux déclencheraient l'expression de Hes6, entraînant une diminution (au moins partielle) de l'expression de Hes1. Ceci permettrait une faible expression de CDKN1C, qui pourrait alors influencer sur le mode de division (**Figure 32**). Ensuite, une répression plus importante de l'activité de Hes1 par Hes6 conduirait à une expression plus importante de CDKN1C, et à la sortie du cycle cellulaire des progéniteurs. La dynamique d'expression de Hes6 dans nos données (Figure 32) est compatible avec ce scénario.

A.2 –Autres gènes candidats et programme transcriptomique

A travers nos analyses bio-informatiques, nous avons identifié une première liste de gènes candidats potentiels à la régulation de la transition du MDD. Parmi ces premiers gènes identifiés, trois candidats ont plus particulièrement attiré notre attention : CDKN1C, Hes6 et un troisième gène appelé Gadd45g (Growth Arrest and DNA Damage response g) appartenant à une famille comprenant deux autres membres (Gadd45a et b), associée à divers processus tels que l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, et un rôle pro-apoptotique (Kaufmann et al., 2011; Salvador et al., 2013).

Lors de la construction initiale de cette liste de gènes candidats, nous imaginions avoir isolé des gènes « distincts » (puisque aucune interaction entre les différents membres n'a été décrite dans la littérature) dont les activités séparées convergeaient vers une « voie finale commune » qui contrôlerait la transition du mode de division. Cependant, l'hypothèse d'une possible régulation de l'expression de CDKN1C par Hes1 / Hes6 nous conduit à poser la question suivante : avons-nous identifié des gènes « individuels » ou plus largement un / des programme(s) transcriptomique(s) de la régulation de la transition d'un mode de division symétrique prolifératif vers asymétrique neurogénique ?

Pour décrypter ce ou ces potentiels programmes transcriptomiques sous-tendant la transition des MDD, il nous faudra procéder à la validation fonctionnelle des autres gènes candidats identifiés, en suivant par exemple une approche similaire à celle utilisée pour CDKN1C. Dans un premier temps, la perturbation individuelle de l'expression de ces gènes à l'échelle tissulaire suivie d'une analyse de l'état de la balance entre prolifération et différenciation fournira un premier indice quant à l'existence d'un rôle potentiel sur le mode de division. Ensuite, et si les phénotypes observés à l'échelle tissulaire sont intéressants, une analyse clonale du destin des cellules filles issues de cellules mères diminuées pour l'expression de ces gènes devrait permettre de mettre en lumière, comme pour CDKN1C, l'existence d'un rôle dans la régulation des modes de division. Par la suite, il nous faudra réfléchir à des stratégies permettant de mettre en évidence des potentielles interactions entre des gènes présentant les mêmes phénotypes, afin de révéler un potentiel programme transcriptomique.

Partie B : CDKN1C et la transition neurogénique

B.1 – Le choix de la stratégie shRNA

Plusieurs études se sont intéressées au rôle de CDKN1C dans le contexte de la neurogenèse embryonnaire, notamment à travers l'étude des phénotypes présentés dans des modèles murins K.O dans les régions corticales (Mairet-Coello et al., 2012; Tury et al., 2011) et spinales (Gui et al., 2007).

Au sein du laboratoire, nous avons développé dans le tube neural spinal du poulet des stratégies de K.O et de Knock-In basées sur la technologie CRISPR/Cas9. Ainsi, nous aurions pu nous orienter vers une stratégie de K.O pour le gène CDKN1C et ainsi nous rapprocher des conditions expérimentales utilisées dans les études mentionnées ci-dessus.

Cependant, nous avons préféré nous tourner vers une stratégie basée sur l'utilisation d'un shRNA, afin de diminuer partiellement l'expression de CDKN1C et apprécier les effets d'une modulation (et non suppression comme dans un K.O) de l'expression sur le processus de neurogenèse (à l'échelle tissulaire) et plus particulièrement sur la régulation des modes de division (à l'échelle cellulaire). Cette diminution partielle de l'expression est notablement visible via nos expériences combinant l'électroporation du shRNA dirigé contre CDKN1C à la technique d'HIS, dans lesquelles nous observons une diminution de l'intensité du signal de l'ARNm de CDKN1C dans le côté électroporé du tube neural.

Notre stratégie de diminution d'expression étant différente de celles adoptées dans les précédentes études, il me semble intéressant de comparer (au moins à l'échelle tissulaire) nos résultats à ceux des précédents travaux.

B.2 – Effets observés sur la neurogenèse embryonnaire par diminution de l'expression de CDKN1C via shRNA : en accords avec la littérature ?

B.2.1 – Effets sur la balance prolifération / différenciation au niveau tissulaire

Au niveau tissulaire, nous observons une forte perturbation de la balance entre prolifération et différenciation en faveur de l'aspect prolifératif lors de l'électroporation du shRNA dirigé contre CDKN1C. Cette augmentation de la production de progéniteurs est également observée dans les régions spinales (Gui et al., 2007), et corticales (Mairet-Coello et al., 2012) en développement de souris K.O pour CDKN1C. Ainsi, une diminution aiguë et temporaire (shRNA) semble reproduire l'effet observé lors d'une perte totale de l'expression du gène par K.O. Les contextes dans lesquels ont été réalisées les études étant tous différents (cortex murin, région spinale murine, région spinale de poulet), il reste cependant difficile de conclure sur une différence de puissance entre les stratégies shRNA et modèle K.O sur la perturbation de la balance entre prolifération et différenciation observée.

En plus de l'augmentation de la prolifération des progéniteurs, Gui et collaborateurs observent au cours de cette phase de sur-prolifération une réentrée dans le cycle cellulaire de cellules qui semblent être destinées pour la différenciation. En effet, ils identifient dans la condition K.O CDKN1C une population cellulaire exprimant à la fois des marqueurs de jeunes interneurons (Pax2-positifs et Lim1/2-positifs) et incorporant du BrdU, donc des cellules cyclantes. Dans nos analyses tissulaires 48h après électroporation du shRNA dirigé contre CDKN1C, nous avons également observé quelques rares cellules exprimant à la fois les marqueurs pRb (progéniteurs) et HuC/D (neurones). En revanche, des analyses d'immunomarquage via PH3 (phospho-Histone3) dans les mêmes conditions n'ont pas identifié de mitoses ectopiques. De plus, aucune réentrée dans le cycle cellulaire de cellules exprimant des marqueurs post-mitotiques n'est observée dans le cortex murin de souris K.O pour p57Kip2 (Mairet-Coello et al., 2012). Ceci suggère donc que ce phénomène de réentrée dans le cycle ne contribue que de façon très marginale à l'augmentation de la prolifération.

A la vue de l'augmentation de la prolifération des progéniteurs lors de la diminution de l'expression de CDKN1C, nous pouvons poser la question du devenir de ces nombreux progéniteurs générés : vont-ils finir par quitter le cycle et générer des neurones ?

Dans le cortex murin de souris p57Kip2 K.O, Mairet-Coello et collaborateurs observent, après une phase initiale de surproduction de progéniteurs entre E11.5 et E14.5, cette phase de rebond neurogénique aux stades E15.5 – E16.5. Gui et collaborateurs observent également ce phénomène de sur-prolifération puis de rebond neurogénique dans la région spinale embryonnaire murine (Gui et al., 2007).

Dans le cadre de nos travaux, nous n'avons pas observé une telle phase de rebond neurogénique, probablement car nous n'avons pas poussé nos analyses au-delà de 48h post-électroporation, alors que cet effet de rebond neurogénique est observé assez « tardivement » par Mairet-Coello et collaborateurs. Ainsi, et puisque nous observons également une augmentation de la production de progéniteurs en condition CDKN1C shRNA, nous émettons tout de même l'hypothèse qu'une telle phase de rebond doit exister dans notre contexte, puisque le surplus de progéniteurs générés en condition d'électroporation du shRNA dirigé contre CDKN1C devrait également finir par quitter le cycle puis se différencier.

B.2.2 – Effets de CKN1C au cours de la neurogenèse : cycle cellulaire dépendant ou indépendant ?

Au travers du chapitre III de ce manuscrit, nous avons vu que la modulation de la durée du cycle cellulaire, en particulier de la phase G1, par diverses approches entraîne une modification de la balance entre prolifération et différenciation.

A travers nos résultats expérimentaux, nous observons que l'effet de la diminution d'expression de CDKN1C sur la balance entre prolifération et différenciation semble être médié par une réduction de la durée de cycle des progéniteurs, et particulièrement de leur durée de phase G1. Ceci est en adéquation avec les résultats de Mairet-Coello et collaborateurs, qui observent, dans le cortex murin K.O pour CDKN1C, une diminution du temps de G1 des progéniteurs aux stades E12.5, E14.5 et E16.5 (VS la population contrôle), mesurée à l'aide d'une technique de double incorporation BrdU/IdU (Mairet-Coello et al., 2012). De façon très intéressante, une autre étude publiée par le même groupe révèle une augmentation de la durée du cycle cellulaire

des progéniteurs du cortex embryonnaire de rat (par exposition courte (2h) au BrdU) lors d'une surexpression de CDKN1C, et est associée à une diminution précoce de la prolifération (Tury et al., 2011). Bien que les auteurs ne le montrent pas, il est légitime de supposer que cette augmentation de la durée du cycle cellulaire s'opère à travers un allongement de la G1. Ainsi, la perte et le gain de fonction de CDKN1C ont un impact sur la balance prolifération/différenciation en lien avec son rôle dans le cycle cellulaire.

Ceci nous a donc logiquement poussé à émettre l'hypothèse suivante : la diminution de l'expression de CDKN1C influence la régulation du mode de division via la réduction de la durée de la phase G1. Pour valider cette hypothèse, nous avons cherché à restaurer le phénotype observé sur les modes de division en contrebalançant l'effet de la perte de CDKN1C sur le cycle cellulaire par une augmentation de la durée de la phase G1.

Pour réaliser cet allongement de la phase G1, plusieurs stratégies, telles que des approches pharmacologiques ou de modification de l'expression de gènes (diminution ou surexpression) déjà utilisées dans des contextes de neurogenèse embryonnaire, étaient envisageables. Certaines de ces approches modifiaient la durée de plusieurs phases du cycle. Par exemple, Calegari & Huttner ont utilisé l'olomoucine (un agent antiméiotique agissant par inhibition spécifique des complexes CDK2 – Cycline A/E et CDK1 – Cycline B) pour augmenter la durée de la phase G1 dans un système de culture d'embryons entiers de souris en développement (Federico Calegari and Huttner, 2003). L'olomoucine est un puissant inhibiteur du cycle cellulaire, mais peut allonger la durée du cycle cellulaire sans l'arrêter s'il est utilisé à des doses faibles, en inhibant les complexes CDKs – cyclines responsables de la transition G1/S mais également de la transition G2/M. Au cours de leur étude, les auteurs attribuent l'augmentation de la durée du cycle cellulaire observée dans les progéniteurs d'embryons traités à l'olomoucine à la phase G1, sans réellement discuter d'un possible allongement de la phase G2. Ainsi, nous n'avons pas choisi cette première méthode, car notre objectif était de ne spécifiquement moduler que la phase G1.

Au cours de travaux récents, Molina et collaborateurs ont décrit un effet indirect d'allongement de la phase G1 lors de la surexpression de la phosphatase CDC25B dans des progéniteurs de la région spinale du tube neural de poulet (Molina et al., 2022). En effet, les auteurs observent que la surexpression de CDC25B dans un progéniteur au cycle « n » entraîne un allongement de la durée de G1 dans les cellules filles, soit au cycle « $n+1$ ». Les auteurs observent également que la phosphatase surexprimée n'est présente que dans les phases S/G2/M du cycle « n », avant d'être dégradée en fin de mitose. La phosphatase n'étant pas ré-exprimée dans les cellules filles au cours de la phase G1, les auteurs concluent que cet allongement de G1 observé au cycle « $n+1$ » est la conséquence indirecte des événements du cycle précédent. Dans le cadre de cet allongement de G1, les auteurs observent en parallèle une diminution des durées des phases S et G2 dans les cellules filles. A nouveau, notre objectif étant de moduler spécifiquement la durée de la phase G1, nous n'avons pas retenu cette autre approche.

L'approche la plus pertinente nous semblait de nouveau être l'utilisation de shRNAs dirigés contre des acteurs spécifiques de la progression de la phase G1. Cette stratégie a notamment été utilisée par Lange et collaborateurs, qui s'intéressaient particulièrement à la relation entre durée de phase G1 et balance prolifération/différenciation dans le cortex murin en développement (Lange et al., 2009). Au cours de leurs travaux, les auteurs utilisent un couple de siRNAs dirigés contre CDK4 et Cycline D1. Ils observent une augmentation de la durée de la phase G1 des

progéniteurs neuraux corticaux, une baisse de la prolifération et une augmentation de la génération des neurones. Ainsi nous avons décidé d'utiliser une stratégie basée sur un shRNA pour contrebalancer le phénotype induit par la dérégulation de CDKN1C.

Nous avons donc fait le choix d'un shRNA dirigé contre la cycline D1, basé sur les résultats des travaux de Lange et collaborateurs mais également d'autres études. L'absence de séquence génomique connue pour CDK4 chez le poulet nous a empêché de générer un shRNA contre cette autre cible

L'utilisation d'un shRNA dirigé contre la cycline D1 dans un contexte de neurogenèse spinale dans l'embryon de poulet a montré, par une analyse basée sur l'évaluation de l'incorporation de BrdU pendant un temps court (1h) 24h après l'électroporation des embryons, une diminution du nombre de progéniteurs en phase S, que les auteurs attribuent à un allongement de la phase G1. (Lacomme et al., 2012). Ceci semble vrai tout le long de l'axe dorso-ventral du tube neural sauf pour le domaine pMN, dans lequel a été décrit un rôle de Cycline D1 pro-neurogénique et indépendant de son activité dans le cycle cellulaire (Lukaszewicz and Anderson, 2011). Ainsi, et bien que la diminution d'expression de cycline D1 ne semble pas favoriser la différenciation, la réduction spécifique de la durée de la phase G1 représentait parfaitement ce que nous souhaitons accomplir dans le cadre de notre stratégie de sauvetage. Nos analyses tissulaires de l'état de la balance prolifération/différenciation et d'incorporation d'EdU sur un pulse court en condition de diminution d'expression de Cycline D1 ont ensuite confirmé ces hypothèses.

De plus, les travaux de Gui et collaborateurs conduits dans la région spinale murine semblent indiquer que l'un des acteurs inhibés par p57Kip2 dans le cadre de la régulation du cycle cellulaire est la cycline D1. En effet, les auteurs observent en condition de double surexpression CDKN1C/CCND1 une réversion complète de l'effet pro-prolifératif de CCND1, observé lors d'une surexpression simple de cette dernière. Ainsi, notre choix de cycline D1 en tant que cible s'est basé sur 2 arguments : 1) sa diminution permet de contrebalancer la réduction de phase G1 et 2) il semble être un partenaire direct de CDKN1C.

Il peut paraître curieux de choisir une cible dont la diminution certes allonge la durée de G1, mais ne favorise pas la différenciation des progéniteurs. Dans le cadre de nos expériences de rescue, nous faisons l'hypothèse que la diminution de l'expression de cycline D1 est suffisante pour restaurer des paramètres de cycle cellulaire suffisamment long, compatibles avec des modes de division neurogéniques. Cette hypothèse est notamment sous-tendue dans la littérature par le modèle « breaking the symmetry », abordé dans la partie suivante (Federico Calegari and Huttner, 2003).

B.3 – CDKN1C et la régulation des modes de division

B.3.1 – Etude de la transition des modes de division par analyse clonale.

Comme déjà évoqué dans le chapitre « Modes de division » de l'introduction, étudier/affirmer un changement de mode division n'est pas trivial.

Une approche communément admise dans la littérature est d'étudier le destin des cellules filles par analyse clonale après la division et d'inférer rétrospectivement le mode de division à la cellule mère.

Si l'on reprend notre stratégie expérimentale d'analyse clonale en condition de KD CDKN1C (KD = Knock-down), l'identité des cellules filles est déterminée six heures après la division dans des cellules filles qui contenaient une certaine quantité de shRNA dirigé contre CDKN1C. Ainsi, la diminution de l'expression de CDKN1C pourrait continuer d'opérer au cours de ces 6 heures post-division, et influencer l'acquisition de l'identité des cellules filles (sans effet sur le mode de division). Ceci est d'autant plus à considérer que les 6 heures écoulées entre la division de la cellule mère et l'analyse des identités dans les cellules filles représentent essentiellement un temps en phase G1, moment du cycle cellulaire où la diminution de CDKN1C pourrait modifier le destin des cellules filles.

Pour contourner ceci, une meilleure approche serait sans doute de reproduire notre stratégie d'analyse du destin de cellules filles, mais avec des marqueurs d'identité des cellules filles plus précoces, quasi-immédiatement après la mitose. Cependant, de tels marqueurs ne sont aujourd'hui pas encore connus.

Une autre possibilité consisterait à cibler les expériences de perte et gain de fonction à une fenêtre de temps restreinte. En limitant ces perte ou gain de fonction au cycle de la cellule progénitrice mère seulement, nous pourrions nous affranchir d'un possible effet en post-mitotique sur les cellules filles. C'est une telle approche que nous envisageons d'utiliser pour les expériences de surexpression de CDKN1C (voir chapitre précédent). Brièvement, l'utilisation d'un vecteur de surexpression TRE et un plasmide Tet-OFF devrait permettre de restreindre la durée de la surexpression de CDKN1C au cycle de la cellule progénitrice mère grâce à l'administration de Doxycycline avant sa division.

Pourrait-on également limiter la durée de KD de CDKN1C à la cellule mère ? Une possibilité consisterait à combiner perte de fonction et administration d'un inhibiteur pharmacologique des cibles de CDKN1C, une situation que l'on pourrait comparer à une double diminution de CDKN1C et de cyclinD1. En administrant cet inhibiteur dans des embryons électroporés avec le shCDKN1C à différents temps, soit peu après électroporation du shCDKN1C, soit au moment de la mitose des progéniteurs (que l'injection de FT nous permettra de monitorer) nous serions en mesure de déterminer si le rôle de CDKN1C dans la transition des modes de division est pré-mitotique dans les progéniteurs, ce qui est notre hypothèse, ou post mitotique dans les cellules filles.

Si lors de l'administration de l'inhibiteur pharmacologique au moment de la mitose en condition KD, la proportion de paires est similaire à celle en condition KD seule, ceci voudra dire que le rôle de CDKN1C est bien avant la mitose, sur les progéniteurs. Si au contraire son rôle est post-mitotique, alors la proportion de paires sera similaire au contrôle.

B.3.2 – Transition des modes de division et expression de Tis21.

En raison de l'absence de marqueurs fiables des progéniteurs et des neurones peu après la mitose, une autre approche pour étudier un changement de mode de division repose sur l'étude de l'expression de Tis21. Comme déjà évoqué dans les précédents chapitres, l'expression de ce gène est communément admis comme étant un marqueur de division asymétrique, et a été utilisé comme tel dans des études descriptives visant à caractériser les différences morphologiques entre les progéniteurs symétriques (Tis21-négatives) et asymétriques (Tis21-positives) ou comme rapporteur de modes de division dans des études fonctionnelles portant sur les signaux en amont de la transition de modes de division dans la moelle épinière de poulet (Le Dréau et al., 2014; Saade et al., 2013).

Dans notre étude, nous avons fait l'hypothèse que la diminution de CDKN1C dans les progéniteurs pourrait altérer les mécanismes de régulation de l'expression de Tis21 et ainsi conduire à une réduction du nombre de progéniteurs Tis21-positifs. En effet, nous avons observé une réduction de l'apparition de progéniteurs Tis21-positifs (donc des progéniteurs neurogéniques) lorsque l'expression de CDKN1C est diminuée par rapport à la population contrôle. Ainsi, ce résultat expérimental nous conforte dans l'hypothèse d'un rôle pré-mitotique de CDKN1C dans le contrôle de la transition d'un MDD symétrique prolifératif vers asymétrique neurogénique. Il reste cependant un dernier écueil avant d'affirmer cette conclusion.

L'expression du gène Tis21 est considérée comme un marqueur plus qu'un acteur de la transition vers des modes de division neurogéniques. Il se pourrait donc que les programmes régulant son expression et ceux régulant la transition des modes de division soient découplés, et que son absence d'expression n'empêche en rien ou très peu le changement des modes de division. Ainsi, à la lumière des arguments précédents, il semble difficile d'apporter une réponse définitive quant à la temporalité de l'effet de la diminution de CDKN1C. Est-il possible d'aller plus loin pour répondre à cette question ?

B.3.3 – Mécanismes cellulaires du changement de mode de division et asymétrie intrinsèque de la cellule mère.

Comme évoqué dans le chapitre « Modes de division », la preuve ultime du rôle de CDKN1C dans la transition des modes de division serait qu'il régule la mise en place d'une asymétrie dans la cellule mère, asymétrie qui en retour serait instructive pour une identité différentielle dans les cellules filles après division.

En attribuant les résultats de nos analyses clonales de destins des cellules filles aux modifications de la durée de phase G1 liées à la perturbation de l'expression de CDKN1C, nos résultats rejoignent une hypothèse formulée il y a quelques années par Calegari et Huttner (Federico Calegari and Huttner, 2003) : celle de « Breaking the symmetry ». Les auteurs émettent l'hypothèse qu'au cours de l'allongement de la phase G1 de la cellule mère, un facteur/déterminant de l'identité cellulaire serait « produit » à un certain niveau ou subirait une étape de maturation, aurait ainsi le temps d'atteindre son site d'action (par exemple le noyau pour un FT) et ainsi être en capacité d'induire directement ou indirectement une asymétrie dans la cellule mère qui en retour aurait un impact sur le changement du destin des cellules filles. Ainsi, un cycle cellulaire relativement court, et particulièrement une phase G1 courte, ne

laisserait pas suffisamment de temps pour la mise en place de ces mécanismes alors qu'une durée plus longue le permettrait. Dans le contexte de la diminution de l'expression de CDKN1C, la durée de la phase G1 des progéniteurs est réduite, ce qui pourrait empêcher la mise en place des mécanismes évoqués ci-dessus dans la cellule mère et également la mise en place de destins différents dans les cellules filles. Cette hypothèse est d'autant plus probable qu'à travers nos expériences de « sauvetage » du phénotype induit par la perturbation de l'expression de CDKN1C, la diminution combinée de l'expression de CDKN1C et Cycline D1 semble restaurer des durées de cycle cellulaire des progéniteurs et des fréquences de modes de division similaires à ce qui est observé dans la population contrôle.

Cependant, la nature de ce facteur/déterminant d'identité reste encore inconnue. L'identification de tels facteurs est précisément au cœur des objectifs du laboratoire.

Récemment, Mib1, un régulateur de la voie Notch, a été identifié dans l'équipe (Tozer et al., 2017) comme déterminant d'identité cellulaire. Il est tentant de spéculer que l'allongement progressif de la phase G1 pourrait influencer la distribution de Mib1 dans la cellule progénitrice : plus celle-ci est longue, plus Mib1 sera asymétriquement localisé. Nous envisageons de coupler l'étude de la distribution mitotique de ce facteur en condition de KD de CDKN1C, et/ou de surexpression si notre stratégie est fonctionnelle. Nous espérons une symétrisation de sa distribution lors d'une baisse de CDKN1C et une « asymétrisation » précoce dans le cadre d'une surexpression de CDKN1C à E2, stade auquel la grande majorité des divisions est symétrique.

Enfin, des résultats préliminaires dans l'équipe suggèrent une corrélation entre distribution inégale des mitochondries pendant la mitose et division asymétrique. CDKN1C jouerait-il un rôle sur cette répartition inégale des pools mitochondriaux dans les cellules filles ? Des expériences combinant perte de fonction de CDKN1C et analyse de la répartition de ces organelles pendant la division devraient permettre de répondre à cette question.

Résumé

Au cours de la neurogenèse embryonnaire des vertébrés, la régulation de la transition d'un mode de division (MDD) symétrique prolifératif (SYM – 1 progéniteur produit 2 progéniteurs) des progéniteurs neuraux vers asymétrique neurogénique (ASYM – 1 progéniteur produit 1 progéniteur et un neurone) joue un rôle crucial dans le contrôle de la balance entre prolifération et différenciation. Bien que des travaux pionniers aient révélé des différences transcriptomiques entre progéniteurs SYM et ASYM, celles-ci restent largement inexplorées. Au cours de mes travaux de thèse, j'ai identifié le gène CDKN1C (p57Kip2) comme un potentiel régulateur de cette transition des MDD. A l'échelle tissulaire, diminuer l'expression de CDKN1C dans le tube neural de l'embryon de poulet (via shRNA) résulte en une diminution de la neurogenèse, liée à un excès de prolifération des progéniteurs dont la durée de cycle cellulaire, notamment de phase G1, diminue. A l'échelle cellulaire, la diminution d'expression de CDKN1C semble favoriser l'utilisation par les progéniteurs du MDD SYM. De plus, restaurer des paramètres de cycle cellulaire comparables avec ceux de progéniteurs sauvages en condition de diminution d'expression de CDKN1C restaure quasi-complètement le phénotype observé sur les MDD. Ainsi, j'ai mis en lumière un nouveau rôle de CDKN1C dans la production neuronale au cours de la neurogenèse, par un effet sur la transition des MDD des progéniteurs neuraux

Mots-clés : neurogenèse, division asymétrique, prolifération, différenciation, régulation du mode de division

Abstract

During vertebrate embryonic neurogenesis, regulation of the transition of the mode of division (MOD) of neural progenitors from symmetric proliferative (SYM - 1 progenitor produces 2 progenitors) to asymmetric neurogenic (ASYM - 1 progenitor produces 1 progenitor and 1 neuron) plays a crucial role in controlling the balance between proliferation and differentiation. Although pioneering work has revealed transcriptomic differences between SYM and ASYM progenitors, these remain largely unexplored. During my thesis, I identified CDKN1C (p57Kip2) as a potential regulator of this transition of the MOD. At the tissue level, decreasing CDKN1C expression in the neural tube of the chick embryo (via shRNA) results in a decrease in neurogenesis, linked to excess proliferation of progenitors whose cell cycle length, notably G1 phase, is reduced. At the cellular level, reduced CDKN1C expression seems to promote the use of the SYM MOD by progenitors. Moreover, restoring cell cycle parameters comparable with those of wild-type progenitors under conditions of reduced CDKN1C expression almost completely restores the phenotype observed on MOD. In this way, I have highlighted a new role for CDKN1C in neuronal production during neurogenesis, through its effect on the transition of MOD in neural progenitors.

Keywords: neurogenesis, asymmetric division, proliferation, differentiation, regulation of the mode of division

Bibliographie

1. Abdelwahab, A.B., El-Sawy, E.R., Hanna, A.G., Bagrel, D., Kirsch, G., 2022. A Comprehensive Overview of the Developments of Cdc25 Phosphatase Inhibitors. *Molecules* 7;27(8):2389. <https://doi.org/10.3390/molecules27082389>.
2. Alaynick, W.A., Jessell, T.M., Pfaff, S.L., 2011. SnapShot: Spinal Cord Development. *Cell* 146, 178-178.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.038>
3. Albert, M., Kalebic, N., Florio, M., Lakshmanaperumal, N., Haffner, C., Brandl, H., Henry, I., Huttner, W.B., 2017. Epigenome profiling and editing of neocortical progenitor cells during development. *EMBO J.* 36, 2642–2658. <https://doi.org/10.15252/embj.201796764>
4. Andersen, J., Thom, N., Shadrach, J.L., Chen, X., Onesto, M.M., Amin, N.D., Yoon, S.-J., Li, L., Greenleaf, W.J., Müller, F., Paşca, A.M., Kaltschmidt, J.A., Paşca, S.P., 2023. Single-cell transcriptomic landscape of the developing human spinal cord. *Nat. Neurosci.* 26, 902–914. <https://doi.org/10.1038/s41593-023-01311-w>
5. Andrews, S.C., Wood, M.D., Tunster, S.J., Barton, S.C., Surani, M.A., John, R.M., 2007. Cdkn1c (p57 Kip2) is the major regulator of embryonic growth within its imprinted domain on mouse distal chromosome 7. *BMC Dev. Biol.* 7, 53. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-53>
6. Antony, J.M., Paquin, A., Nutt, S.L., Kaplan, D.R., Miller, F.D., 2011. Endogenous microglia regulate development of embryonic cortical precursor cells. *J. Neurosci. Res.* 89, 286–298. <https://doi.org/10.1002/jnr.22533>
7. Aprea, J., Prenninger, S., Dori, M., Ghosh, T., Monasor, L.S., Wessendorf, E., Zocher, S., Massalini, S., Alexopoulou, D., Lesche, M., Dahl, A., Groszer, M., Hiller, M., Calegari, F., 2013. Transcriptome sequencing during mouse brain development identifies long non-coding RNAs functionally involved in neurogenic commitment: LncRNAs control neurogenesis. *EMBO J.* 32, 3145–3160. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.245>
8. 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>
9. Araya, C., Carrasco, D., 2021. Mechanisms of vertebrate neural plate internalization. *Int. J. Dev. Biol.* 65, 263–273. <https://doi.org/10.1387/ijdb.200122ca>
10. Arboleda, V.A., Lee, H., Parnaik, R., Fleming, A., Banerjee, A., Ferraz-de-Souza, B., Délot, E.C., Rodriguez-Fernandez, I.A., Braslavsky, D., Bergadá, I., Dell'Angelica, E.C., Nelson, S.F., Martinez-Agosto, J.A., Achermann, J.C., Vilain, E., 2012. Mutations in the PCNA-binding domain of CDKN1C cause IMAGE syndrome. *Nat. Genet.* 44, 788–792. <https://doi.org/10.1038/ng.2275>

11. Ashwell, K.W., 2009. Chapter 2 - Development of the Spinal Cord, in: Watson, C., Paxinos, G., Kayalioglu, G. (Eds.), *The Spinal Cord*. Academic Press, San Diego, pp. 8–16. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374247-6.50006-7>
12. Attardo, A., Calegari, F., Haubensak, W., Wilsch-Bräuninger, M., Huttner, W.B., 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002388>
13. Azaïs, M., Agius, E., Blanco, S., Molina, A., Pituello, F., Tregan, J.-M., Vallet, A., Gautrais, J., 2019. Timing the spinal cord development with neural progenitor cells losing their proliferative capacity: a theoretical analysis. *Neural Develop.* 14, 7. <https://doi.org/10.1186/s13064-019-0131-3>
14. Azevedo, F.A.C., Carvalho, L.R.B., Grinberg, L.T., Farfel, J.M., Ferretti, R.E.L., Leite, R.E.P., Jacob Filho, W., Lent, R., Herculano-Houzel, S., 2009. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J. Comp. Neurol.* 513, 532–541. <https://doi.org/10.1002/cne.21974>
15. Baek, C., Freem, L., Goïame, R., Sang, H., Morin, X., Tozer, S., 2018. Mib1 prevents Notch Cis-inhibition to defer differentiation and preserve neuroepithelial integrity during neural delamination. *PLoS Biol.* 16, e2004162. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004162>
16. Bar, I., Lambert de Rouvroit, C., Goffinet, A.M., 2000. The Reelin signaling pathway in mouse cortical development. *Eur. J. Morphol.* 38, 321–325. <https://doi.org/10.1076/ejom.38.5.321.7361>
17. Baye, L.M., Link, B.A., 2008. Nuclear Migration During Retinal Development. *Brain Res.* 1192, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.05.021>
18. Baye, L.M., Link, B.A., 2007. Interkinetic nuclear migration and the selection of neurogenic cell divisions during vertebrate retinogenesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 10143–10152. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2754-07.2007>
19. Béchade, C., Pascual, O., Triller, A., Bessis, A., 2011. Nitric oxide regulates astrocyte maturation in the hippocampus: involvement of NOS2. *Mol. Cell. Neurosci.* 46, 762–769. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2011.02.009>
20. Bertrand, N., Castro, D.S., Guillemot, F., 2002. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 517–530. <https://doi.org/10.1038/nrn874>
21. Besson, A., Dowdy, S.F., Roberts, J.M., 2008. CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond. *Dev. Cell* 14, 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.01.013>
22. Betizeau, M., Cortay, V., Patti, D., Pfister, S., Gautier, E., Bellemin-Ménard, A., Afanassieff, M., Huissoud, C., Douglas, R.J., Kennedy, H., Dehay, C., 2013. Precursor diversity and complexity of lineage relationships in the outer subventricular zone of the primate. *Neuron* 80, 442–457. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.032>
23. Bhogal, B., Arnaudo, A., Dymkowski, A., Best, A., Davis, T.L., 2004. Methylation at mouse *Cdkn1c* is acquired during postimplantation development and functions to

maintain imprinted expression. *Genomics* 84, 961–970.
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2004.08.004>

24. Billing, M., Rörby, E., May, G., Tipping, A.J., Soneji, S., Brown, J., Salminen, M., Karlsson, G., Enver, T., Karlsson, S., 2016. A network including TGF β /Smad4, Gata2, and p57 regulates proliferation of mouse hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.* 44, 399–409.e5. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2016.02.001>
25. Bishop, K.M., Goudreau, G., O’Leary, D.D., 2000. Regulation of area identity in the mammalian neocortex by Emx2 and Pax6. *Science* 288, 344–349. <https://doi.org/10.1126/science.288.5464.344>
26. Bjornsson, C.S., Apostolopoulou, M., Tian, Y., Temple, S., 2015. It Takes a Village: Constructing the Neurogenic Niche. *Dev. Cell* 32, 435–446. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.010>
27. Blomberg, I., Hoffmann, I., 1999. Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G(1)/S transition and leads to premature activation of cyclin E- and cyclin A-dependent kinases. *Mol Cell Biol.* <https://doi.org/10.1128/MCB.19.9.6183>.
28. Bohner, A.P., Akers, R.M., McConnell, S.K., 1997. Induction of deep layer cortical neurons in vitro. *Development* 124, 915–923. <https://doi.org/10.1242/dev.124.4.915>
29. Bond, A.M., Ming, G., Song, H., 2015. Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later. *Cell Stem Cell* 17, 385–395. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.09.003>
30. 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* 3;7:e32937. <https://doi.org/10.7554/eLife.32937>.
31. Borrell, V., Götz, M., 2014. Role of radial glial cells in cerebral cortex folding. *Curr. Opin. Neurobiol.* 27, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.02.007>
32. Borriello, A., Caldarelli, I., Bencivenga, D., Criscuolo, M., Cucciolla, V., Tramontano, A., Oliva, A., Perrotta, S., Della Ragione, F., 2011. p57(Kip2) and cancer: time for a critical appraisal. *Mol. Cancer Res. MCR* 9, 1269–1284. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0220>
33. Boutros, R., Dozier, C., Ducommun, B., 2006. The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.02.003>
34. Boward, B., Wu, T., Dalton, S., 2016. Concise Review: Control of Cell Fate Through Cell Cycle and Pluripotency Networks. *Stem Cells Dayt. Ohio* 34, 1427–1436. <https://doi.org/10.1002/stem.2345>
35. Brioude, F., Lacoste, A., Netchine, I., Vazquez, M.-P., Auber, F., Audry, G., Gauthier-Villars, M., Brugieres, L., Gicquel, C., Le Bouc, Y., Rossignol, S., 2013. Beckwith-Wiedemann Syndrome: Growth Pattern and Tumor Risk according to Molecular Mechanism, and Guidelines for Tumor Surveillance. *Horm. Res. Paediatr.* 80, 457–465. <https://doi.org/10.1159/000355544>

36. Brioude, F, Oliver-Petit, I., Blaise, A., Praz, F., Rossignol, S., Jule, M.L., Thibaud, N., Faussat, A.-M., Tauber, M., Bouc, Y.L., Netchine, I., 2013. *CDKN1C* mutation affecting the PCNA-binding domain as a cause of familial Russell Silver syndrome. *J. Med. Genet.* 50, 823–830. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-101691>
37. Bultje, R.S., Castaneda-Castellanos, D.R., Jan, L.Y., Jan, Y.-N., Kriegstein, A.R., Shi, S.-H., 2009. Mammalian Par3 regulates progenitor cell asymmetric division via Notch signaling in the developing neocortex. *Neuron* 63, 189–202. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.07.004>
38. Bury, M., Le Calvé, B., Ferbeyre, G., Blank, V., Lessard, F., 2021. New Insights into CDK Regulators: Novel Opportunities for Cancer Therapy. *Trends Cell Biol* May;31(5):331-344. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.01.010>.
39. 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* 13;25(28):6533–8. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0778-05.2005>.
40. Calegari, F., Huttner, W.B., 2003. An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. *J Cell Sci* 15;116(Pt 24):4947-55. <https://doi.org/10.1242/jcs.00825>.
41. Campbell, G.J., Hands, E.L., Van De Pette, M., 2020. The Role of CDKs and CDKIs in Murine Development. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 5343. <https://doi.org/10.3390/ijms21155343>
42. Cao, J., Packer, J.S., Ramani, V., Cusanovich, D.A., Huynh, C., Daza, R., Qiu, X., Lee, C., Furlan, S.N., Steemers, F.J., Adey, A., Waterston, R.H., Trapnell, C., Shendure, J., 2017. Comprehensive single-cell transcriptional profiling of a multicellular organism. *Science* 357, 661–667. <https://doi.org/10.1126/science.aam8940>
43. Cardozo, M.J., Mysiak, K.S., Becker, T., Becker, C.G., 2017. Reduce, reuse, recycle – Developmental signals in spinal cord regeneration. *Dev. Biol.* 432, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.05.011>
44. Castro, D.S., Guillemot, F., 2011. Old and new functions of proneural factors revealed by the genome-wide characterization of their transcriptional targets. *Cell Cycle* 10, 4026–4031. <https://doi.org/10.4161/cc.10.23.18578>
45. Castro, D.S., Skowronska-Krawczyk, D., Armant, O., Donaldson, I.J., Parras, C., Hunt, C., Critchley, J.A., Nguyen, L., Gossler, A., Göttgens, B., Matter, J.-M., Guillemot, F., 2006. Proneural bHLH and Brn proteins coregulate a neurogenic program through cooperative binding to a conserved DNA motif. *Dev. Cell* 11, 831–844. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.10.006>
46. Catala, M., Teillet, M.-A., Robertis, E.M.D., Douarin, N.M.L., 1996. A spinal cord fate map in the avian embryo: while regressing, Hensen’s node lays down the notochord and floor plate thus joining the spinal cord lateral walls. *Development* 122, 2599–2610. <https://doi.org/10.1242/dev.122.9.2599>
47. Cerrato, F., De Crescenzo, A., Riccio, A., 2014. Looking for CDKN1C enhancers. *Eur. J. Hum. Genet.* 22, 442–443. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.234>

48. Chen, C., Fingerhut, J.M., Yamashita, Y.M., 2016. The Ins(ide) and Outs(ide) of Asymmetric Stem Cell Division. *Curr. Opin. Cell Biol.* 43, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.06.001>
49. Chenn, A., McConnell, S.K., 1995. Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell* 82, 631–641. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90035-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90035-7)
50. Chung, M., Liu, C., Yang, H.W., Köberlin, M.S., Cappell, S.D., Meyer, T., 2019. Transient Hysteresis in CDK4/6 Activity Underlies Passage of the Restriction Point in G1. *Mol Cell.* 2019 Nov 21;76(4):562-573.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.020>.
51. Cioffi, M., Trabulo, S.M., Sanchez-Ripoll, Y., Miranda-Lorenzo, I., Lonardo, E., Dorado, J., Reis Vieira, C., Ramirez, J.C., Hidalgo, M., Aicher, A., Hahn, S., Sainz, B., Heeschen, C., 2015. The miR-17-92 cluster counteracts quiescence and chemoresistance in a distinct subpopulation of pancreatic cancer stem cells. *Gut* 64, 1936–1948. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308470>
52. Conklin, E.G., 1905. Mosaic development in ascidian eggs. *J. Exp. Zool.* 2, 145–223. <https://doi.org/10.1002/jez.1400020202>
53. Coronado, D., Godet, M., Bourillot, P.-Y., Tapponnier, Y., Bernat, A., Petit, M., Afanassieff, M., Markossian, S., Malashicheva, A., Iacone, R., Anastassiadis, K., Savatier, P., 2013. A short G1 phase is an intrinsic determinant of naïve embryonic stem cell pluripotency. *Stem Cell Res.* 10, 118–131. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2012.10.004>
54. Creff, J., Besson, A., 2020. Functional Versatility of the CDK Inhibitor p57Kip2. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 584590. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.584590>
55. Cubas, P., de Celis, J.F., Campuzano, S., Modolell, J., 1991. Proneural clusters of achaete-scute expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc. *Genes Dev.* 5, 996–1008. <https://doi.org/10.1101/gad.5.6.996>
56. Cucciolla, V., Borriello, A., Criscuolo, M., Sinisi, A.A., Bencivenga, D., Tramontano, A., Scudieri, A.C., Oliva, A., Zappia, V., Ragione, F.D., 2007. Histone deacetylase inhibitors upregulate p57Kip2 level by enhancing its expression through Sp1 transcription factor. *Carcinogenesis* 29, 560–567. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn010>
57. Dalton, S., 2015. Linking the Cell Cycle to Cell Fate Decisions. *Trends Cell Biol.* 25, 592–600. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.007>
58. Del Bene, F., Wehman, A.M., Link, B.A., Baier, H., 2008. Regulation of neurogenesis by interkinetic nuclear migration through an apical-basal notch gradient. *Cell* 134, 1055–1065. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.017>
59. Delile, J., Rayon, T., Melchionda, M., Edwards, A., Briscoe, J., Sagner, A., 2019a. Single cell transcriptomics reveals spatial and temporal dynamics of gene expression in the developing mouse spinal cord. *Development* dev.173807. <https://doi.org/10.1242/dev.173807>

60. Deng, Q., Wang, H., 2022. Re-visiting the principles of apicobasal polarity in *Drosophila* neural stem cells. *Dev. Biol.* 484, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2022.02.006>
61. Doe, C.Q., 2017. Temporal Patterning in the *Drosophila* CNS. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 33, 219–240. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125210>
62. Dong, Z., Yang, N., Yeo, S.-Y., Chitnis, A., Guo, S., 2012. Intralineaage Directional Notch Signaling Regulates Self-Renewal and Differentiation of Asymmetrically Dividing Radial Glia. *Neuron* 74, 65–78. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.01.031>
63. Duquesnes, N., Callot, C., Jeannot, P., Daburon, V., Nakayama, K.I., Manenti, S., Davy, A., Besson, A., 2016. p57^{Kip2} knock-in mouse reveals CDK-independent contribution in the development of Beckwith-Wiedemann syndrome: CDK-independent contribution of p57 in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J. Pathol.* 239, 250–261. <https://doi.org/10.1002/path.4721>
64. Dyer, M.A., Cepko, C.L., 2000. p57Kip2 regulates progenitor cell proliferation and amacrine interneuron development in the mouse retina. *Development* 127, 3593–3605. <https://doi.org/10.1242/dev.127.16.3593>
65. Edelstein, A., Amodaj, N., Hoover, K., Vale, R., Stuurman, N., 2010. Computer control of microscopes using μ Manager. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Chapter 14, Unit14.20. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1420s92>
66. Eggermann, T., Binder, G., Brioude, F., Maher, E.R., Lapunzina, P., Cubellis, M.V., Bergadá, I., Prawitt, D., Begemann, M., 2014. CDKN1C mutations: two sides of the same coin. *Trends Mol. Med.* 20, 614–622. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.09.001>
67. Elias, L.A.B., Kriegstein, A.R., 2008. Gap junctions: multifaceted regulators of embryonic cortical development. *Trends Neurosci.* 31, 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.02.007>
68. Eliasson, P., Rehn, M., Hammar, P., Larsson, P., Sirenko, O., Flippin, L.A., Cammenga, J., Jönsson, J.-I., 2010. Hypoxia mediates low cell-cycle activity and increases the proportion of long-term-reconstituting hematopoietic stem cells during in vitro culture. *Exp. Hematol.* 38, 301-310.e2. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2010.01.005>
69. Engeland, K., 2022. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ* May;29(5):946-960. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00988-z>.
70. Engler, A., Zhang, R., Taylor, V., 2018. Notch and Neurogenesis, in: Borggreffe, T., Giaimo, B.D. (Eds.), *Molecular Mechanisms of Notch Signaling, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 223–234. https://doi.org/10.1007/978-3-319-89512-3_11
71. Figliola, R., Busanello, A., Vaccarello, G., Maione, R., 2008. Regulation of p57KIP2 during Muscle Differentiation: Role of Egr1, Sp1 and DNA Hypomethylation. *J. Mol. Biol.* 380, 265–277. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.05.004>

72. Fischer, E., Morin, X., 2021. Fate restrictions in embryonic neural progenitors. *Curr. Opin. Neurobiol., Developmental Neuroscience* 66, 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.10.014>
73. Flemming, W.Z., 1882. *Kern und Zelltheilung*; Von Verlag. Leipzig, Vogel.
74. Florio, M., Leto, K., Muzio, L., Tinterri, A., Badaloni, A., Croci, L., Zordan, P., Barili, V., Albieri, I., Guillemot, F., Rossi, F., Consalez, G.G., 2012. Neurogenin 2 regulates progenitor cell-cycle progression and Purkinje cell dendritogenesis in cerebellar development. *Dev. Camb. Engl.* 139, 2308–2320. <https://doi.org/10.1242/dev.075861>
75. 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 Dayt. Ohio* 24, 547–556. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0194>
76. Fornari, F., Gramantieri, L., Ferracin, M., Veronese, A., Sabbioni, S., Calin, G.A., Grazi, G.L., Giovannini, C., Croce, C.M., Bolondi, L., Negrini, M., 2008. MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 27, 5651–5661. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.178>
77. 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>
78. Fujita, S., 1962. Kinetics of cellular proliferation. *Exp. Cell Res.* 28, 52–60. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(62\)90311-7](https://doi.org/10.1016/0014-4827(62)90311-7)
79. Furutachi, S., Matsumoto, A., Nakayama, K.I., Gotoh, Y., 2013. p57 controls adult neural stem cell quiescence and modulates the pace of lifelong neurogenesis. *EMBO J.* 32, 970–981. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.50>
80. Gao, P., Postiglione, M.P., Krieger, T.G., Hernandez, L., Wang, C., Han, Z., Streicher, C., Pampusheva, E., Insolera, R., Chugh, K., Kodish, O., Huang, K., Simons, B.D., Luo, L., Hippenmeyer, S., Shi, S.-H., 2014. Deterministic Progenitor Behavior and Unitary Production of Neurons in the Neocortex. *Cell* 159, 775–788. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.027>
81. García-Bellido, A., de Celis, J.F., 2009. The complex tale of the achaete-scute complex: a paradigmatic case in the analysis of gene organization and function during development. *Genetics* 182, 631–639. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.104083>
82. Gavet, O., Pines, J., 2010. Activation of cyclin B1–Cdk1 synchronizes events in the nucleus and the cytoplasm at mitosis. *J. Cell Biol.* 189, 247–259. <https://doi.org/10.1083/jcb.200909144>
83. Georgia, S., Soliz, R., Li, M., Zhang, P., Bhushan, A., 2006. p57 and Hes1 coordinate cell cycle exit with self-renewal of pancreatic progenitors. *Dev. Biol.* 298, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.05.036>
84. Gilardi, C., Kalebic, N., 2021. The Ferret as a Model System for Neocortex Development and Evolution. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 661759. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.661759>

85. Gopinathan, L., Ratnacaram, C.K., Kaldis, P., 2011. Established and Novel Cdk/Cyclin Complexes Regulating the Cell Cycle and Development, in: Kubiak, J.Z. (Ed.), *Cell Cycle in Development, Results and Problems in Cell Differentiation*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 365–389. https://doi.org/10.1007/978-3-642-19065-0_16
86. Gosselet, F.P., Magnaldo, T., Culerrier, R.M., Sarasin, A., Ehrhart, J.-C., 2007. BMP2 and BMP6 control p57Kip2 expression and cell growth arrest/terminal differentiation in normal primary human epidermal keratinocytes. *Cell. Signal.* 19, 731–739. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.09.006>
87. Goto, T., Mitsuhashi, T., Takahashi, T., 2005. Altered Patterns of Neuron Production in the p27Kip1 Knockout Mouse. *Dev. Neurosci.* 26, 208–217. <https://doi.org/10.1159/000082138>
88. 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>
89. Gratton, M.-O., Torban, E., Jasmin, S.B., Theriault, F.M., German, M.S., Stifani, S., 2003. Hes6 promotes cortical neurogenesis and inhibits Hes1 transcription repression activity by multiple mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* 23, 6922–6935. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.19.6922-6935.2003>
90. Gu, Y., Turck, C.W., Morgan, D.O., 1993. Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* 366, 707–710. <https://doi.org/10.1038/366707a0>
91. Gui, H., Li, S., Matisse, M.P., 2007. A cell-autonomous requirement for Cip/Kip Cyclin-kinase inhibitors in regulating the timing of neuronal cell cycle exit but not differentiation in the developing spinal cord. *Dev. Biol.* 301, 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.10.035>
92. Guo, H., Tian, T., Nan, K., Wang, W., 2010. p57: A multifunctional protein in cancer (Review). *Int. J. Oncol.* 36, 1321–1329. https://doi.org/10.3892/ijo_00000617
93. Hamburger, V., Hamilton, H.L., 1992. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 195, 231–272. <https://doi.org/10.1002/aja.1001950404>
94. Hansen, A.H., Duellberg, C., Mieck, C., Loose, M., Hippenmeyer, S., 2017. Cell Polarity in Cerebral Cortex Development-Cellular Architecture Shaped by Biochemical Networks. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 176. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00176>
95. 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>
96. Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., Elledge, S.J., 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805–816. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90499-g](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90499-g)

97. Harrington, M.J., Hong, E., Brewster, R., 2009. Comparative analysis of neurulation: First impressions do not count: WAYS TO MAKE A NEURAL TUBE. *Mol. Reprod. Dev.* 76, 954–965. <https://doi.org/10.1002/mrd.21085>
98. Hartwell, L.H., 2002. NOBEL LECTURE: Yeast and Cancer. *Biosci. Rep.* 22, 373–394. <https://doi.org/10.1023/A:1020918107706>
99. Hashimoto, Y., Kohri, K., Kaneko, Y., Morisaki, H., Kato, T., Ikeda, K., Nakanishi, M., 1998. Critical Role for the 310 Helix Region of p57Kip2 in Cyclin-dependent Kinase 2 Inhibition and Growth Suppression. *J. Biol. Chem.* 273, 16544–16550. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.26.16544>
100. Hatada, I., Mukai, T., n.d. Genomic imprinting of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor, in mouse.
101. Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W., Huttner, W.B., 2004. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3196–3201. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308600100>
102. He, J., Zhang, G., Almeida, A.D., Cayouette, M., Simons, B.D., Harris, W.A., 2012a. How Variable Clones Build an Invariant Retina. *Neuron* 75, 786–798. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.033>
103. Heinen, A., Kremer, D., Hartung, H.-P., Küry, P., 2008. p57^{kip2}'s role beyond Schwann cell cycle control. *Cell Cycle* 7, 2781–2786. <https://doi.org/10.4161/cc.7.18.6629>
104. Henke, R.M., Meredith, D.M., Borromeo, M.D., Savage, T.K., Johnson, J.E., 2009. Ascl1 and Neurog2 form novel complexes and regulate Delta-like3 (Dll3) expression in the neural tube. *Dev. Biol.* 328, 529–540. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.01.007>
105. Hevia, C.F., Engel-Pizcueta, C., Udina, F., Pujades, C., 2022. The neurogenic fate of the hindbrain boundaries relies on Notch3-dependent asymmetric cell divisions. *Cell Rep.* 39, 110915. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110915>
106. Hlavová, M., Čížková, M., Vítová, M., Bišová, K., Zachleder, V., 2011. DNA damage during G2 phase does not affect cell cycle progression of the green alga *Scenedesmus quadricauda*. *PLoS One* 2011;6(5):e19626. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019626>.
107. Holder, J., Mohammed, S., Barr, F.A., 2020. Ordered dephosphorylation initiated by the selective proteolysis of cyclin B drives mitotic exit. *Elife* 1;9:e59885. <https://doi.org/10.7554/eLife.59885>.
108. Holland, A.J., Lan, W., Cleveland, D.W., 2010. Centriole duplication. *Cell Cycle* 9, 2731–2736. <https://doi.org/10.4161/cc.9.14.12184>
109. Howard, A., Pelc, S.R., 1953. Synthesis of Deoxyribonucleic Acid in Normal and Irradiated Cells and Its Relation to Chromosome Breakage. *Heredity* 6, 261–273.

110. Howard, A., Pelc, S.R., 1951. Synthesis of nucleoprotein in bean root cells. *Nature* 167, 599–600.
111. Huang, Y., Yoon, M.-K., Otieno, S., Lelli, M., Kriwacki, R.W., 2015. The Activity and Stability of the Intrinsically Disordered Cip/Kip Protein Family Are Regulated by Non-Receptor Tyrosine Kinases. *J. Mol. Biol.* 427, 371–386. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.11.011>
112. Hunt, T., 2002. NOBEL LECTURE: Protein Synthesis, Proteolysis, and Cell Cycle Transitions. *Biosci. Rep.* 22, 465–486. <https://doi.org/10.1023/A:1022077317801>
113. Iacopetti, P., Michelini, M., Stuckmann, I., Oback, B., Aaku-Saraste, E., Huttner, W.B., 1999. Expression of the antiproliferative gene TIS21 at the onset of neurogenesis identifies single neuroepithelial cells that switch from proliferative to neuron-generating division. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 4639–4644. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.8.4639>
114. Iavarone, A., Massagué, J., 1997. Repression of the CDK activator Cdc25A and cell-cycle arrest by cytokine TGF-beta in cells lacking the CDK inhibitor p15. *Nature.* <https://doi.org/10.1038/387417a0>.
115. Itoh, Y., Masuyama, N., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Gotoh, Y., 2007. The Cyclin-dependent Kinase Inhibitors p57 and p27 Regulate Neuronal Migration in the Developing Mouse Neocortex. *J. Biol. Chem.* 282, 390–396. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609944200>
116. Javaherian, A., Kriegstein, A., 2009. A stem cell niche for intermediate progenitor cells of the embryonic cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* 19 Suppl 1, i70–77. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhp029>
117. Jia, H., Cong, Q., Chua, J.F.L., Liu, H., Xia, X., Zhang, X., Lin, J., Habib, S.L., Ao, J., Zuo, Q., Fu, C., Li, B., 2015. p57Kip2 is an unrecognized DNA damage response effector molecule that functions in tumor suppression and chemoresistance. *Oncogene* 34, 3568–3581. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.287>
118. Jia, J., Lin, M., Zhang, L., York, J.P., Zhang, P., 2007. The Notch Signaling Pathway Controls the Size of the Ocular Lens by Directly Suppressing p57^{Kip2} Expression. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7236–7247. <https://doi.org/10.1128/MCB.00780-07>
119. Joseph, B., Andersson, E.R., Vlachos, P., Södersten, E., Liu, L., Teixeira, A.I., Hermanson, O., 2009. p57Kip2 is a repressor of Mash1 activity and neuronal differentiation in neural stem cells. *Cell Death Differ.* 16, 1256–1265. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.72>
120. Joseph, B., Wallén-Mackenzie, Å., Benoit, G., Murata, T., Joodmardi, E., Okret, S., Perlmann, T., 2003. p57^{Kip2} cooperates with Nurr1 in developing dopamine cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 15619–15624. <https://doi.org/10.1073/pnas.2635658100>
121. Kageyama, R., Shimojo, H., Imayoshi, I., 2015. Dynamic expression and roles of Hes factors in neural development. *Cell Tissue Res.* 359, 125–133. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1888-7>

122. Kalous, J., Aleshkina, D., 2023. Multiple Roles of PLK1 in Mitosis and Meiosis. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells12010187>.
123. Kamura, T., Hara, T., Kotoshiba, S., Yada, M., Ishida, N., Imaki, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Nakayama, K.I., 2003a. Degradation of p57Kip2 mediated by SCFSkp2-dependent ubiquitylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10231–10236. <https://doi.org/10.1073/pnas.1831009100>
124. Katajisto, P., Döhla, J., Chaffer, C., Pentimikko, N., Marjanovic, N., Iqbal, S., Zoncu, R., Chen, W., Weinberg, R.A., Sabatini, D.M., 2015. Asymmetric apportioning of aged mitochondria between daughter cells is required for stemness. *Science* 348, 340–343. <https://doi.org/10.1126/science.1260384>
125. Kaufmann, L.T., Gierl, M.S., Niehrs, C., 2011. Gadd45a, Gadd45b and Gadd45g expression during mouse embryonic development. *Gene Expr. Patterns GEP* 11, 465–470. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2011.07.005>
126. Kaulich, M., Link, V.M., JD, L., Jr, Lee, Y.J., Glass, C.K., Gonzalez, D.J., Dowdy, S.F., 2021. A Cdk4/6-dependent phosphorylation gradient regulates the early to late G1 phase transition. *Sci Rep*. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94200-w>.
127. Kavanagh, E., Joseph, B., 2011. The hallmarks of CDKN1C (p57, KIP2) in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1816, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2011.03.002>
128. 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>
129. Kikuchi, T., Toyota, M., Itoh, F., Suzuki, H., Obata, T., Yamamoto, H., Kakiuchi, H., Kusano, M., Issa, J.-P.J., Tokino, T., Imai, K., 2002. Inactivation of p57KIP2 by regional promoter hypermethylation and histone deacetylation in human tumors. *Oncogene* 21, 2741–2749. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205376>
130. Knust, E., Campos-Ortega, J.A., 1989. The molecular genetics of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 11, 95–100. <https://doi.org/10.1002/bies.950110405>
131. Kõivomägi, M., Ord, M., Iofik, A., Valk, E., Venta, R., Faustova, I., Kivi, R., Balog, E.R., Rubin, S.M., Loog, M., 2013. Multisite phosphorylation networks as signal processors for Cdk1. *Nat Struct Mol Biol*. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2706>.
132. 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>
133. Kosodo, Y., Suetsugu, T., Suda, M., Mimori-Kiyosue, Y., Toida, K., Baba, S.A., Kimura, A., Matsuzaki, F., 2011. Regulation of interkinetic nuclear migration by cell cycle-coupled active and passive mechanisms in the developing brain. *EMBO J.* 30, 1690–1704. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.81>

134. Koyano-Nakagawa, N., Kim, J., Anderson, D., Kintner, C., 2000. Hes6 acts in a positive feedback loop with the neurogenins to promote neuronal differentiation. *Development* 127, 4203–4216. <https://doi.org/10.1242/dev.127.19.4203>
135. Kraut, R., Chia, W., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Knoblich, J.A., 1996. Role of *inscuteable* in orienting asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Nature* 383, 50–55. <https://doi.org/10.1038/383050a0>
136. Kressmann, S., Campos, C., Castanon, I., Fürthauer, M., González-Gaitán, M., 2015. Directional Notch trafficking in Sara endosomes during asymmetric cell division in the spinal cord. *Nat. Cell Biol.* 17, 333–339. <https://doi.org/10.1038/ncb3119>
137. LaBaer, J., Garrett, M.D., Stevenson, L.F., Slingerland, J.M., Sandhu, C., Chou, H.S., Fattaey, A., Harlow, E., 1997. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev.* 11, 847–862. <https://doi.org/10.1101/gad.11.7.847>
138. Lacomme, M., Liaubet, L., Pituello, F., Bel-Vialar, S., 2012. NEUROG2 drives cell cycle exit of neuronal precursors by specifically repressing a subset of cyclins acting at the G1 and S phases of the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* 32, 2596–2607. <https://doi.org/10.1128/MCB.06745-11>
139. Lai, H.C., Seal, R.P., Johnson, J.E., 2016. Making sense out of spinal cord somatosensory development. *Dev. Camb. Engl.* 143, 3434–3448. <https://doi.org/10.1242/dev.139592>
140. Lajtha, L.G., 1963. On the concept of the cell cycle. *J Cell Comp Physiol* 62, 143–145.
141. Lajtha, L.G., Oliver, R., Ellis, F., 1954. Incorporation of ³²P and Adenine ¹⁴C into DNA by Human Bone Marrow Cells In Vitro. *Br. J. Cancer* 8, 367–379. <https://doi.org/10.1038/bjc.1954.38>
142. Lakomá, J., Garcia-Alonso, L., Luque, J.M., 2011. Reelin sets the pace of neocortical neurogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 138, 5223–5234. <https://doi.org/10.1242/dev.063776>
143. Lange, C., Calegari, F., 2010. Cdks and cyclins link G1 length and differentiation of embryonic, neural and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle* 9, 1893–1900. <https://doi.org/10.4161/cc.9.10.11598>
144. 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>
145. Lawson, A., Anderson, H., Schoenwolf, G.C., 2001. Cellular mechanisms of neural fold formation and morphogenesis in the chick embryo. *Anat. Rec.* 262, 153–168. [https://doi.org/10.1002/1097-0185\(20010201\)262:2<153::AID-AR1021>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1097-0185(20010201)262:2<153::AID-AR1021>3.0.CO;2-W)

146. 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. *J. Cell Biol.* 204, 591–605. <https://doi.org/10.1083/jcb.201307031>
147. Lee, M.G., Nurse, P., 1987. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature* 7-13;327(6117):31–5. <https://doi.org/10.1038/327031a0>.
148. Lee, M.H., Reynisdóttir, I., Massagué, J., 1995. Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev.* 9, 639–649. <https://doi.org/10.1101/gad.9.6.639>
149. Lehmann, N., 2021. Development of bioinformatics tools for single-cell transcriptomics applied to the search for signatures of symmetric versus asymmetric division mode in neural progenitors (These de doctorat). Université Paris sciences et lettres.
150. Lehmann, N., Perrin, S., Wallon, C., Bauquet, X., Deshaies, V., Firmo, C., Du, R., Berthelie, C., Hernandez, C., Michaud, C., Thieffry, D., Crom, S.L., Thomas-Chollier, M., Jourdain, L., 2021. Eoulsan 2: an efficient workflow manager for reproducible bulk, long-read and single-cell transcriptomics analyses. <https://doi.org/10.1101/2021.10.13.464219>
151. Lehtinen, M.K., Bjornsson, C.S., Dymecki, S.M., Gilbertson, R.J., Holtzman, D.M., Monuki, E.S., 2013. The choroid plexus and cerebrospinal fluid: emerging roles in development, disease, and therapy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 17553–17559. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3258-13.2013>
152. Lehtinen, M.K., Walsh, C.A., 2011. Neurogenesis at the brain-cerebrospinal fluid interface. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 653–679. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154026>
153. 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>
154. Li, X., Andrusivova, Z., Czarnewski, P., Langseth, C.M., Andersson, A., Liu, Y., Gyllborg, D., Braun, E., Larsson, L., Hu, L., Alekseenko, Z., Lee, H., Avenel, C., Kallner, H.K., Åkesson, E., Adameyko, I., Nilsson, M., Linnarsson, S., Lundberg, J., Sundström, E., 2023. Profiling spatiotemporal gene expression of the developing human spinal cord and implications for ependymoma origin. *Nat. Neurosci.* 26, 891–901. <https://doi.org/10.1038/s41593-023-01312-9>
155. Liao, E.S., Jin, S., Chen, Y.-C., Liu, W.-S., Calon, M., Nedelec, S., Nie, Q., Chen, J.-A., 2023. Single-cell transcriptomic analysis reveals diversity within mammalian spinal motor neurons. *Nat. Commun.* 14, 46. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35574-x>
156. Lim, S., Kaldis, P., 2013. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* 140, 3079–3093. <https://doi.org/10.1242/dev.091744>

157. Lim, S., Kaldis, P., 2012. Loss of Cdk2 and Cdk4 induces a switch from proliferation to differentiation in neural stem cells. *Stem Cells* Jul;30(7):1509-20. <https://doi.org/10.1002/stem.1114>.
158. Lindqvist, A., Rodríguez-Bravo, V., Medema, R.H., 2009. The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *J. Cell Biol.* 185, 193–202. <https://doi.org/10.1083/jcb.200812045>
159. 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>
160. Liu, L., Michowski, W., Kolodziejczyk, 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>
161. Liu, W.A., Chen, S., Li, Z., Lee, C.H., Mirzaa, G., Dobyns, W.B., Ross, M.E., Zhang, J., Shi, S.-H., 2018. PARD3 dysfunction in conjunction with dynamic HIPPO signaling drives cortical enlargement with massive heterotopia. *Genes Dev.* 32, 763–780. <https://doi.org/10.1101/gad.313171.118>
162. Liu, X., Hashimoto-Torii, K., Torii, M., Ding, C., Rakic, P., 2010. Gap Junctions/Hemichannels Modulate Interkinetic Nuclear Migration in the Forebrain Precursors. *J. Neurosci.* 30, 4197–4209. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4187-09.2010>
163. Liu, Z., Yang, C.-P., Sugino, K., Fu, C.-C., Liu, L.-Y., Yao, X., Lee, L.P., Lee, T., 2015. Opposing intrinsic temporal gradients guide neural stem cell production of varied neuronal fates. *Science* 350, 317–320. <https://doi.org/10.1126/science.aad1886>
164. Llorca, A., Ciceri, G., Beattie, R., Wong, F.K., Diana, G., Serafeimidou-Pouliou, E., Fernández-Otero, M., Streicher, C., Arnold, S.J., Meyer, M., Hippenmeyer, S., Maravall, M., Marin, O., 2019. A stochastic framework of neurogenesis underlies the assembly of neocortical cytoarchitecture. *eLife* 8, e51381. <https://doi.org/10.7554/eLife.51381>
165. 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 Develop.* 3, 4. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-3-4>
166. 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. *Dev. Biol.* 273, 195–209. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.05.031>
167. López-Abad, M., Iglesias-Platas, I., Monk, D., 2016. Epigenetic Characterization of CDKN1C in Placenta Samples from Non-syndromic Intrauterine Growth Restriction. *Front. Genet.* 7, 62. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00062>

168. Loyer, N., Januschke, J., 2020. Where does asymmetry come from? Illustrating principles of polarity and asymmetry establishment in *Drosophila* neuroblasts. *Curr. Opin. Cell Biol.* 62, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.07.018>
169. Lu, D.C., Niu, T., Alaynick, W.A., 2015. Molecular and cellular development of spinal cord locomotor circuitry. *Front. Mol. Neurosci.* 8, 25. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00025>
170. Lu, Z., Hunter, T., 2010. Ubiquitylation and proteasomal degradation of the p21Cip1, p27Kip1 and p57Kip2 CDK inhibitors. *Cell Cycle* 9, 2342–2352.
171. Ludlow, J.W., Glendening, C.L., Livingston, D.M., DeCarprio, J.A., 1993. Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol Jan*;13(1):367-72. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.1.367-372.1993>.
172. Lukaszewicz, A., Savatier, P., Cortay, V., Giroud, P., Huissoud, C., Berland, M., Kennedy, H., Dehay, C., 2005. G1 phase regulation, area-specific cell cycle control, and cytoarchitectonics in the primate cortex. *Neuron* 4;47(3):353-64. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.06.032>.
173. Lukaszewicz, A., Savatier, P., Cortay, V., Kennedy, H., Dehay, C., 2002. Contrasting effects of basic fibroblast growth factor and neurotrophin 3 on cell cycle kinetics of mouse cortical stem cells. *J Neurosci* 1;22(15):6610-22. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-15-06610.2002>.
174. 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>
175. Luskin, M.B., Pearlman, A.L., Sanes, J.R., 1988. Cell lineage in the cerebral cortex of the mouse studied in vivo and in vitro with a recombinant retrovirus. *Neuron* 1, 635–647. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(88\)90163-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(88)90163-8)
176. Ma, Y., Chen, L., Wright, G.M., Pillai, S.R., Chellappan, S.P., Cress, W.D., 2010. CDKN1C Negatively Regulates RNA Polymerase II C-terminal Domain Phosphorylation in an E2F1-dependent Manner. *J. Biol. Chem.* 285, 9813–9822. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.091496>
177. 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>
178. Malumbres, M., 2014. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol* 15. <https://doi.org/10.1186/gb4184>.
179. Martínez-Alonso, D., Malumbres, M., 2020. Mammalian cell cycle cyclins. *Semin Cell Dev Biol.* Epub 2020 Apr 22. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.03.009>
180. Martínez-Martínez, M.Á., De Juan Romero, C., Fernández, V., Cárdenas, A., Götz, M., Borrell, V., 2016. A restricted period for formation of outer subventricular

- zone defined by *Cdh1* and *Trnp1* levels. *Nat. Commun.* 7, 11812. <https://doi.org/10.1038/ncomms11812>
181. Matsuoka, S., Edwards, M.C., Bai, C., Parker, S., Zhang, P., Baldini, A., Harper, J.W., Elledge, S.J., 1995. p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev.* 9, 650–662. <https://doi.org/10.1101/gad.9.6.650>
182. Matsuoka, S., Kalikin, L.M., Harper, J.W., Elledge, S.J., Feinberg, A.P., 1996. Imprinting of the gene encoding a human cyclin-dependent kinase inhibitor, p57KIP2 on chromosome 11p15. *Proc Natl Acad Sci USA.*
183. Matuzelski, E., Bunt, J., Harkins, D., Lim, J.W.C., Gronostajski, R.M., Richards, L.J., Harris, L., Piper, M., 2017. Transcriptional regulation of *Nfix* by NFIB drives astrocytic maturation within the developing spinal cord. *Dev. Biol.* 432, 286–297. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.10.019>
184. Maurange, C., 2020. Temporal patterning in neural progenitors: from *Drosophila* development to childhood cancers. *Dis. Model. Mech.* 13, dmm044883. <https://doi.org/10.1242/dmm.044883>
185. 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>
186. Mishra, S., Lin, C.-L., Huang, T.H.-M., Bouamar, H., Sun, L.-Z., 2014. MicroRNA-21 inhibits p57Kip2 expression in prostate cancer. *Mol. Cancer* 13, 212. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-212>
187. Miyata, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Kawano, M., Muto, T., Ogawa, M., 2004. Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Dev. Camb. Engl.* 131, 3133–3145. <https://doi.org/10.1242/dev.01173>
188. Miyata, T., Okamoto, M., Shinoda, T., Kawaguchi, A., 2014. Interkinetic nuclear migration generates and opposes ventricular-zone crowding: insight into tissue mechanics. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 473. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00473>
189. Mohammad, F., Pandey, R.R., Nagano, T., Chakalova, L., Mondal, T., Fraser, P., Kanduri, C., 2008. *Kcnq1ot1/Lit1* noncoding RNA mediates transcriptional silencing by targeting to the perinucleolar region. *Mol. Cell. Biol.* 28, 3713–3728. <https://doi.org/10.1128/MCB.02263-07>
190. 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>
191. Molina, A., Pituello, F., 2017. Playing with the cell cycle to build the spinal cord. *Dev. Biol.* 432, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.12.022>
192. Mora-Bermúdez, F., Badsha, F., Kanton, S., Camp, J.G., Vernot, B., Köhler, K., Voigt, B., Okita, K., Maricic, T., He, Z., Lachmann, R., Pääbo, S., Treutlein, B., Huttner,

- W.B., 2016. Differences and similarities between human and chimpanzee neural progenitors during cerebral cortex development. *Elife*. <https://doi.org/10.7554/eLife.18683>.
193. Moreau, M.X., Saillour, Y., Cwetsch, A.W., Pierani, A., Causeret, F., 2021. Single-cell transcriptomics of the early developing mouse cerebral cortex disentangle the spatial and temporal components of neuronal fate acquisition. *Development* 148, dev197962. <https://doi.org/10.1242/dev.197962>
194. Morin, X., Bellaïche, Y., 2011. Mitotic Spindle Orientation in Asymmetric and Symmetric Cell Divisions during Animal Development. *Dev. Cell* 21, 102–119. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.012>
195. 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>
196. 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>
197. Moury, J.D., Schoenwolf, G.C., 1995. Cooperative model of epithelial shaping and bending during avian neurulation: Autonomous movements of the neural plate, autonomous movements of the epidermis, and interactions in the neural plate/epidermis transition zone. *Dev. Dyn.* 204, 323–337. <https://doi.org/10.1002/aja.1002040310>
198. Mumm, J.S., Kopan, R., 2000. Notch Signaling: From the Outside In. *Dev. Biol.* 228, 151–165. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9960>
199. Murai, K., Philpott, A., Jones, P.H., 2011. Hes6 is required for the neurogenic activity of neurogenin and NeuroD. *PloS One* 6, e27880. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027880>
200. 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>
201. Murray, A.W., 2004. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)01080-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)01080-8).
202. Naetar, N., Soundarapandian, V., Litovchick, L., Goguen, K.L., Sablina, A.A., Bowman-Colin, C., Sicinski, P., Hahn, W.C., DeCaprio, J.A., Livingston, D.M., 2014. PP2A-mediated regulation of Ras signaling in G2 is essential for stable quiescence and normal G1 length. *Mol. Cell* 54, 932–945. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.04.023>
203. Nerli, E., Rocha-Martins, M., Norden, C., n.d. Asymmetric neurogenic commitment of retinal progenitors involves Notch through the endocytic pathway. *eLife* 9, e60462. <https://doi.org/10.7554/eLife.60462>
204. 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>
205. Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Dammerman, R.S., Kriegstein, A.R., 2001. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409, 714–720. <https://doi.org/10.1038/35055553>
206. Noctor, S.C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L., Kriegstein, A.R., 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat. Neurosci.* 7, 136–144. <https://doi.org/10.1038/nn1172>
207. Noctor, S.C., Martínez-Cerdeño, V., Kriegstein, A.R., 2008. Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* 508, 28–44. <https://doi.org/10.1002/cne.21669>
208. Nurse, P., 2002. Cyclin dependent kinases and cell cycle control (nobel lecture. *ChemBiochem.* [https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20020703\)3:7](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20020703)3:7)
209. Nurse, P., Thuriaux, P., Nasmyth, K., 1976. Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.* MGG 146, 167–178. <https://doi.org/10.1007/BF00268085>
210. Okamoto, M., Namba, T., Shinoda, T., Kondo, T., Watanabe, T., Inoue, Y., Takeuchi, K., Enomoto, Y., Ota, K., Oda, K., Wada, Y., Sagou, K., Saito, K., Sakakibara, A., Kawaguchi, A., Nakajima, K., Adachi, T., Fujimori, T., Ueda, M., Hayashi, S., Kaibuchi, K., Miyata, T., 2013. TAG-1-assisted progenitor elongation streamlines nuclear migration to optimize subapical crowding. *Nat. Neurosci.* 16, 1556–1566. <https://doi.org/10.1038/nn.3525>
211. 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* Aug;141(16):3266-76. <https://doi.org/10.1242/dev.112623>.
212. Oosterveen, T., Kurdija, S., Ensterö, M., Uhde, C.W., Bergsland, M., Sandberg, M., Sandberg, R., Muhr, J., Ericson, J., 2013. SoxB1-driven transcriptional network underlies neural-specific interpretation of morphogen signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 7330–7335. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220010110>
213. Ortega, S., Malumbres, M., Barbacid, M., 2002. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1602, 73–87. [https://doi.org/10.1016/S0304-419X\(02\)00037-9](https://doi.org/10.1016/S0304-419X(02)00037-9)
214. Pandey, R.R., Mondal, T., Mohammad, F., Enroth, S., Redrup, L., Komorowski, J., Nagano, T., Mancini-Dinardo, D., Kanduri, C., 2008. *Kcnq1ot1* antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation. *Mol. Cell* 32, 232–246. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.08.022>
215. Paridaen, J.T.M.L., Wilsch-Bräuninger, M., Huttner, W.B., 2013. Asymmetric inheritance of centrosome-associated primary cilium membrane directs ciliogenesis after cell division. *Cell* 155, 333–344. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.060>

216. Parrilla, A., Cirillo, L., Thomas, Y., Gotta, M., Pintard, L., Santamaria, A., 2016. Mitotic entry: The interplay between Cdk1, Plk1 and Bora. *Cell Cycle Dec*;15(23):3177-3182. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1249544>.
217. 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>
218. Pearson, B.J., Doe, C.Q., 2004. Specification of temporal identity in the developing nervous system. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 619–647. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.111301.115142>
219. 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.* <https://doi.org/10.1242/dev.068569>.
220. Pelc, S.R., 1947. Autoradiograph technique. *Nature* 160, 749.
221. Pereira, G., Yamashita, Y.M., 2011. Fly meets yeast: Checking correct orientation of cell division. *Trends Cell Biol.* 21, 526–533. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.05.004>
222. Peterson, K.A., Nishi, Y., Ma, W., Vedenko, A., Shokri, L., Zhang, X., McFarlane, M., Baizabal, J.-M., Junker, J.P., van Oudenaarden, A., Mikkelsen, T., Bernstein, B.E., Bailey, T.L., Bulyk, M.L., Wong, W.H., McMahon, A.P., 2012. Neural-specific Sox2 input and differential Gli-binding affinity provide context and positional information in Shh-directed neural patterning. *Genes Dev.* 26, 2802–2816. <https://doi.org/10.1101/gad.207142.112>
223. Peunova, N., Enikolopov, G., 1995. Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature* 375, 68–73. <https://doi.org/10.1038/375068a0>
224. Pickering, J., Chinnaiya, K., Towers, M., 2019. An autoregulatory cell cycle timer integrates growth and specification in chick wing digit development. *eLife* 8, e47625. <https://doi.org/10.7554/eLife.47625>
225. Pietro, F. di, Valon, L., Li, Y., Goïame, R., Genovesio, A., Morin, X., 2017. An RNAi Screen in a Novel Model of Oriented Divisions Identifies the Actin-Capping Protein Z β as an Essential Regulator of Spindle Orientation. *Curr. Biol.* 27, 2452-2464.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.06.055>
226. Pilaz, L.J., McMahon, J.J., Miller, E.E., Lennox, A.L., Suzuki, A., Salmon, E., Silver, D.L., 2016. Prolonged Mitosis of Neural Progenitors Alters Cell Fate in the Developing Brain. *Neuron* 6;89(1):83-99. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.12.007>.
227. 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.* 106, 21924–21929. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909894106>
228. Pilz, G.-A., Shitamukai, A., Reillo, I., Pacary, E., Schwausch, J., Stahl, R., Ninkovic, J., Snippert, H.J., Clevers, H., Godinho, L., Guillemot, F., Borrell, V., Matsuzaki, F., Götz, M., 2013. Amplification of progenitors in the mammalian telencephalon includes a new radial glial cell type. *Nat. Commun.* 4, 2125. <https://doi.org/10.1038/ncomms3125>
229. Pinto, L., Mader, M.T., Irmeler, M., Gentilini, M., Santoni, F., Drechsel, D., Blum, R., Stahl, R., Bulfone, A., Malatesta, P., Beckers, J., Götz, M., 2008. Prospective isolation of functionally distinct radial glial subtypes—Lineage and transcriptome analysis. *Mol. Cell. Neurosci.* 38, 15–42. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.01.012>
230. Polyak, K., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J.M., Tempst, P., Massague, J., n.d. Cloning of ~27~@ ‘a Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor and a Potential Mediator of Extracellular Antimitogenic Signals.
231. Polyak, K., Kato, J., Roberts, J.M., Koff, A., n.d. p27 Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-13 and contact inhibition to cell cycle arrest.
232. Price, J., Thurlow, L., 1988. Cell lineage in the rat cerebral cortex: a study using retroviral-mediated gene transfer. *Dev. Camb. Engl.* 104, 473–482. <https://doi.org/10.1242/dev.104.3.473>
233. Quandt, E., Ribeiro, M.P.C., Clotet, J., 2020. Atypical cyclins: the extended family portrait. *Cell Mol Life Sci Jan;77(2):231-242.* <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03262-7>.
234. Rakic, P., 1974. Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science* 183, 425–427. <https://doi.org/10.1126/science.183.4123.425>
235. Ranawakage, D.C., Okada, K., Sugio, K., Kawaguchi, Y., Kuninobu-Bonkohara, Y., Takada, T., Kamachi, Y., 2021. Efficient CRISPR-Cas9-Mediated Knock-In of Composite Tags in Zebrafish Using Long ssDNA as a Donor. *Front. Cell Dev. Biol.* 8.
236. Ranjan, R., Snedeker, J., Chen, X., 2019. Asymmetric centromeres differentially coordinate with mitotic machinery to ensure biased sister chromatid segregation in germline stem cells. *Cell Stem Cell* 25, 666–681.e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.08.014>
237. Ray, A., Zhu, H., Ding, A., Li, X., 2022. Transcriptional and epigenetic regulation of temporal patterning in neural progenitors. *Dev. Biol.* 481, 116–128. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2021.10.006>
238. Rayon, T., Maizels, R.J., Barrington, C., Briscoe, J., 2021. Single-cell transcriptome profiling of the human developing spinal cord reveals a conserved genetic programme with human-specific features. *Development* 148, dev199711. <https://doi.org/10.1242/dev.199711>

239. Reillo, I., de Juan Romero, C., García-Cabezas, M.Á., Borrell, V., 2011. A role for intermediate radial glia in the tangential expansion of the mammalian cerebral cortex. *Cereb. Cortex* N. Y. N 1991 21, 1674–1694. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq238>
240. Riccio, O., Van Gijn, M.E., Bezdek, A.C., Pellegrinet, L., Van Es, J.H., Zimmer-Strobl, U., Strobl, L.J., Honjo, T., Clevers, H., Radtke, F., 2008. Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both Notch1 and Notch2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27^{Kip1} and p57^{Kip2}. *EMBO Rep.* 9, 377–383. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.7>
241. Ross, S.E., Greenberg, M.E., Stiles, C.D., 2003. Basic helix-loop-helix factors in cortical development. *Neuron* 39, 13–25. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00365-9](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00365-9)
242. Rossi, M.N., Andresini, O., Matteini, F., Maione, R., 2018. Transcriptional regulation of p57kip2 expression during development, differentiation and disease. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 23, 83–108. <https://doi.org/10.2741/4583>
243. Rossi, M.N., Antonangeli, F., 2015. Cellular Response upon Stress: p57 Contribution to the Final Outcome. *Mediators Inflamm.* 2015, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/259325>
244. 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* 15;43(7):1154-1165. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0825-22.2022>.
245. Rubin, S.M., Sage, J., Skotheim, J.M., 2020. Integrating Old and New Paradigms of G1/S Control. *Mol Cell* 15;80(2):183-192. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.08.020>.
246. Russo, A.A., Jeffrey, P.D., Patten, A.K., Massagué, J., Pavletich, N.P., 1996. Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A–Cdk2 complex. *Nature* 382, 325–331. <https://doi.org/10.1038/382325a0>
247. 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 Rep.* 4, 492–503. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.038>
248. Sadasivam, S., DeCaprio, J.A., 2013. The DREAM complex: master coordinator of cell cycle-dependent gene expression. *Nat Rev Cancer* Aug;13(8):585-95. <https://doi.org/10.1038/nrc3556>.
249. Sagner, A., Briscoe, J., 2019. Establishing neuronal diversity in the spinal cord: a time and a place. *Dev. Camb. Engl.* 146, dev182154. <https://doi.org/10.1242/dev.182154>
250. Sagner, A., Zhang, I., Watson, T., Lazaro, J., Melchionda, M., Briscoe, J., 2021. A shared transcriptional code orchestrates temporal patterning of the central nervous system. *PLoS Biol.* 19, e3001450. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001450>

251. Salvador, J.M., Brown-Clay, J.D., Fornace, A.J., 2013. Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 793, 1–19. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8289-5_1
252. 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>
253. Sanli, I., Feil, R., 2015. Chromatin mechanisms in the developmental control of imprinted gene expression. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 67, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.04.004>
254. 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.
255. Scandura, J.M., Boccuni, P., Massague, J., Nimer, S.D., n.d. Transforming growth factor β -induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation.
256. Schipani, E., Ryan, H.E., Didrickson, S., Kobayashi, T., Knight, M., Johnson, R.S., n.d. Hypoxia in cartilage: HIF-1 α is essential for chondrocyte growth arrest and survival.
257. Schirripa, A., Sexl, V., Kollmann, K., 2022. Cyclin-dependent kinase inhibitors in malignant hematopoiesis. *Front Oncol.* <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.916682>.
258. Schmidt, M., Rohe, A., Platzer, C., Najjar, A., Erdmann, F., Sippl, W., 2017. Regulation of G2/M Transition by Inhibition of WEE1 and PKMYT1 Kinases. *Molecules* 23;22(12):2045. <https://doi.org/10.3390/molecules22122045>.
259. Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
260. Scott, K., O'Rourke, R., Winkler, C.C., Kearns, C.A., Appel, B., 2021. Temporal single-cell transcriptomes of zebrafish spinal cord pMN progenitors reveal distinct neuronal and glial progenitor populations. *Dev. Biol.* 479, 37–50. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2021.07.010>
261. Sengupta, S., Nie, J., Wagner, R.J., Yang, C., Stewart, R., Thomson, J.A., 2009. MicroRNA 92b controls the G1/S checkpoint gene p57 in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 27, 1524–1528. <https://doi.org/10.1002/stem.84>
262. Sherr, C.J., Roberts, J.M., 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501–1512. <https://doi.org/10.1101/gad.13.12.1501>
263. Shi, Y., Liu, J.-P., 2011. Gdf11 Facilitates Temporal Progression of Neurogenesis in the Developing Spinal Cord. *J. Neurosci.* 31, 883–893. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2394-10.2011>

264. Shimojo, H., Ohtsuka, T., Kageyama, R., 2008. Oscillations in Notch Signaling Regulate Maintenance of Neural Progenitors. *Neuron* 58, 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.02.014>
265. Shin, J.-Y., Fitzpatrick, G.V., Higgins, M.J., 2008. Two distinct mechanisms of silencing by the KvDMR1 imprinting control region. *EMBO J.* 27, 168–178. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601960>
266. Shitamukai, A., Konno, D., Matsuzaki, F., 2011. Oblique radial glial divisions in the developing mouse neocortex induce self-renewing progenitors outside the germinal zone that resemble primate outer subventricular zone progenitors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 3683–3695. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4773-10.2011>
267. Sidman, R.L., Rakic, P., 1973. Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res.* 62, 1–35. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(73\)90617-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(73)90617-3)
268. Simpson, P., 1990. Notch and the choice of cell fate in *Drosophila* neuroepithelium. *Trends Genet. TIG* 6, 343–345. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(90\)90260-d](https://doi.org/10.1016/0168-9525(90)90260-d)
269. Smith, J., 1997. Neurulation: coming to closure. *Trends Neurosci.* 20, 510–517. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(97\)01121-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01121-1)
270. Smith, J.L., Schoenwolf, G.C., 1987. Cell cycle and neuroepithelial cell shape during bending of the chick neural plate. *Anat Rec Jun*;218(2):196-206. <https://doi.org/10.1002/ar.1092180215>.
271. Soriano, E., Del Río, J.A., 2005. The cells of cajal-retzius: still a mystery one century after. *Neuron* 46, 389–394. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.019>
272. Stahl, R., Walcher, T., De Juan Romero, C., Pilz, G.A., Cappello, S., Irmeler, M., Sanz-Aquela, J.M., Beckers, J., Blum, R., Borrell, V., Götz, M., 2013. *Trnp1* Regulates Expansion and Folding of the Mammalian Cerebral Cortex by Control of Radial Glial Fate. *Cell* 153, 535–549. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.027>
273. Stewart, M.C., Kadlcek, R.M., Robbins, P.D., Macleod, J.N., Ballock, R.T., 2003. Expression and Activity of the CDK Inhibitor p57Kip2 in Chondrocytes Undergoing Hypertrophic Differentiation. *J. Bone Miner. Res.* 19, 123–132. <https://doi.org/10.1359/jbmr.0301209>
274. Stubbs, D., DeProto, J., Nie, K., Englund, C., Mahmud, I., Hevner, R., Molnár, Z., 2009. Neurovascular congruence during cerebral cortical development. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* 19 Suppl 1, i32-41. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhp040>
275. Sunchu, B., Cabernard, C., 2020. Principles and mechanisms of asymmetric cell division. *Development* 147, dev167650. <https://doi.org/10.1242/dev.167650>
276. Sur, M., Rubenstein, J.L.R., 2005. Patterning and plasticity of the cerebral cortex. *Science* 310, 805–810. <https://doi.org/10.1126/science.1112070>
277. Susaki, E., Nakayama, K., Yamasaki, L., Nakayama, K.I., 2009. Common and specific roles of the related CDK inhibitors p27 and p57 revealed by a knock-in mouse

- model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 5192–5197. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811712106>
278. 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. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 10357–10371. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-23-10357.1999>
279. Takahashi, T., Nowakowski, R.S., Caviness, V.S., 1996. The Leaving or Q Fraction of the Murine Cerebral Proliferative Epithelium: A General Model of Neocortical Neuronogenesis. *J. Neurosci.* 16, 6183–6196. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-19-06183.1996>
280. Takahashi, T., Nowakowski, R.S., Caviness, V.S., 1995a. The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 6046–6057. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-09-06046.1995>
281. Takahashi, T., Nowakowski, R.S., Caviness, V.S., 1995b. Early ontogeny of the secondary proliferative population of the embryonic murine cerebral wall. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 6058–6068. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-09-06058.1995>
282. Takahashi, T., Nowakowski, R.S., Caviness, V.S., 1993. Cell cycle parameters and patterns of nuclear movement in the neocortical proliferative zone of the fetal mouse. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 13, 820–833. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-02-00820.1993>
283. Takeda, D.Y., Dutta, A., 2005. DNA replication and progression through S phase. *Oncogene* 24, 2827–2843. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208616>
284. 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>
285. Taverna, E., Huttner, W.B., 2010. Neural progenitor nuclei IN motion. *Neuron* 67, 906–914. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.027>
286. Taylor, S.R., Santpere, G., Weinreb, A., Barrett, A., Reilly, M.B., Xu, C., Varol, E., Oikonomou, P., Glenwinkel, L., McWhirter, R., Poff, A., Basavaraju, M., Rafi, I., Yemini, E., Cook, S.J., Abrams, A., Vidal, B., Cros, C., Tavazoie, S., Sestan, N., Hammarlund, M., Hobert, O., Miller, D.M., 2021. Molecular topography of an entire nervous system. *Cell* 184, 4329–4347.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.023>
287. 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>
288. Telley, L., Govindan, S., Prados, J., Stevant, I., Nef, S., Dermitzakis, E., Dayer, A., Jabaudon, D., 2016. Sequential transcriptional waves direct the differentiation of

- newborn neurons in the mouse neocortex. *Science* 351, 1443–1446. <https://doi.org/10.1126/science.aad8361>
289. Terada, Y., Tatsuka, M., Jinno, S., Okayama, H., 1995. Requirement for tyrosine phosphorylation of Cdk4 in G1 arrest induced by ultraviolet irradiation. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/376358a0>.
290. Thion, M.S., Garel, S., 2020. Microglial ontogeny, diversity and neurodevelopmental functions. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 65, 186–194. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2020.06.013>
291. Thurlings, I., Bruin, A., 2016. E2F Transcription Factors Control the Roller Coaster Ride of Cell Cycle Gene Expression. *Methods Mol Biol* 1342, 71–88. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2957-3_4.
292. Tokino, T., Urano, T., Furuhashi, T., Matsushima, M., Miyatsu, T., Sasaki, S., Nakamura, Y., 1996. Characterization of the human p57KIP2 gene: alternative splicing, insertion/deletion polymorphisms in VNTR sequences in the coding region, and mutational analysis. *Hum. Genet.* 97, 625–631. <https://doi.org/10.1007/BF02281873>
293. Topark-Ngarm, A., Golonzhka, O., Peterson, V.J., Brian, B., Martinez, B., Crofoot, K., Filtz, T.M., Leid, M., 2006. CTIP2 Associates with the NuRD Complex on the Promoter of p57KIP2, a Newly Identified CTIP2 Target Gene. *J. Biol. Chem.* 281, 32272–32283. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602776200>
294. Toyoshima, H., Hunter, T., 1994. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78, 67–74. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90573-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90573-8)
295. 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>
296. Tsunekawa, Y., Britto, J.M., Takahashi, M., Polleux, F., Tan, S.-S., Osumi, N., 2012. Cyclin D2 in the basal process of neural progenitors is linked to non-equivalent cell fates: Cyclin D2 inheritance is associated with asymmetric cell fate. *EMBO J.* 31, 1879–1892. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.43>
297. 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>
298. Tury, A., Mairet-Coello, G., DiCicco-Bloom, E., 2011. The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p57Kip2 Regulates Cell Cycle Exit, Differentiation, and Migration of Embryonic Cerebral Cortical Precursors. *Cereb. Cortex* 21, 1840–1856. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhq254>
299. Urbán, N., Guillemot, F., 2014. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front. Cell. Neurosci.* 8.

300. Uzbekov, R., Prigent, C., 2022. A Journey through Time on the Discovery of Cell Cycle Regulation. *Cells* 11, 704. <https://doi.org/10.3390/cells11040704>
301. Vernon, A.E., Devine, C., Philpott, A., 2003. The cdk inhibitor p27Xic1 is required for differentiation of primary neurones in *Xenopus*. *Dev. Camb. Engl.* 130, 85–92. <https://doi.org/10.1242/dev.00193>
302. Vlachos, P., Joseph, B., 2009. The Cdk inhibitor p57Kip2 controls LIM-kinase 1 activity and regulates actin cytoskeleton dynamics. *Oncogene* 28, 4175–4188. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.269>
303. von Bartheld, C.S., 2018. Myths and truths about the cellular composition of the human brain: A review of influential concepts. *J. Chem. Neuroanat.* 93, 2–15. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2017.08.004>
304. von Bartheld, C.S., Bahney, J., Herculano-Houzel, S., 2016. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J. Comp. Neurol.* 524, 3865–3895. <https://doi.org/10.1002/cne.24040>
305. von Waechter, R., Jaensch, B., 1972. Generation times of the matrix cells during embryonic brain development: an autoradiographic study in rats. *Brain Res.* 46, 235–250. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(72\)90018-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(72)90018-2)
306. Walsh, C., Cepko, C.L., 1988. Clonally related cortical cells show several migration patterns. *Science* 241, 1342–1345. <https://doi.org/10.1126/science.3137660>
307. Walton, N.M., Sutter, B.M., Laywell, E.D., Levkoff, L.H., Kearns, S.M., Marshall, G.P., Scheffler, B., Steindler, D.A., 2006. Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia* 54, 815–825. <https://doi.org/10.1002/glia.20419>
308. Wang, L., Zhang, R., You, X., Zhang, H., Wei, S., Cheng, T., Cao, Q., Wang, Z., Chen, Y., 2017. The steady-state level of CDK4 protein is regulated by antagonistic actions between PAQR4 and SKP2 and involved in tumorigenesis. *J. Mol. Cell Biol.* 9, 409–421. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjx028>
309. Wang, X., Tsai, J.-W., Imai, J.H., Lian, W.-N., Vallee, R.B., Shi, S.-H., 2009. Asymmetric centrosome inheritance maintains neural progenitors in neocortex. *Nature* 461, 947–955. <https://doi.org/10.1038/nature08435>
310. Wang, X., Tsai, J.-W., LaMonica, B., Kriegstein, A.R., 2011. A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex. *Nat. Neurosci.* 14, 555–561. <https://doi.org/10.1038/nn.2807>
311. Watanabe, H., Pan, Z.-Q., Schreiber-Agus, N., DePinho, R.A., Hurwitz, J., Xiong, Y., 1998. Suppression of cell transformation by the cyclin-dependent kinase inhibitor p57^{KIP2} requires binding to proliferating cell nuclear antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 1392–1397. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1392>
312. Watson, S., Serrate, C., Vignot, S., 2010. Voie de signalisation Sonic Hedgehog : du développement embryonnaire aux thérapies moléculaires ciblées. *Bull. Cancer (Paris)* 97, 1477–1483. <https://doi.org/10.1684/bdc.2010.1231>

313. White, J., Dalton, S., 2005. Cell cycle control of embryonic stem cells. *Stem Cell Rev.* 1, 131–138. <https://doi.org/10.1385/SCR:1:2:131>
314. Wilcock, A.C., Swedlow, J.R., Storey, K.G., 2007. Mitotic spindle orientation distinguishes stem cell and terminal modes of neuron production in the early spinal cord. *Development* 134, 1943–1954. <https://doi.org/10.1242/dev.002519>
315. Wilson, S.I., Edlund, T., 2001. Neural induction: toward a unifying mechanism. *Nat. Neurosci.* 4, 1161–1168. <https://doi.org/10.1038/nn747>
316. Wooten, M., Ranjan, R., Chen, X., 2020. Asymmetric Histone Inheritance in Asymmetrically Dividing Stem Cells. *Trends Genet. TIG* 36, 30–43. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.10.004>
317. Yan, Y., Frisén, J., Lee, M.H., Massagué, J., Barbacid, M., 1997. Ablation of the CDK inhibitor p57Kip2 results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development. *Genes Dev.* 11, 973–983. <https://doi.org/10.1101/gad.11.8.973>
318. Ye, W., Mairet-Coello, G., Pasoreck, E., DiCicco-Bloom, E., 2009. Patterns of p57Kip2 Expression in Embryonic Rat Brain Suggest Roles in Progenitor Cell Cycle Exit and Neuronal Differentiation. *Dev. Neurobiol.* 69, 1. <https://doi.org/10.1002/dneu.20680>
319. Yokoo, T., Toyoshima, H., Miura, M., Wang, Y., Iida, K.T., Suzuki, H., Sone, H., Shimano, H., Gotoda, T., Nishimori, S., Tanaka, K., Yamada, N., 2003. p57Kip2 Regulates Actin Dynamics by Binding and Translocating LIM-kinase 1 to the Nucleus. *J. Biol. Chem.* 278, 52919–52923. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309334200>
320. Zalc, A., Hayashi, S., Auradé, F., Bröhl, D., Chang, T., Mademtzoglou, D., Mourikis, P., Yao, Z., Cao, Y., Birchmeier, C., Relaix, F., 2014. Antagonistic regulation of p57kip2 by Hes/Hey downstream of Notch signaling and muscle regulatory factors regulates skeletal muscle growth arrest. *Development* 141, 2780–2790. <https://doi.org/10.1242/dev.110155>
321. Zechner, C., Nerli, E., Norden, C., 2020. Stochasticity and determinism in cell fate decisions. *Development* 147, dev181495. <https://doi.org/10.1242/dev.181495>
322. Zeisel, A., Hochgerner, H., Lönnerberg, P., Johnsson, A., Memic, F., van der Zwan, J., Häring, M., Braun, E., Borm, L.E., La Manno, G., Codeluppi, S., Furlan, A., Lee, K., Skene, N., Harris, K.D., Hjerling-Leffler, J., Arenas, E., Ernfors, P., Marklund, U., Linnarsson, S., 2018. Molecular Architecture of the Mouse Nervous System. *Cell* 174, 999–1014.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.021>
323. Zhang, E., Yin, D., Han, L., He, X., Si, X., Chen, W., Xia, R., Xu, T., Gu, D., De, W., Guo, R., Xu, Z., Chen, J., 2016. E2F1-induced upregulation of long noncoding RNA LINC00668 predicts a poor prognosis of gastric cancer and promotes cell proliferation through epigenetically silencing of CKIs. *Oncotarget* 7, 23212–23226. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6745>
324. Zhang, P., Liégeois, N.J., Wong, C., Finegold, M., Hou, H., Thompson, J.C., Silverman, A., Harper, J.W., DePinho, R.A., Elledge, S.J., 1997. Altered cell

- differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* 387, 151–158. <https://doi.org/10.1038/387151a0>
325. Zhang, P., Wong, C., Liu, D., Finegold, M., Harper, J.W., Elledge, S.J., 1999. p21CIP1 and p57KIP2 control muscle differentiation at the myogenin step. *Genes Dev.* 13, 213–224. <https://doi.org/10.1101/gad.13.2.213>
326. Zhang, R., Engler, A., Taylor, V., 2018. Notch: an interactive player in neurogenesis and disease. *Cell Tissue Res.* 371, 73–89. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2641-9>
327. 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. *J. Cell Biol.* 184, 67–82. <https://doi.org/10.1083/jcb.200801009>
328. Zhang, Z.-N., Chung, S.-K., Xu, Z., Xu, Y., 2014. Oct4 maintains the pluripotency of human embryonic stem cells by inactivating p53 through Sirt1-mediated deacetylation. *Stem Cells Dayt. Ohio* 32, 157–165. <https://doi.org/10.1002/stem.1532>
329. Zhao, X., Garcia, J.Q., Tong, K., Chen, X., Yang, B., Li, Q., Dai, Z., Shi, X., Seiple, I.B., Huang, B., Guo, S., 2021. Polarized endosome dynamics engage cytoplasmic Par-3 that recruits dynein during asymmetric cell division. *Sci. Adv.* 7, eabg1244. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg1244>
330. Zhou, X., Liao, W.J., Liao, J.M., Liao, P., Lu, H., 2015. Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome. *J Mol Cell Biol.* <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjv014>.
331. Zou, P., Yoshihara, H., Hosokawa, K., Tai, I., Shinmyozu, K., Tsukahara, F., Maru, Y., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Suda, T., 2011. p57Kip2 and p27Kip1 Cooperate to Maintain Hematopoietic Stem Cell Quiescence through Interactions with Hsc70. *Cell Stem Cell* 9, 247–261. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.07.003>
332. Zuchero, J.B., Barres, B.A., 2015. Glia in mammalian development and disease. *Dev. Camb. Engl.* 142, 3805–3809. <https://doi.org/10.1242/dev.129304>